

Industria y Comercio



CSA825382

SUPERINTENDENCIA

Registración de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

Organización y
Digitalización CSA Ltda

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

08 / 54162

54. TÍTULO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

DOMICILIO

74. APODERADO

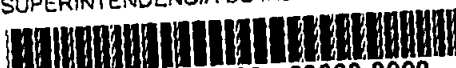
22. BOGOTÁ, D.C.,

64/01

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-054162- -00000-0000

Fecha: 2008-05-28 15:52:24 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 474

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

15 Jun 2008

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG,
BIOGEN IDEC INC. y GENENTECH, INC.

Dirección: Grenzacherstrasse 124, CH-4070
Basilea, 14 Cambridge Center, Cambridge, MA
02142 y 1 DNA Way, South San Francisco, CA
94080.

Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza,
Cambridge, Massachusetts y South San
Francisco, California, Estados Unidos de
América.

Lugar de Constitución: Suiza, Estados de
Massachusetts y Delaware, E.E.U.U.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá,
Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: TOTORITIS, Mark; SHAW, Timothy, Mark; AGARWAL, Sunil; YOCUM,
David y KELMAN, Ariella.

Dirección: 15797 Caminito Cantaras, Del Mar, CA 92014; 3 Brackenhill,
Berkhamsted, Hertfordshire; 4 Wildflower Court, Corte Madera, CA 94925; 1149
Shoreline Drive, San Mateo, CA 94404 y 1732 Jackson Street, #204, South San
Francisco, CA 94109

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y Gran Bretaña.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2006/044290

Fecha: 14/11/06

Publicación Internacional No. WO 2007/059188 A1

Fecha: 24/05/07

⑥

Título (54) "MÉTODO PARA TRATAR DAÑOS EN LAS ARTICULACIONES"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/395

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

15/11/05

06/11/06

(31) Número de Solicitud

60/737,291

60/864,463

⑨

Comprobante de Pago No. 08 - 33.091

Fecha: 24/04/08

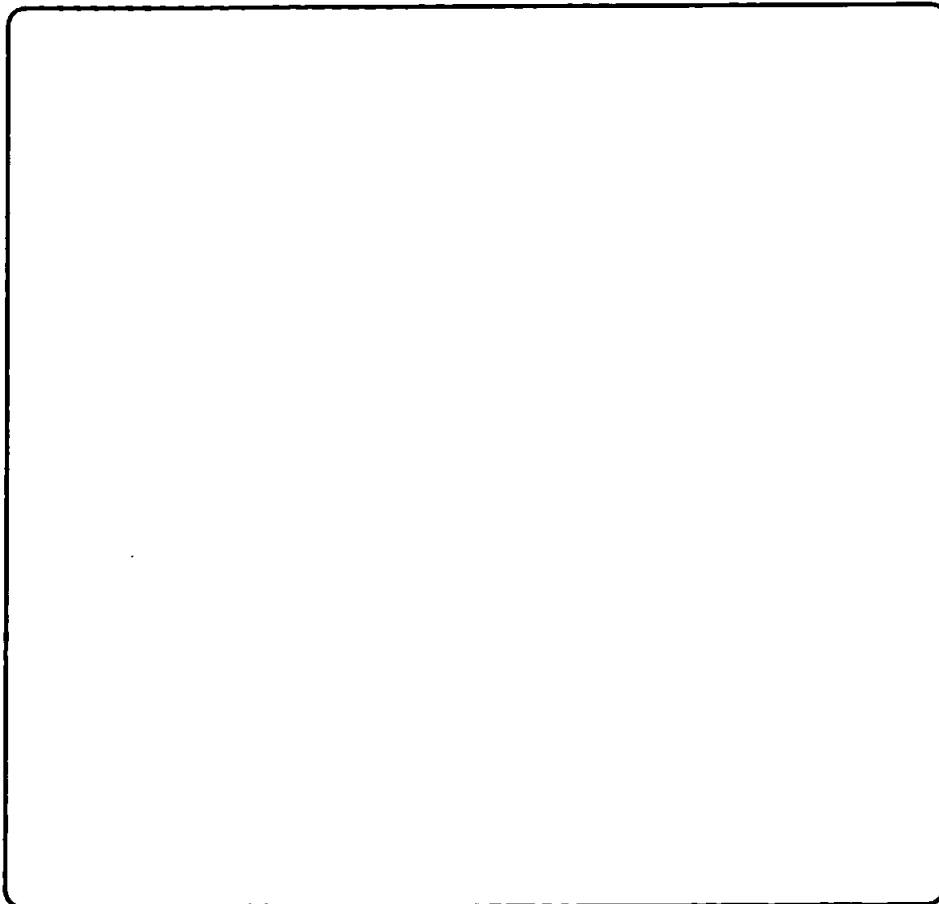
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documentos de cesión de los inventores.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ 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.
- ☐ 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, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción, opinión escrita y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

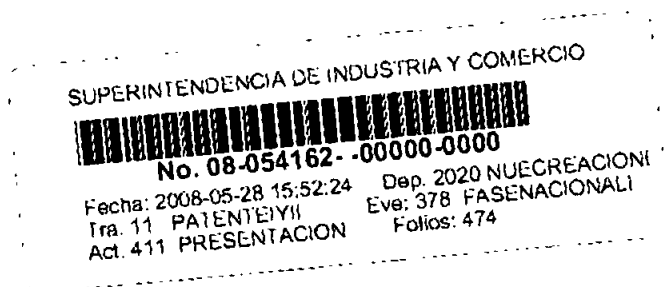
Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 33,091
FECHA : ABRIL 24 DE 2008

==== CONSIGNACION ====

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754327	773640	24/04/2008	5,991,000.00

==== CONCEPTO ====

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SGR: QUINTENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

ANEXO

Los documentos que acreditan la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de las sociedades peticionarias, que facultan a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se están presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No.

de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLORED A y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. bajo el No 8835/13376

9. Sello

Cancillería de Estado

de la ciudad de Basel (Basilea)

10. Firma

Fdo.: firma ilegible

Ruedi Eggs

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 2 de septiembre 2004

Maria Mercedes Uricoechea T.
Maria Mercedes Uricoechea T.
 Traductora Juramentada
 Resolución 10607/81 Minjusticia

Los abajo firmados, F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza.

con domicilio en 4070 Basilea, Suiza

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

domiciled at 4070 Basel, Switzerland

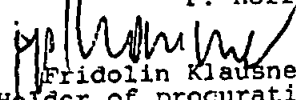
hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

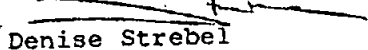
Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTÁ: HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 17th day of August 2008.
F. Hoffmann-La Roche AG


Fridolin Klausner
Holder of procuratorship


Denise Strebel
Mandatory

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Suiza
Basilea

{ss

Hoy 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Strebel a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es titular del poder/mandato de F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Suiza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Suiza, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Suiza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Suiza, ciudad de Basilea, con fecha 19 JUNIO 1997, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

Switzerland
Basel

{ss

On this 17th day of August 2004, personally Fridolin Klausner and Denise Strebel came both Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Suiza, ciudad de Basel, under date of 19th day of June 1997, and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of two thousand and four)

D. P. Kuster
Notar

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel

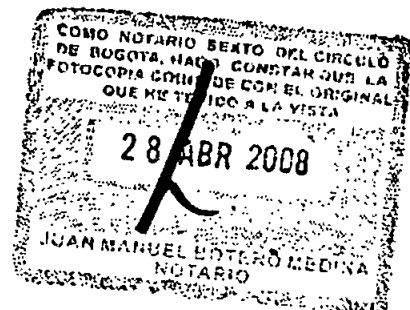
17.08.2004

2 Fr.

DR. PETER KUSTER

Allg. Prot.

No. 20



OFFICIAL AUTHENTICATION
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by Dr. P. Kuch

3. in his/her function as all. Moller

4. and certified by the seal of the Gemeinde

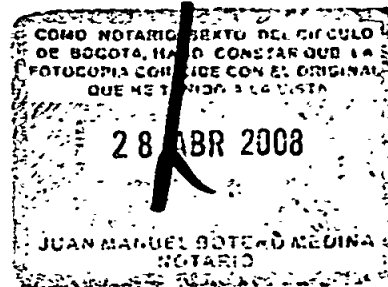
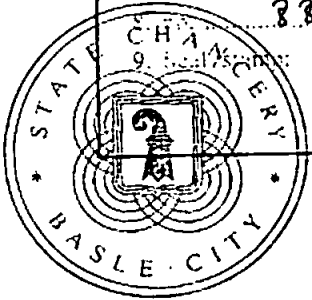
Certified **18. Aug. 2004**

5. in Basel (Stadte) 6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8835 / 11 226

9. for the purpose of 10. Signature: [Signature]



TRADUCCION OFICIAL No. 2007-01-16-029
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

The Commonwealth of Massachusetts
William Francis Galvin
Secretario del Commonwealth

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

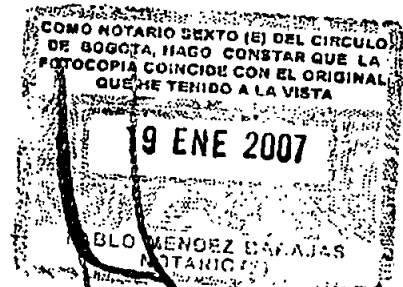
1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Jeanne S. Schmitter
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla del Estado de Massachusetts, cuya comisión expira el 13 de febrero de 2009

Certificado

5. en Boston, Massachusetts
6. el 29 de diciembre de 2006
7. por el Secretario del Commonwealth
8. No. 1196000
9. Sello/estampilla: Gran Sello del Commonwealth
10. Firma: (ilegible)
William Francis Galvin
Secretario del Commonwealth

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/S9 MINJUSTICIA

NITA ESCOBAR DETAMAYO



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

mu

513266

602mm

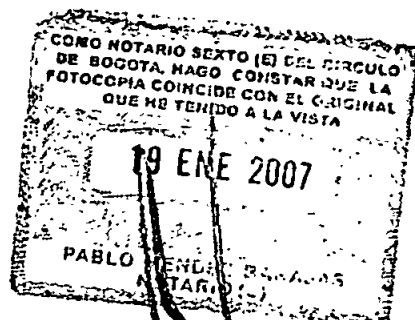
CUYA FIRMADA PARACE EL
DOCUMENTO HESME EN
LAS FIRMAS INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2007 JAN 17 A 11:02

ucb

LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



PODER

Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Dado y firmado este día 5 de diciembre de 2006

Firma: (ilegible)

Nombre Impreso: Raymond G. Arner

Cargo: Vicepresidente Senior

Principal Asesor Legal de Propiedad Intelectual

Certificado Notarial (Sociedad), documento también escrito en inglés y en español.

En este día 5 de diciembre de 2006, ante mí, el suscrito notario público, compareció personalmente

Raymond G. Arner

y me demostró con base en evidencia satisfactoria de identificación, la cual fue Identificación con fotografía de Biogen

que es la persona cuyo nombre está firmado en el documento anterior o adjunto, y reconoció ante mí que él/ella lo firmó voluntariamente para el fin expresado.

(firma: ilegible)

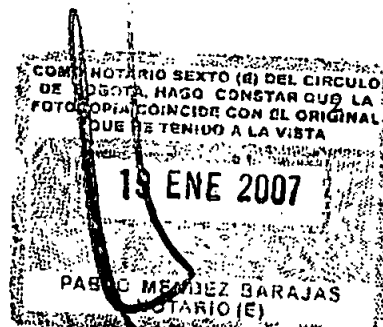
Jeanne S. Schmitter, Notario Público

Mi Comisión Expira el 13 de febrero de 2009

Sello seco notarial.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 16 de enero de 2007, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



The Commonwealth of Massachusetts

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country:* United States of America
This public document
2. *has been signed by:* Jeanne S. Schmitter
3. *acting in the capacity of:* Notary Public
4. *bears the seal/stamp of:* the State of Massachusetts
whose commission expires on: February 13, 2009

Certified

5. *at:* Boston, Massachusetts 6. *the:* 29 December, 2006
7. *by:* the Secretary of the Commonwealth
8. *No.:* 1196000
9. *Seal/stamp:* *Great Seal of the Commonwealth*

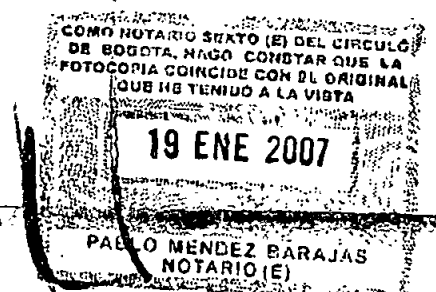
10. *Signature:*

William Francis Galvin

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth



prepared by DGittens



Los abajo firmados,
BIOGEN IDEC MA INC, Organizada y existente
bajo las leyes de Massachusetts, Estados
Unidos.

con domicilio en
14 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142.
Estados Unidos.

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o
GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA
y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá,
Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No.
5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y
verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir
notificaciones y nombrar apoderados judiciales o
extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al
parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de
1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO
TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE
ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos
designen, quedan especialmente facultados para
representarnos ante las autoridades colombianas,
administrativas, judiciales o de policía, en todos los
trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo
efecto les facultamos para dar ante dichas
autoridades todos los pasos necesarios al objeto
indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos,
recursos y presentar desistimientos; formular
descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las
solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones;
instaurar cancelaciones, renunciar total o
parcialmente a los registros, abonar todos los
impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago
determinado por la ley; recibir todos los documentos
y valores, dando el descargo respectivo; llenar
cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas
las medidas que creyeran conducentes al resguardo
de nuestros intereses; y en caso de producirse
oposición, pasando los antecedentes a los
tribunales, quedan facultados para tomar
intervención como demandantes o demandados ante
los jueces que sean competentes, pudiendo transar,
someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con
todas las demás facultades que resulten necesarias,
y por el presente declaramos desde ahora válido y
bueno cuanto dichos representantes y/o los
apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren
en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA
LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO
SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para
solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la
protocolización de este documento y de cualquier
poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre
nuestro.

Dado y firmado a los 5 días de Diciembre, 2006.

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

The undersigned,

BIOGEN IDEC MA INC., organized and existing
under the laws of Massachusetts, United States.

domiciled at
14 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142.
United States.

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or
GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO
SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of
Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72
No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal
representatives in Bogotá, with power to receive
notifications and to appoint judicial or extrajudicial
agents, so as to comply with paragraph 1o. of article
543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO
TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or
ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of
them appointed, are especially empowered to
represent us before the administrative, judicial or
police authorities of Colombia, in all proceedings
pertaining to industrial property, for which purpose
we authorize them to take before the said authorities
all the necessary steps for the said end; to file
petitions, declarations, claims, recourses and
withdrawals, to draw up specifications; to file
amendments, to limit the scope of applications, file
oppositions; file cancellations total or partially waive
registrations, to pay all installments and effect all
other payments prescribed by law; to receive proper
receipts, to comply with all other requirements and, in
short, to take all those measures which they may
deem fit for the protection of our interests; and in
case of opposition, where the proceedings be passed
over to the courts, we authorize said agents to act on
our behalf, as complainants as well as defendants,
before the competent judges, with full powers to
make arrangements, to submit to arbitrators, to
desist, to collect, to appeal and, in short, with all such
further powers as may be required, and we hereby
declare from now on as valid and good all that said
representatives and/or the agents by any one of them
appointed may do for our benefit.

We also authorize Doctors ALICIA LLOREDA
and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO
SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply
for protocolization of this document and of any power
of attorney by any one of them conferred in our
name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 5th day of
December, 2006

Signature:

Printed Name:

Title:

Raymond G. Arner
Senior Vice President
Chief Intellectual Property Counsel

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Estado de Massachusetts (ss)
 Condado de Middlesex
 Hoy 5 de Diciembre de 2006, compareció
 Raymond G. Arner, a quien conozco y
 de quien me consta que firmó el anterior documento,
 y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
 él es Vicepresidente Senior
 de Biogen Idec Ma, Inc.
 la compañía nombrada en
 el documento que antecede, una sociedad
 debidamente organizada y existente conforme a las
 leyes del Estado de Massachusetts
 , domiciliada en la ciudad de Cambridge
 Condado Middlesex de

Estado de Massachusetts Estados Unidos de America.
 legalmente constituida para un período de duración
 que aún no ha terminado, que ejerce su objeto
 social; conforme a las leyes del Estado de
 Massachusetts,
 que el declarante está autorizado por dicha
 Compañía para conferir este poder; que el sello
 estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en
 representación de la expresada Compañía, es el
 sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se
 confiere este instrumento está comprendido dentro
 del de la sociedad.
 El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
 incorporación firmados en Cambridge
 Estado de Massachusetts con fecha 12 Nov, 2003, y
 certifica que de conformidad con la legislación de
 dicho Estado la anterior declaración juramentada es
 prueba suficiente de que los hechos sobre que ella
 versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

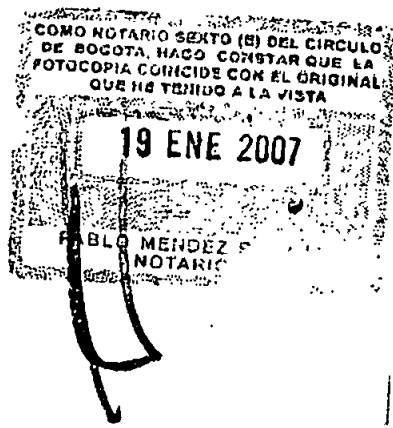
Notary Public (Notario Público).

State of Massachusetts (ss)
 County of Middlesex
 On this (date) day of (month) , 2006 , personally
 came (name of the person who signed the POA)
 , Raymond G. Arner
 to me known, and known to me to be the person who
 signed the foregoing instrument, who being by me
 duly sworn did depose and say that he is the (legal
 representant)
 Sr. VP, Secretary of BIOGEN IDEC MA, INC.
 , the company named
 within, a Corporation organized and existing under
 the laws of the State of Massachusetts
 ,
 domiciled at the City of Cambridge
 County of Middlesex , State Massachusetts
 of , United States of America
 , legally constituted for a period
 of tenure not yet expired, which exercises its
 corporate purposes according to the laws of the State
 of Massachusetts
 ; that the deponent is authorized by said Company to
 confer this power of attorney; that the seal affixed
 hereunto by the deponent in the name and on behalf
 of said Corporation is the corporate seal thereof; and
 that the purpose for which this instrument is granted
 is included within the corporate purposes of the
 Company.
 The undersigned Notary Public has seen the articles
 of Incorporation of said Corporation executed at
 Cambridge , State of Massachusetts under date of
 12 November 2003 , and hereby
 certifies that under the laws of said State the
 foregoing acknowledgment is sufficient proof that the
 facts therein contained are true, which he attests.

Jeanne S. Schmitter
 Notary Public (signature)

On this 5th day of December 2006, before
 me, the undersigned notary public, personally appeared
Raymond G. Arner
 and proved to me through satisfactory evidence of
 identification, which were
Biogen Idec photo ID badge
 to be the person whose name is signed on the preceding
 or attached document, and acknowledged to me that
 he/she signed it voluntarily for its stated purpose.

Jeanne S. Schmitter
 JEANNE S. SCHMITTER, Notary Public
 Commission Expires February 13, 2009



Robert Com
 Resident
 Area

Traducción Oficial N° 10-31-191

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

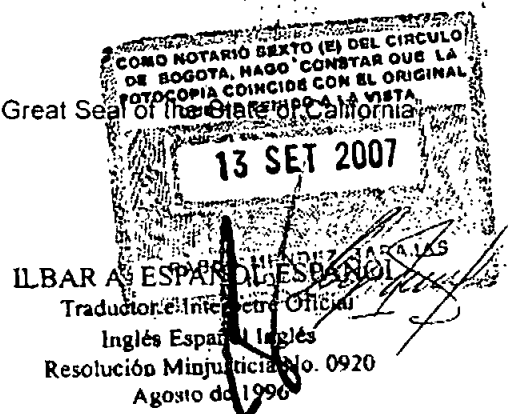
1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: TERI LEE
3. actuando en calidad de: Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello y estampilla de TERI LEE, Notario Público

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el día tres (3) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario Adjunto de Estado, Estado de California
8. Número: 258054
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "The Great Seal of the State of California"



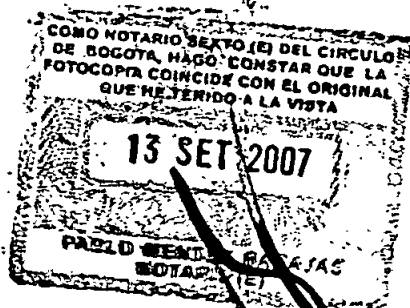
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:58

Ull
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

174484
J. Lopez
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS



CALIFORNIA RECONOCIMIENTO PARA TODO FIN

Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El día 13 de Septiembre, año 2005, ante mi, TERI LEE, Notario Público, compareció personalmente TIMOTHY R. SCHWARTZ, a quien personalmente conozco cómo la persona cuyo nombre suscribe el documento, y quien reconoció en mi presencia haber formalizado el mismo dentro de su investidura, y que mediante su firma en el documento, la persona o entidad en cuyo nombre actuó, formalizó el documento.

En TESTIMONIO firmo y sello

Firma (ilegible)

N. del T.: hay un sello: TERI LEE, Comisión Nº 1514234, Notario Público, California, Condado de San Mateo.

OPCIONAL

Descripción del documento adjunto

Título o Clase de Documento: Colombia Power

Fecha: 9/13/2005

Número de páginas: 1

Firma diferente de la mencionada anteriormente: *Ninguna*

PODER DE REPRESENTACION LEGAL

Documento escrito en idioma Inglés y Español, suscrito por Genentech, Inc., con domicilio en 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, EEUU.

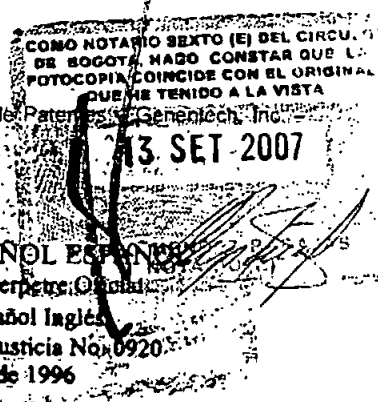
DADO Y FIRMADO EL DIA TRECE (13) DE Septiembre año 2005

Firma (ilegible)

N. del T.: Hay un sello de tinta: Timothy R. Schwartz, Ph. D.- Asesor Sección de Patentes, Genentech, Inc.

Signatario Corporativo Autorizado.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpret: Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



Traducción Oficial N° 10-31-192

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ibar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

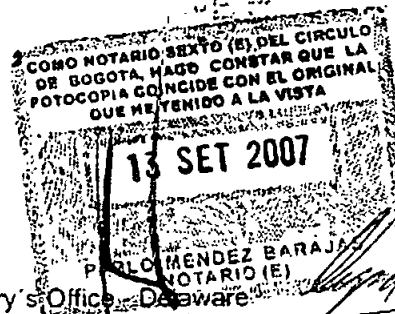
1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: 0265282
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office, Delaware"



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

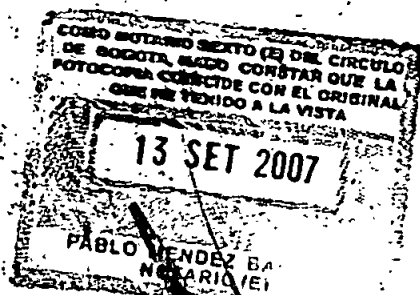
MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

174485
T 1645
Cuya firma aparece en el
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE "GENENTECH, INC." ESTA DEBIDAMENTE INCORPORADO BAJO LAS LEYES DEL ESTADO DE DELAWARE Y GOZA DE BUENA REPUTACION Y TIENE EXISTENCIA CORPORATIVA LEGAL, TAL COMO LO MUESTRAN LOS REGISTROS DE ESTE DESPACHO, EN LA FECHA DEL SIETE (7) DE OCTUBRE, AÑO 2005.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE DICHO "GENENTECH, INC." FUE INCORPORADO EL DIA VEINTITRES (23) DE DICIEMBRE DEL AÑO 1986.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS REPORTES ANUALES HAN SIDO RADICADOS HASTA LA FECHA.

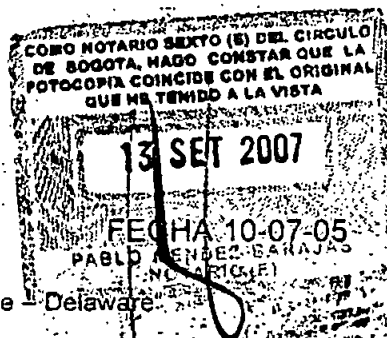
Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS IMPUESTOS DE FRANQUICIA HAN SIDO PAGADOS HASTA LA FECHA.

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACIÓN: 4212779

N. del T.: Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Productor e Impresor Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Traducción Oficial N° 10-31-193

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ibar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

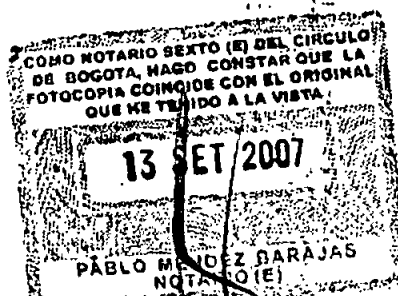
1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: 0265283
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office Delaware"



IBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

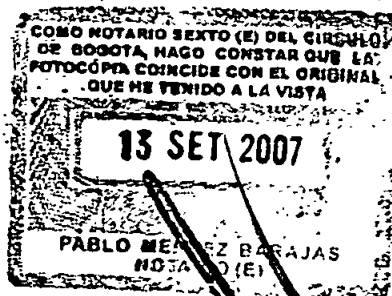
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

174407
T. 1600 Escond
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO REFORMULADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA VEINTIDOS DE JULIO DEL AÑO 1999, A LAS 9:00 A.M.

Firma (ilegible)

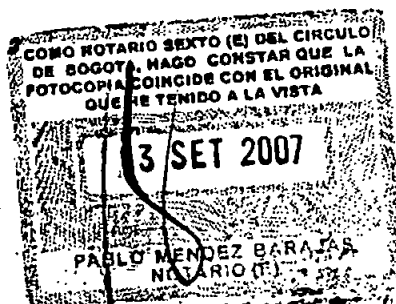
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212780

FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



1

**CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
MODIFICADO Y REFORMULADO
DE GENENTECH, INC.**

Genentech, Inc. (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, por el presente modifica el Certificado de Incorporación de la Corporación, qué fue registrada originalmente el 23 de diciembre, 1986 bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y posteriormente modificado.

El Certificado de Incorporación de la Corporación es por el presente reformulado y adicionalmente modificado, para leerlo en su integridad como sigue:

ARTÍCULO 1

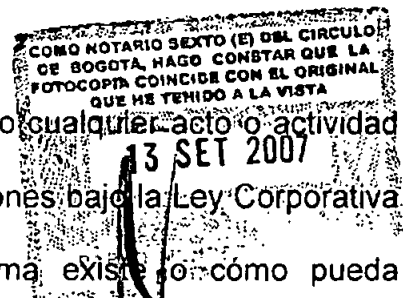
El nombre de la Corporación es: Genentech Inc.

ARTÍCULO 2

La dirección del domicilio social de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, Condado de New Castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTÍCULO 3

El objetivo social de la Corporación es llevar a cabo cualquier acto o actividad lícita para la cual puedan organizarse las corporaciones bajo la Ley Corporativa General del Estado de Delaware como la misma existe o como pueda modificarse de ahora en adelante ("Ley de Delaware").



EL BAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

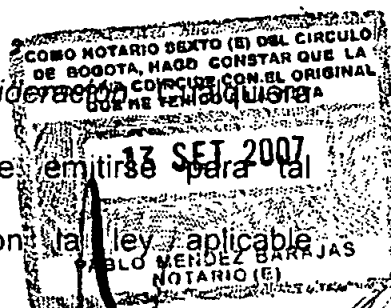
ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas respectivamente, acción preferencial y

acción ordinaria. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de cuatrocientos millones (400.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, valor nominal \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Trescientos millones (300.000.000) se denominarán acciones ordinarias, valor nominal \$0.02 por acción ("Acción Ordinaria") La Acción Ordinaria de la Corporación, será toda de una clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones se puede aumentar o disminuir (pero no por debajo del número de acciones de las mismas, entonces circulación) mediante el voto afirmativo de una mayoría con poder de voto de la acciones en circulación de la Corporación tituladas para votar sobre ello, independiente de las disposiciones de la Sección 242(b)(2) de Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción ordinaria.* (a) *Emisión y Consideración.* La Acción Ordinaria de tesorería o no emitida, puede emitirse para tal consideración según puede fijarse de acuerdo con la ley aplicable periódicamente por la Junta Directiva.



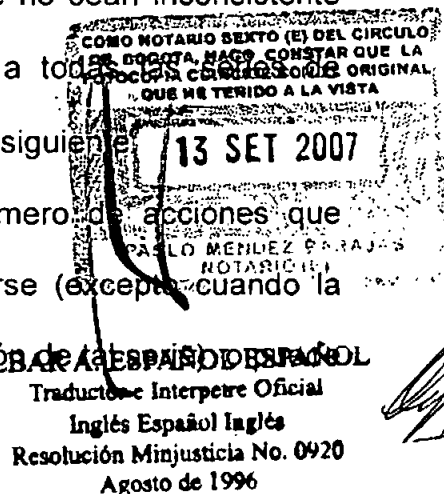
IL. BAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(b) *Dividendos*. Sujeto a los derechos de los titulares de las Acciones Preferenciales, los titulares de las Acciones Ordinarias tendrán derecho a recibir, cuando y cómo lo declare la Junta Directiva, de los recursos de la Corporación que por ley están disponibles para éllo, dividendos pagables o en dinero en efectivo, o en propiedades, o en acciones y los titulares de Acciones Preferenciales no tendrán derecho a participar de tales dividendos (a menos que la Junta Directiva lo disponga de otra manera mediante una resolución, estipulando la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCION 4.03. *Acciones Preferenciales*

(a) Series y Limites de Variaciones entre las Series. Cualquier acción de tesorería o no emitida de Acciones Preferenciales puede emitirse periódicamente en una o más series para tal consideración, según puede fijarse periódicamente por la Junta Directiva. Antes de la emisión de alguna serie particular de Acciones Preferenciales, se debe registrar un certificado ante la Secretaría de Estado de Delaware manifestando la designación, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones a ser adjuntas a las Acciones Preferenciales de tal serie y cualesquiera otros asuntos que sean requeridos, y la Junta Directiva fijará y determinará; y por la presente está expresamente facultada para fijar y determinar, en la manera prevista por la ley, los pormenores de las acciones de tal serie (en tanto que no sean inconsistentes con las disposiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las Acciones Preferenciales), incluido, pero no limitado a lo siguiente:

(i) la designación característica de tal serie y el número de acciones que constituirán la misma, cuya cantidad puede aumentarse (excepto cuando la Junta Directiva lo disponga de otra manera en la creación de la misma).



disminuirse (pero no por debajo del número de acciones de las mismas entonces circulantes) periódicamente mediante acción similar de la Junta Directiva.

(ii) la tasa anual de dividendos pagables sobre acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales tales dividendos serán pagables y la fecha desde cuando los dividendos serán acumulativos; en tal evento la Junta Directiva determinará qué dividendos serán acumulativos;

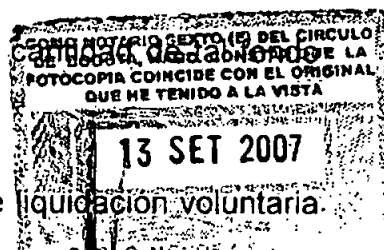
(iii) si tal serie tendrá derecho a voto, además de los derechos de votación proporcionados por la ley, y si es así, las condiciones de tales derechos a voto;

(iv) si tal serie tendrá privilegios de conversión y, en ese caso, los términos y condiciones de tal conversión, incluido, pero no limitado a, disposiciones para el ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y en tal manera cómo lo determinará la Junta directiva;

(v) si o no, las acciones de tal serie serán redimibles y, en ese caso, los términos y condiciones de tal redención, incluso la fecha o fechas en o después de que ellas sean redimibles, y la cantidad pagable por acción en caso de redención, cuya cantidad puede variar bajo condiciones diferentes y en fechas diferentes de redención;

(vi) si tal serie tendrá un fondo de amortización para la redención o compra de acciones de esa serie y, en ese caso, las condiciones y de amortización;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de liquidación voluntaria o involuntaria, disolución o liquidación de la Corporación, y los derechos de prioridad relativos, si los hay, de pago de acciones de esa serie y



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
 Traductor e Interprete Oficial
 Inglés Español Inglés
 Resolución Minjusticia No. 0920
 Agosto de 1996

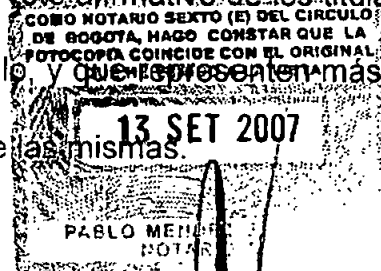
(viii) cualesquiera otros derechos relacionados preferencias y limitaciones de tal serie.

ARTÍCULO 5

SECCIÓN 5.01. *Modificación de los Estatutos por los Directores.* (a.) En apoyo y no en limitación a los poderes conferidos por el estatuto, la Junta Directiva está autorizada expresamente para formular, modificar, corregir, derogar, y rescindir los estatutos de la Corporación, sujeto a las Secciones 5.01(b) y 5.01(c) del presente.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, y 5.06, de los estatutos sólo pueden ser modificados, corregidos, derogados, o rescindidos mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultados para votar sobre ello y que representen más del 60% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario titulados para votar sobre ello, y que representen más del 90% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.



SECCIÓN 5.02. *Modificación del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación sólo puede modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para Votar sobre ella, que representen más del 60% de

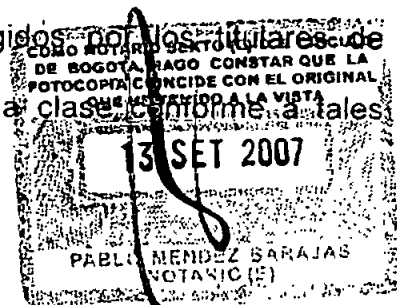
[Signature]
ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
 Traductor e Interprete Oficial
 Inglés Español Inglés
 Resolución Minjusticia No. 0920
 Agosto de 1996

las acciones tituladas para ser votado sobre ello. La sección 5.01 (c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para votar sobre ello, que representen más del 90% de las acciones tituladas para ser votado sobre ello.

ARTÍCULO 6

SECCIÓN 6.01 - Elección de Directores por los Titulares de Acciones Preferenciales.

Durante cualquier período cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o una o más series de las mismas, votando como una clase, sean titulados para elegir un número específico de directores, por razón de dividendos vencidos u otras disposiciones otorgándoles el derecho para hacerlo, entonces y durante ese periodo de tiempo mientras continúe el derecho (i) el entonces autorizado número de directores se aumentará por tal número especificado de directores, y los titulares de tales Acciones Preferenciales o tal serie de las mismas, votando como una clase, se facultarán para elegir a los directores adicionales previstos, de conformidad con las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie; (ii) cada director adicional desempeñará el cargo durante tal término y tendrá tales poderes de votación como sea expresado en las disposiciones relacionadas con las Acciones Preferenciales o serie; y (iii) cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o serie de las mismas son despojados de tales derechos para elegir un número específico de directores, votando como una clase, conforme a las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie, los periodos del cargo de todos los directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, votando como una clase, conforme a tales



[Signature]
ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español / Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Aguero de 1996

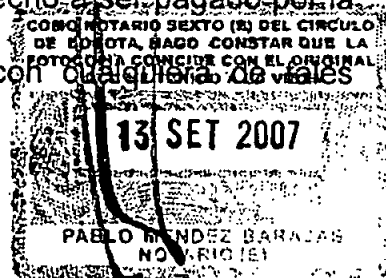
disposiciones, o eligieron llenar alguna vacante resultante de la muerte, dimisión o remoción de directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, terminará inmediatamente y el número autorizado de directores por consiguiente, se reducirá.

SECCIÓN 6.02. *Papeletas de votación.* Las elecciones de directores en una asamblea anual o especial no necesitan ser mediante papeletas escritas, a menos que los estatutos de la Corporación lo dispongan de otra manera.

SECCIÓN 6.03. *Eliminación de Cierta obligación Personal de los Directores.* (a.)

Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o ante sus accionistas por los daños y perjuicios por contravención de deberes fiduciarios monetarios como director, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y los herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quien era o es una parte o es amenazada ser hecha una parte a, o está involucrada en alguna amenaza, pendiente o a cumplirse, de acción, demanda o procedimiento, sea civil, penal, administrativo o investigativo, por causa del hecho que tal persona es o fue un director de la Corporación, o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fideicomiso u otra empresa, será indemnizada y será exonerada de responsabilidad por la Corporación, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware - El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 también incluirá el derecho a ser pagado por la Corporación por los gastos incurridos en relación con cualquiera de tales



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpreté Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

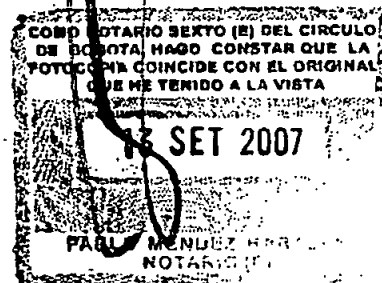
procedimientos, anticipadamente a la disposición final, hasta el máximo punto autorizado por la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, mediante la acción de su Junta Directiva, proporcionar la indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta el alcance y hasta tal efecto como lo determine la Junta Directiva que sea apropiado y autorizado por la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá la facultad para adquirir y mantener seguros en nombre de cualquier persona que es o fue director, funcionario, empleado o agente, de la Corporación o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente, de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fiduciaria u otra empresa; contra cualquier gasto, obligación o pérdida, incurrida por tal persona en cualquier capacidad o surgida de su status como tal, la Corporación tuviera o no la facultad para indemnizarlo contra tal obligación bajo la Ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán excluyentes de cualquier otro derecho el cual cualquier persona de otra manera pudiera tener o adquirir de ahora en adelante.

(f) Ni la modificación, corrección, derogación o rescisión, de esta Sección 6.03, ni la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación o los Estatutos de la Corporación, tampoco, al alcance máximo permitido por la Ley de Delaware, cualquier modificación legal, eliminará o reducirá el efecto de esta Sección 6.03 con respecto de cualesquier actos u omisiones que ocurran antes de tal modificación, corrección, derogación, rescisión, adopción o modificación.



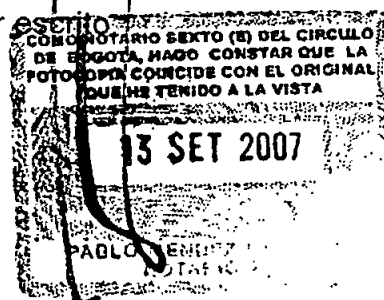
ARTÍCULO 7

SECCION 7.01. *Sección 203 de Ley de Delaware.* La Corporación por el presente, elige no ser regida por la Sección 203 de Ley de Delaware.

ARTÍCULO 8

SECCIÓN 8.01. *Relación con Roche.* En anticipación a que la Corporación deje de ser una subsidiaria totalmente propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se definió en la Sección 8.05) siga siendo accionista de la Corporación, y en anticipación a que la Corporación (como se definió en la sección 8.05) y Roche puedan involucrarse en similares o en las mismas actividades o líneas comerciales y tengan 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 continuas relaciones contractuales, corporativas y comerciales con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades inherentes a cualquier director quien desea y se esfuerza plenamente para satisfacer tales obligaciones fiduciarias del director, en la determinar el alcance total de tales obligaciones en una situación particular, las disposiciones de este Artículo 8 son expresadas para regular, definir y guiar la conducta de ciertos negocios de la Corporación por cuanto ellos pueden involucrar a Roche y a sus funcionarios y directores, y las facultades, derechos obligaciones y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con las mismas.

SECCIÓN 8.02. *Actividades Comerciales Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc - pueda de otro modo aceptar por escrito,



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpreté Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

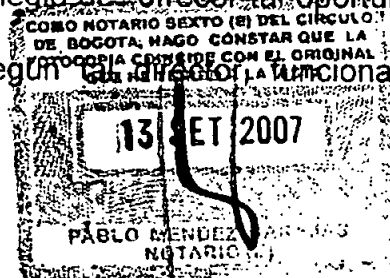
(a) Roche no tendrá una obligación de abstenerse, de comprometerse directa o indirectamente, en las mismas o similares actividades comerciales o líneas comerciales como la Corporación, y

(b) ni Roche ni ningún funcionario o director del mismo serán responsables ante la Corporación o ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario por causa de cualquiera de tales actividad de Roche o de la participación en ello de tal persona.

En caso que Roche tenga conocimiento de una transacción potencial o materia que pueda ser una oportunidad corporativa para Roche y 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 ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario como accionista de la Corporación o persona controladora de un accionista por el hecho que Roche prosiga o adquiera tal oportunidad corporativa para sí misma, dirija tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad o no comunique la información referente, o no ofrezca tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En caso que un director, funcionario o empleado de la Corporación que también es director, funcionario o empleado de Roche, tenga conocimiento de una transacción potencial o material que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (si tal transacción potencial o material es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación), tal director, funcionario o empleado tendrá el privilegio de ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o a Roche, según tal director, funcionario o

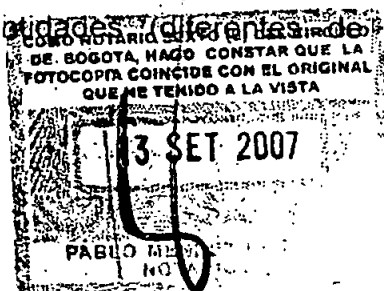


[Signature]
ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

empleado, lo juzgue apropiado bajo las circunstancias y a su entera discreción; y ningún director, funcionario o empleado, será responsable ante la Corporación o ante sus Accionistas por la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta de actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por causa del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado, ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de la Corporación) o no comunicó la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para sí mismo o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas.* Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 8.

SECCIÓN 8.05. *Definiciones.* Para los propósitos de este Artículo 8 y Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" significará la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas, asociaciones y otras entidades en las cuales la Corporación posea beneficiosamente (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones votantes en circulación, poder de voto o intereses de votación similares, y (ii) el término "**Roche**" significará Roche Holdings, Inc. y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas, asociaciones y otras entidades diferentes de la



[Signature]
ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
 Traductor e Interprete Oficial
 Inglés Español Ingles
 Resolución Minjusticia No. 0920
 Agosto de 1996

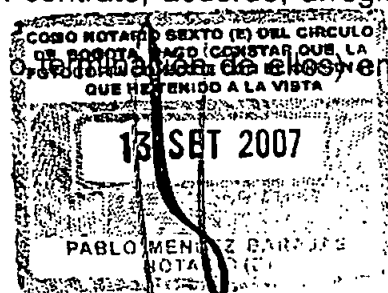
Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta Sección 8.05) que son las "afiliadas" (como se definió en la Norma 12b-2 bajo las Leyes de la Bolsa de Valores (Securities Exchange) de 1934, (según enmienda) de Roche Holdings, Inc.

SECCIÓN 8.06. *Terminación: Efecto Vinculante.* No obstante algo al contrario en este Certificado de Incorporación, las disposiciones anteriores de este Artículo 8 expirarán en la fecha cuando Roche deje de poseer Acciones Ordinarias que representen por lo menos el 5% del número de acciones circulantes de Acciones Ordinarias de la Corporación y ninguna persona que siendo director o funcionario de la Corporación, sea también director o funcionario de Roche. Tampoco tal expiración, ni la modificación, corrección, cambio o derogación, de cualquier provisión de este Artículo 8, tampoco la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación Enmendado y Reformulado, inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 8, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 8, se acumulara o surgiera, antes de tal expiración, modificación, corrección, revocación o adopción.

SECCIÓN 8.07. *Artículo 9.* Las disposiciones de este Artículo 8 son adiciones a las disposiciones del Artículo 9.

ARTÍCULO 9

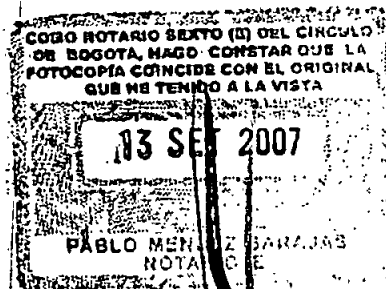
SECCIÓN 9.01. *Acuerdos no Invalidados.* Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o ~~terminación de ellos~~) entre



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

la Corporación y Roche será inválido, nulo o anulable, solamente por la razón que Roche es una de las partes de ellos o solamente porque algunos directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados con Roche, están presentes en o participan en la asamblea de la Junta Directiva o comité de los mismos, lo cual autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, corrección, modificación o terminación, o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito; pero tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de los mismos) se registrará por las disposiciones de estos Estatutos de la Corporación Modificados y Reformulados, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y alguna otra ley aplicable. Para los propósitos de este Artículo 9, las expresiones la "Corporación" y "Roche" tienen los significados manifestados en la Sección 8.05.

SECCIÓN 9.02. *Quórum*. Los Directores de la Corporación que también son directores o funcionarios de Roche pueden ser contabilizados en la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba algún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo). Las Acciones Circulantes Ordinarias poseídas por Roche pueden contabilizarse para la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de accionistas que autoriza o aprueba cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo).



[Handwritten signature]

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

SECCIÓN 9.03 - *Ninguna Responsabilidad Por Actividades de Buena Fe.*

Roche ni cualquier funcionario o director será responsable ante la Corporación o ante los accionistas para la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta para actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por el hecho de que Roche o algún funcionario o director del mismo, emprende cualquier acción o ejerce algunos derechos o entrega o retiene de buena fe cualquier aprobación en relación con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto sufragado u otra acción tomada por alguna persona que es director, funcionario u otro representante de Roche, cuyo voto es sufragado o tal persona emprende una acción en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho por o un consentimiento de Roche para los efectos de algún acuerdo o contrato.

SECCIÓN 9.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas.* Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 9.

SECCIÓN 9.05 - *Contratos Protegidos.* Para los propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o con cualquier corporación, sociedad, empresa conjunta, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posea beneficios (directa o indirectamente) del cincuenta por ciento o más de la acciones votantes en circulación, poder de



[Signature]
ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

voto o intereses de votación similares, se juzgará ser un contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación.

SECCIÓN 9.06. *Efecto Vinculante.* Ni la modificación, corrección, cambio o derogación de cualquier provisión de este Artículo 9, tampoco la adopción de cualquier provisión inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 9, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 9, se acumulara o surgiera, antes de tal alteración, modificación, cambio, revocación o adopción.

SECCIÓN 9.07. *Artículo 8.* Las disposiciones de este Artículo 9 son en adición a las disposiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado, habiendo sido debidamente adoptado de acuerdo con las Secciones 242 y 245 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware y por el consentimiento escrito del único accionista de la Corporación de acuerdo con la Sección 228 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, ha sido otorgado este día veintidós (22) de Julio, 1999.

GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente Senior.
Asesor General y Secretario.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL

Traductor e Interpretre Oficial

Inglés Español Inglés

Resolución: Minjusticia No: 0920

COMO NOTARIO SEPTIMO DEL CONSEJO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

13 SET 2007

ABLO MENDEZ ESPINOSA
NOTARIO (C)

Traducción Oficial N° 10-31-194

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ibar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

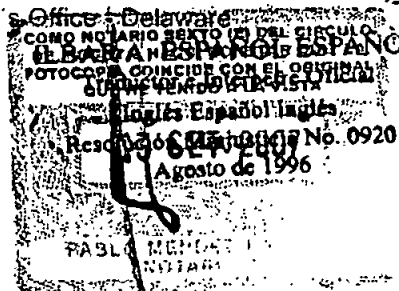
1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: 0265284
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

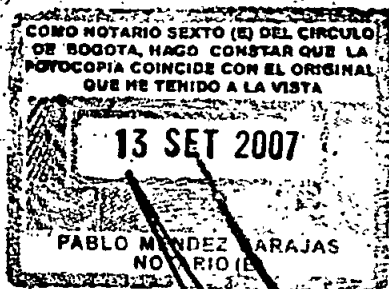
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

174488

T. L. Espinal
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO QUE SE PONE
LAS FUNCIONES INDICADAS

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO DE MODIFICACION DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA QUINCE (15) DE MAYO DEL AÑO 2000, A LAS 5:00 P.M.

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

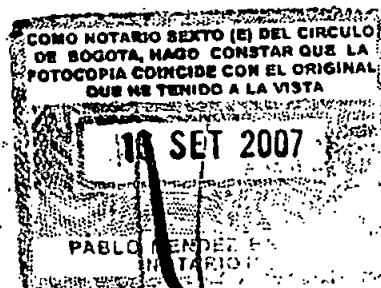
AUTENTICACION: 4212781

FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office, Delaware"



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



**CERTIFICADO DE MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO**

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

- ° "Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de setecientos millones



(700.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

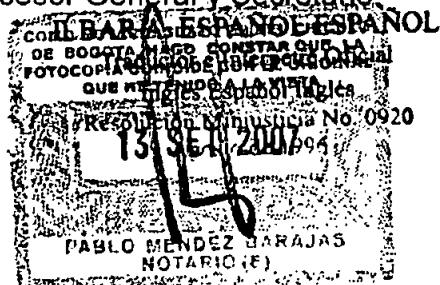
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día quince (15) de Mayo, año 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario



Traducción Oficial N° 10-31-195

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

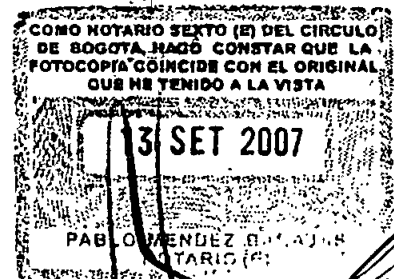
1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: 0265285
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Illegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

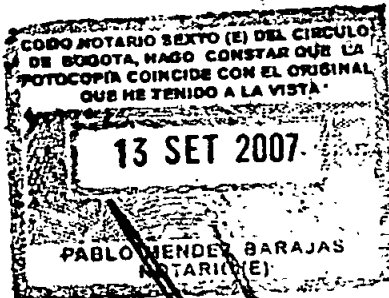
MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

117448 A
J. L. G. S. S. p. and
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ (10) DE MAYO DEL AÑO 2001, A LAS 2:05 P.M.

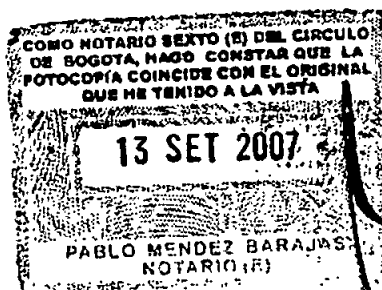
Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212782

FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



**CERTIFICADO DE MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO**

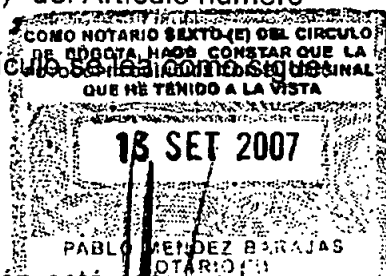
Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de mil trescientos millones



PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO
ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(1.300.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Un mil doscientos millones (1.200.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

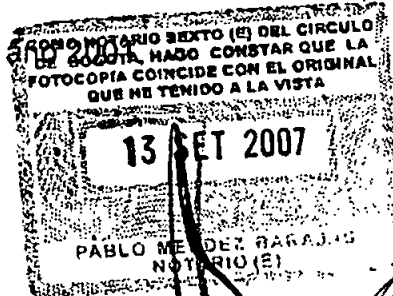
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez (10) de Mayo, año 2007.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Año de 1996

Traducción Oficial N° 10-31-196

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: 0265286
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

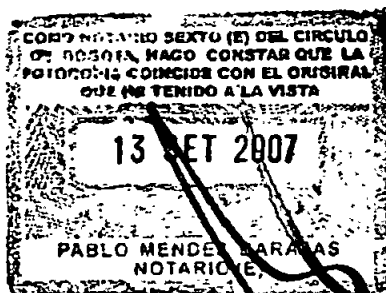
2005 OCT 31 A 11:00

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

174490

COPIA FIRMADA APARECE EN EL
DOCUMENTO RESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ Y SEIS (16) DE ABRIL DEL AÑO 2004, A LAS 7:39 P.M.

Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

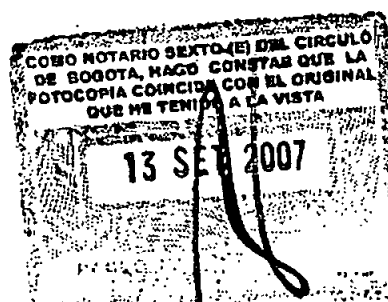
AUTENTICACION: 4212783

FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



**CERTIFICADO DE TERCERA MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO**

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

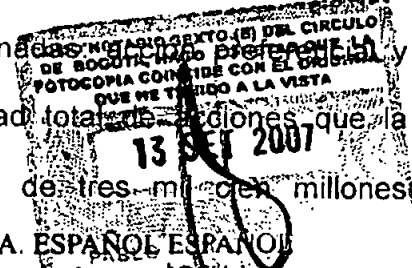
POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas "Acciones Ordinarias" y "Acciones Preferenciales", respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de tres millones.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpreté Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



(3.100.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3.000.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

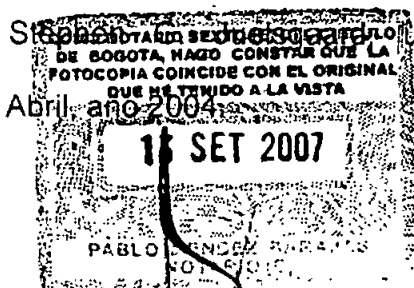
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez y seis (16) de Abril, año 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

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 TERI LEE
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of TERI LEE, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 3rd day of October 2005
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 258054
9. Seal/Stamp:

10. Signature



Pablo Mendez Barajas
Secretary of State
3 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

San Mateo

SS.

On

9/13/2005

before me,

Teri Lee, Notary Public

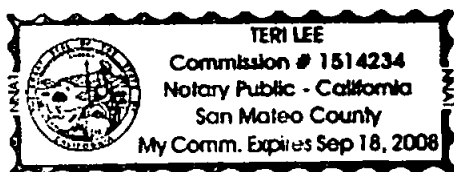
personally appeared

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.

Teri Lee
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:

Columbia Power

Document Date:

9/13/2005

Number of Pages:

1

Signer(s) Other Than Named Above:

None

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name:

☐ Individual

☐ Corporate Officer — Title(s):

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney-in-Fact

☐ Trustee

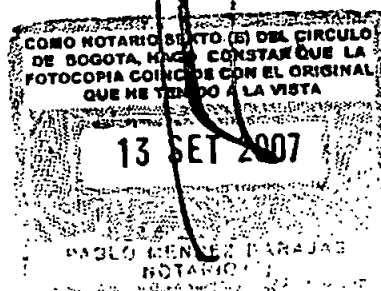
☐ Guardian or Conservator

☐ Other:

Signer Is Representing:

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER

Top of thumb here



Los abajo firmados,

GENENTECH, INC.

Una sociedad organizada y existente
bajo las leyes del Estado de Delaware
Estados Unidos de America.

con domicilio en

1 DNA way

South San Francisco, CA 94080, USA

The undersigned,

Genentech, Inc

A Corporate organized and existing under the
domiciled at laws of State of Delaware, E.U.A

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080, USA

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o
GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA
y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá,
Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No.
5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y
verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir
notificaciones y nombrar apoderados judiciales o
extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al
parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de
1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO
TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE
ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos
designa, quedan especialmente facultados para
representarnos ante las autoridades colombianas,
administrativas, judiciales o de policía, en todos los
trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo
efecto les facultamos para dar ante dichas
autoridades todos los pasos necesarios al objeto
indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos,
recursos y presentar desistimientos; formular
descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las
solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones;
instaurar cancelaciones, renunciar total o
parcialmente a los registros, abonar todos los
impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago
determinado por la ley; recibir todos los documentos
y valores, dando el descargo respectivo; llenar
cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas
las medidas que creyeron conducentes al resguardo
de nuestros intereses; y en caso de producirse
oposición, pasando los antecedentes a los
tribunales, quedan facultados para tomar
intervención como demandantes o demandados ante
los jueces que sean competentes, pudiendo transar,
someter a árbitros, desistir, perdonar y apelar, con
todas las demás facultades que resulten necesarias,
y por el presente declaramos desde ahora válido y
bueno cuanto dichos representantes y/o los
apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren
en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA
LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO
SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para
solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la
protocolización de este documento y de cualquier
poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre
nuestro.

Dado y firmado a los 13 días de Sep. 2005

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Section Patent Counsel
Genentech, Inc.
Authorized Corporate Signatory

heraby appoint, ALICIA LLOREDA and/or
GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO
SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of
Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72
No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal
representatives in Bogotá, with power to receive
notifications and to appoint judicial or extrajudicial
agents, so as to comply with paragraph 1o. of article
543 of decree 410 of 1971.

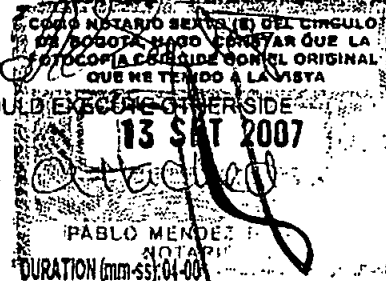
Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO
TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or
ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of
them appointed, are especially empowered to
represent us before the administrative, judicial or
police authorities of Colombia, in all proceedings
pertaining to industrial property, for which purpose
we authorize them to take before the said authorities
all the necessary steps for the said end; to file
petitions, declarations, claims, recourses and
withdrawals, to draw up specifications; to file
amendments, to limit the scope of applications, file
oppositions; file cancellations total or partially waive
registrations, to pay all installments and effect all
other payments prescribed by law; to receive proper
receipts, to comply with all other requirements and, in
short, to take all those measures which they may
deem fit for the protection of our interests; and in
case of opposition, where the proceedings be passed
over to the courts, we authorize said agents to act on
our behalf, as complainants as well as defendants,
before the competent judges, with full powers to
make arrangements, to submit to arbitrators, to
desist, to collect, to appeal and, in short, with all such
further powers as may be required, and we hereby
declare from now on as valid and good all that said
representatives and/or the agents by any one of them
appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA
and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO
SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply
for protocolization of this document and of any power
of attorney by any one of them conferred in our
name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this

13 Sept 2005

NOTARY SHOULD EXHIBIT OTHER SIDE



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

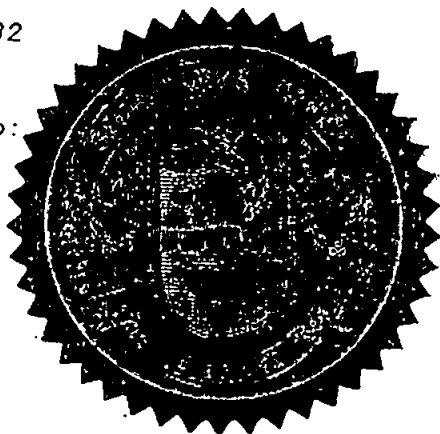
5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

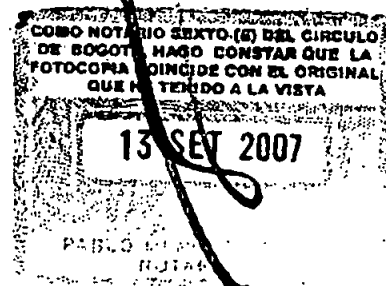
8. No. 0265282

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

PAGE 1

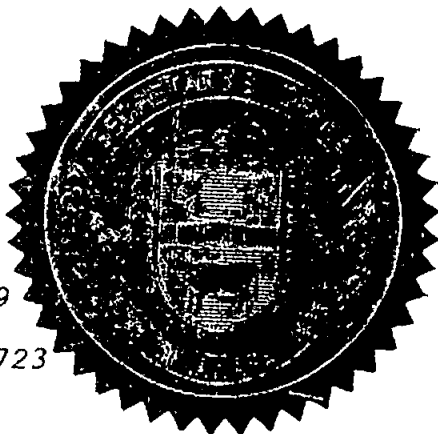
The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "GENENTECH, INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE SEVENTH DAY OF OCTOBER, A.D. 2005.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE SAID "GENENTECH, INC." WAS INCORPORATED ON THE TWENTY-THIRD DAY OF DECEMBER, A.D. 1986.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE ANNUAL REPORTS HAVE BEEN FILED TO DATE.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE FRANCHISE TAXES HAVE BEEN PAID TO DATE.



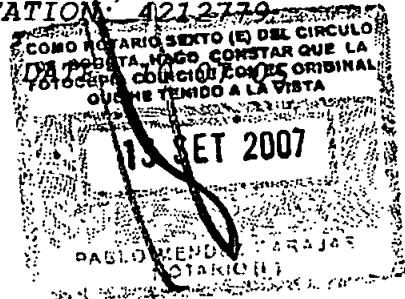
2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212779



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

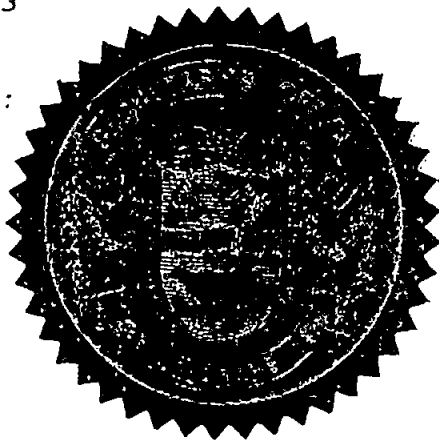
5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265283

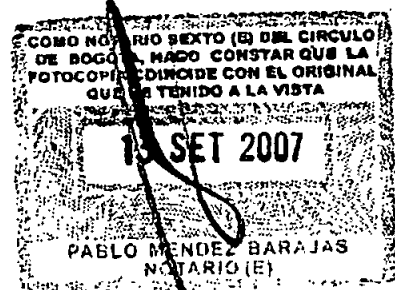
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



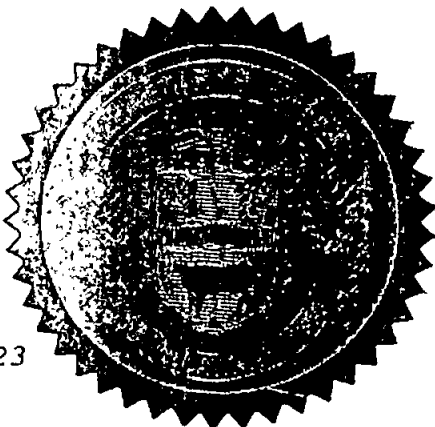
143

Delaware

PAGE 1

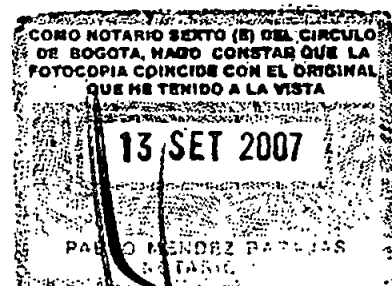
The First State

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

050823723



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 4212780

DATE: 10-07-05

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

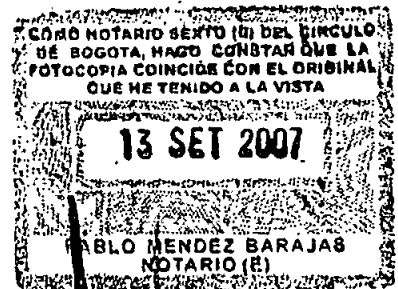
The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

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
992302331 - 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.

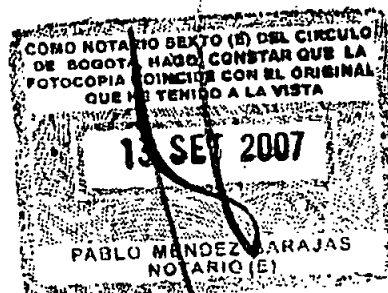
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the 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



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;

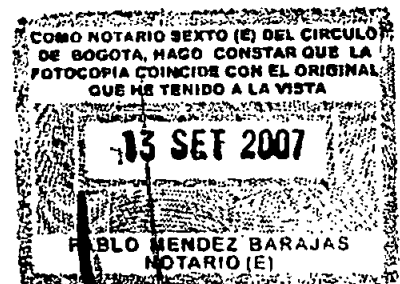
(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(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.

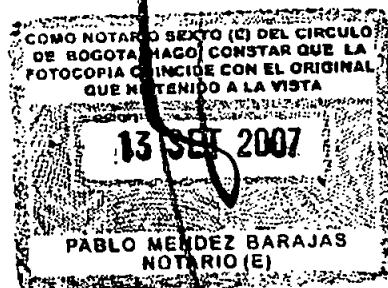
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(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



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.

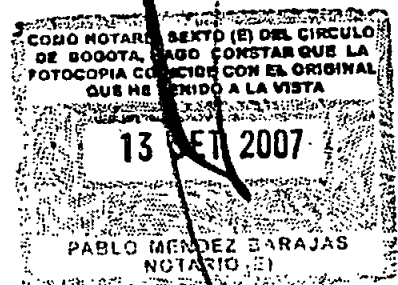
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

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



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.

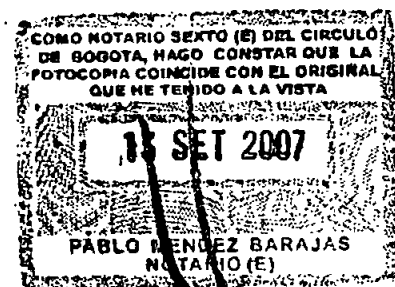
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect 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



of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

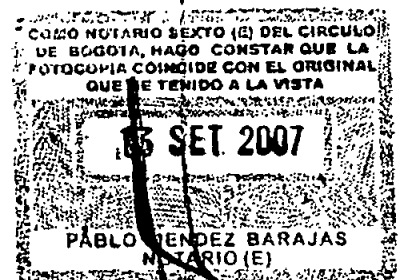
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(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.



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.

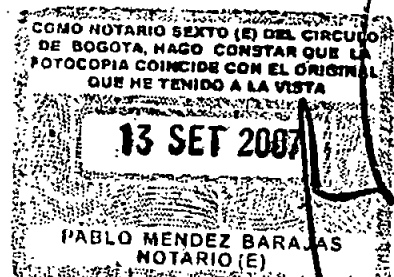
SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or 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



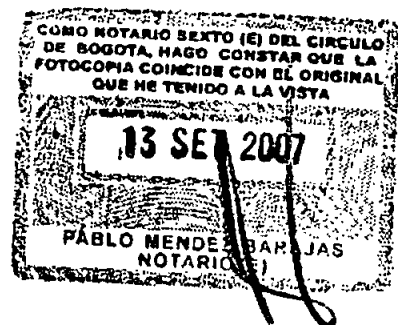
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, 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.

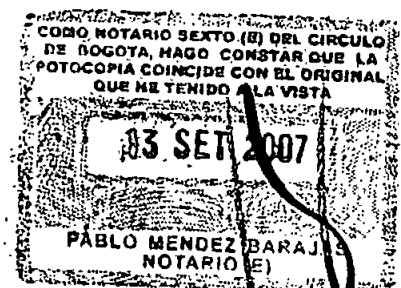
SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

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.



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.

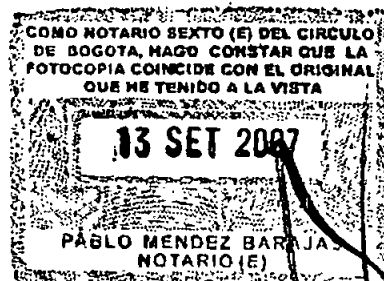


IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of 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

11



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 seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265284

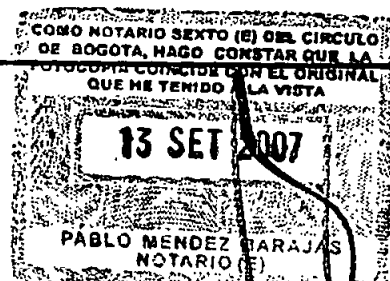
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



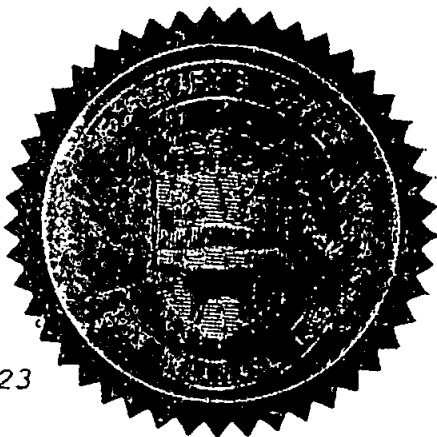
194

Delaware

PAGE 1

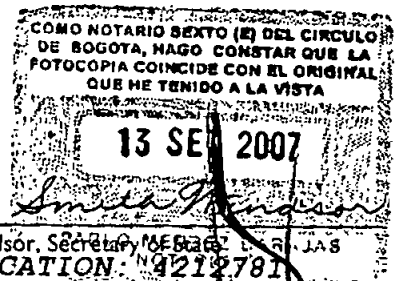
The First State

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

050823723



Harriet Smith Windsor
Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 9212781

DATE: 10-07-05

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.

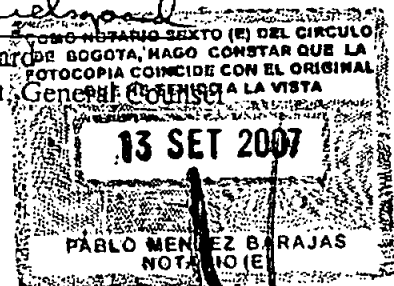
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

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 G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
and Secretary



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

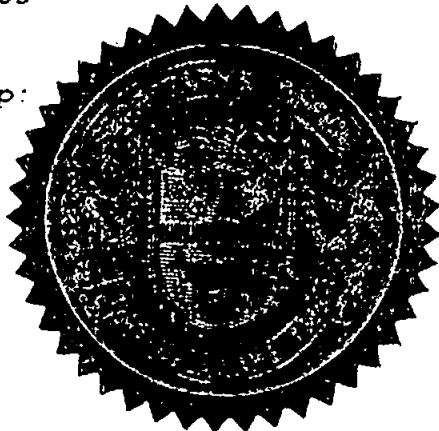
5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

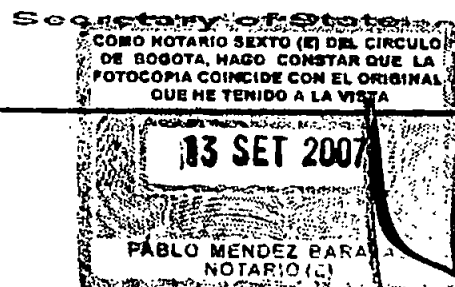
8. No. 0265285

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor



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 TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.



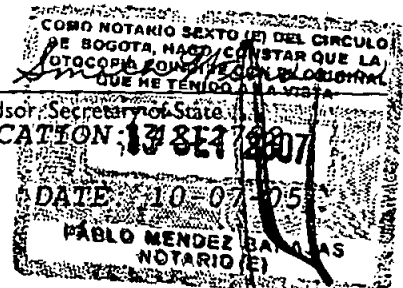
2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 178472807



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.

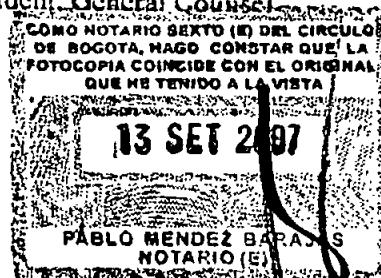
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

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: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

86747



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 seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265286

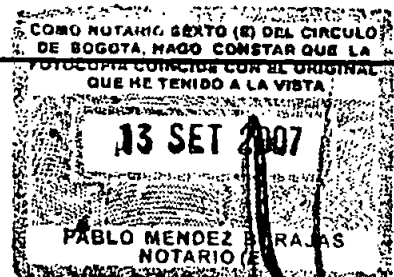
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

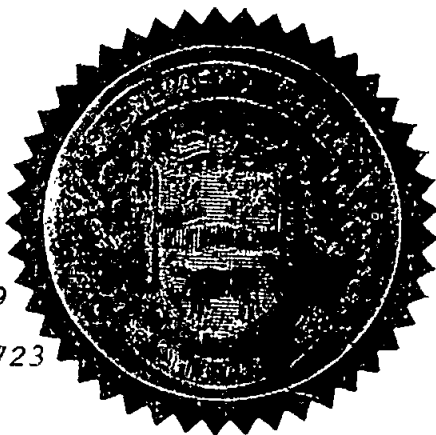


Delaware

PAGE 1

The First State

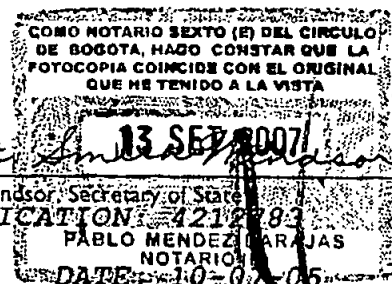
I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.



2112549

050823723

Harriet Smith Windsor
Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 4212283
PABLO MENDEZ ARAJAS
NOTARIO
DATE: 10-07-05



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.

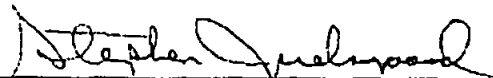
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

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.

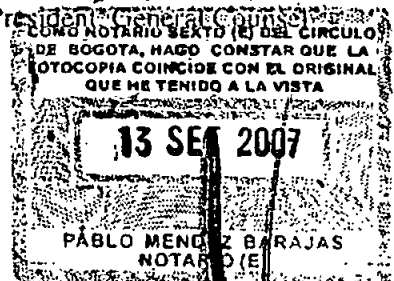
GENENTECH, INC.

By:



Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel
and Secretary



#153087

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

PCT

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente 39766-0192 PCT	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación o Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/US2006/044290	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 14/11/2006	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 15/11/2005
Solicitante F. HOFFMANN – LA ROCHE AG		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 11 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó,

☐ una traducción de la solicitud internacional al _____, el cual es el idioma de la traducción presentada para la búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b))

b. ☒ Respecto a una secuencia de ácido nucleótido y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver Recuadro No. I.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Recuadro II).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Recuadro III).

4. Respecto al título,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lea así:

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro III. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. 5

☐ como lo sugirió el solicitante.

☒ como lo seleccionó esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención-

b. ☐ Ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen.

Forma PCT/ISA/210 (Primera hoja) (Abril 2005)

Folios 75 y 76 Tapetas
Extracto folio 72

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/044290

Casilla No. I. Nucleótido y/o secuencia(s) aminoácida (Continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, la búsqueda internacional se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☒ contenido en la solicitud internacional según se registró
☒ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador
☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda.

2. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

3. Comentarios adicionales:

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/044290

A. CLASIFICACION DE MATERIA

INV. A61K39/395 A61P19/02 A61K31/00
ADD. C07K16/28

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

C07K A61K A61P

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Interno, Dato WPI, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	PROTHEREO A ET AL: "REMISIÓN DE ARTROPATÍA INFLAMATORIA EN ASOCIACIÓN CON TERAPIA ANTI-CD20 PARA LIPOMA DE NO-HODGKIN" RHEUMATOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 38, no. 11, Noviembre 1999 (1999-11), páginas 1150-1152, XP000942661 ISSN: 1462-0324 todo el documento	1-61, 65-98, 101-112
X	WO 02/22212 A2 (IDEC PHARMA CORP [US]) 21 Marzo 2002 (2002-03-21) reivindicación 34; ejemplo 1 ----- - / ----	1-61, 65-98, 101-112

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

19 de Marzo de 2007

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

12/04/2007

Nombre y dirección del correo de 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

Funcionario autorizado

Siaterli, Maria

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/044290

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	EDWARDS J C W ET AL: "MEJORAMIENTO SOSTENIDO EN ARTRITIS REUMATOIDE SIGUIENDO UN PROTOCOLO DISEÑADO PARA DISIPAR LINFOCITOS B" RHEUMATOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 40, no. 2, Febrero 2001 (2001-02), páginas 205-211, XP002348931 ISSN: 1462-0324 página 206 206, columna derecha, paragrafo 2; tablas 1,2 página 207, columna izquierda, paragrafo 2-4	1-61, 65-98, 101-112
X	KNEITZ C ET AL: " MEJORAMIENTO DE ARTRITIS REUMATOIDE RECALCITRANTE DESPUÉS DE LA DISIPACIÓN DE CÉLULAS B." SCANDINAVIAN JOURNAL OF RHEUMATOLOGY 2004, vol. 33, no. 2, 2004, páginas 82-86, XP008076371 ISSN: 0300-9742 página 82, columna derecha, ultimo paragrafo - página 83, columna izquierda, línea 1; tabla 1 página 83, columna izquierda, paragrafo 2 página 85, columna derecha, último paragrafo	1-61, 65-98, 101-112
X	WO 2005/060999 A (GENENTECH INC [US]; BRUNETTA PAUL G [US]) 7 Julio 2005 (2005-07-07) página 12, línea 19 - página 14, columna 1, línea 14; reivindicaciones 1-7 ejemplo 1	1-112
X	GENENTECH: "ESTUDIO DE FASE III MUESTRA QUE RITUXAN MEJORA SIGNIFICATIVAMENTE LOS SÍNTOMAS EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE QUIENES RESPONDEN INADECUADAMENTE A TERAPIAS ANTI-TNF " GENENTECH PRESS RELEASE, [Online] 5 Abril 2005 (2005-04-05), páginas 1-2, XP002425321 Internet Recuperado de Internet: URL: http://www.gene.com/gene/news/press-releases/display.do?method=print&id=8267> [retrieved on 2007-03-12] todo el documento	1-61, 65-98, 101-112
X	US 2004/202658 A1 (BENYUNES MARK e [US]) 14 Octubre 2004 (2004-10-14) reivindicación 12; ejemplo 1	1-112

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/044290

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 00/67796 A (GENENTECH INC [US]; IDEC PHARMACEUTICALS INC [US]) 16 Noviembre 2000 (2000-11-16) ejemplo 1 -----	1-61, 65-98, 101-112
X	EDWARDS: " EFICACIA Y SEGURIDAD DE RITUXIMAB, UN ANTICUERPO MONOCLONAL QUIMÉRICO OBJETIVO DE CÉLULAS B: UNA PRUBA CONTROLADA POR PLACEBO Y ALEATORIA EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE" ARTHRITIS & RHEUMATISM, [Onlínea] vol. 46, no. 9suppl, 25 Octubre 2002 (2002-10-25), - 29 Octubre 2002 (2002-10-29) XP002425322 EEUU resumen 446 Recuperado de Internet: URL:http://www.hopkins-arthritis.com.jhm1.edu/edu/acr2002/ra-treatments.html#rituxim ab> [retrieved on 2007-03-09] resumen -----	1-61, 65-98, 101-112
X	EMERY: "ANÁLISIS PRIMARIO DE UN RANGO DE DOSIS DE PRUEBA DE RITUXIMAB, CONTROLADO POR PLACEBO, DOBLE CIEGO, UN ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD20, EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE RECIBIENDO METOTREXATO (PRUEBA DE DANCER" ANALES DE LAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS" ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, [Onlínea] vol. 64, no. suppl3, Junio 2005 (2005-06), páginas 1-2, XP002425323 presentación oral recuperado de Internet: URL:http://eular.bmj.com/cgi/content/abstr act/ardmtg;64/Suppl_3/182?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=1&author1=emery&andorexacttitle=and&andorexacttitleabs=and&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDE X=20&sortspec=relevance&volume=64&resource type=HWCIT,HWELTR> [retrieved on 2009] todo el documento -----	1-61, 65-98, 101-112
X	LEANDRO M J ET AL: "RESULTADO CLÍNICO EN 22 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE TRATADOS CON DISIPACIÓN DE LINFOCITOS B" ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, LONDON, GB, vol. 61, no. 10, Octubre 2002 (2002-10), páginas 883-888, XP002348932 ISSN: 0003-4967 página 884; tablas 1,2 -----	1-61, 65-98, 101-112

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/044290

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	DE VITA SALVATORE ET AL: " EFICACIA DEL BLOQUEO SELECTIVO DE CÉLULAS B EN EL TRATAMIENTO DE ARTRITIS REUMATOIDE: EVIDENCIA PARA UN PAPEL PATOGENÉTICO DE CÉLULAS B " ARTHRITIS AND RHEUMATISM, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 46, no. 8, Agosto 2002 (2002-08), páginas 2029-2033, XP002306249 ISSN: 0004-3591 página 2032, columna izquierda, ultimo paragrafo; tablas 1,2	1-61, 65-98, 101-112
X	MODRE J ET AL: "UN ESTUDIO DE FASE II DE RITUXIMAB EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE Y CON ENFERMEDAD RECURRENTE SIGUIENDO EL TRANSPLANTE DE CÉLULAS MADRE HAEMATOPOIÉTICAS" BONE MARROW TRANSPLANTATION AGO 2004, vol. 34, no. 3, Agosto 2004 (2004-08), páginas 241-247, XP002425324 ISSN: 0268-3369 página 242, izquierdo columna, paragrafo 2 página 245, columna derecha, paragrafo 2 página 246, columna izquierda, último paragrafo	1-61, 65-98, 101-112
X	GOTTENBERG J-E ET AL: "TOLERANCIA Y EFICACIA EN PERÍODOS CORTOS DE RITUXIMAB EN 43 PACIENTES CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES SISTÉMICAS" ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES JUN 2005, vol. 64, no. 6, Junio 2005 (2005-06), páginas 913-920, XP002425325 ISSN: 0003-4967 página 916, columna izquierda, paragrafo 5; tabla 1	1-61, 65-98, 101-112
X	ANONYMOUS: "MABTHERA ALTAMENTE SELECTIVO EN EL TRATAMIENTO DE ARTRITIS REUMATOIDE" NEWS-MEDICAL.NET, [Onl line] 9 Junio 2005 (2005-06-09), páginas 1-2, XP002425326 Recuperado de Internet: URL:http://www.news-medical.net/print_article.asp?id=10840> [retrieved on 2007-03-09] todo el documento	1-61, 65-98, 101-112
	----- -/-	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/044290

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	HIGASHIDA: " SEGURIDAD Y EFICACIA DEL RITUXIMAB EN EL TRATAMIENTO DE ARTRITIS REUMAOTIDE RECALCITRANTE. TIPO DE SESIÓN: CARTEL SESIÓN 139-I" BLOOD, vol. 102, no. 11, 16 Noviembre 2003 (2003-11-16), página 1, XP002425327 EEUU resumen	1-61, 65-98, 101-112
X	WO 2004/056312 A (GENENTECH INC [US]; ADAMS CAMELLIA W [US]; CHAN ANDREW C [US]; CROWLEY) 8 Julio 2004 (2004-07-08) ejemplos 3,6,16; secuencias 21, 22	1-61, 65-98, 101-112
X	WO 2004/091657 A (GENENTECH INC [US]; BENYUNES MARK [US]) 28 Octubre,2004 (2004-10-28) ejemplo 1; secuencias 1-4	1-112
X	ANONYMOUS, NCT00077870: "UN ESTUDIO DE SEGURIDAD DE DOSIS INCREMENTADAS DE PRO70769 PARA INDIVIDUOS CON ARTRITIS REUMATOIDE MODERADA A SEVERA QUE RECIBEN DOSIS ESTABLES DE METOTREXATO CONCOMITANTE" CLINICALTRIALS.GOV, [Online] 12 Febrero 2004 (2004-02-12), - 12 Agosto 2005 (2005-08-12) páginas 1-3, XP002425328 internet Recuperado de Internet: URL: http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00077870?sessionid=CDF4C4B9EF58B79A0FEED8ACAAB7AC4F?order=21 [retrieved on 2007-03-19] página 1, paragrafo	1-61, 65-98, 101-112
A	EDWARDS J C W ET AL: "TERAPIA DE DISIPACIÓN DE LINFOCITOS B CON RITUXIMAB EN ARTRITIS REUMATOIDE" RHEUMATIC DISEASES CLINICS OF NORTH AMERICA, W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 30, no. 2, 2004, páginas 393-403, XP008076293 ISSN: 0889-857X página 398, paragrafo 3 página 396, paragrafo 4 - página 397, paragrafo 4	1-112

81

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/044290

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	GENENTECH: "BIOGEN IDEC Y GENENTECH ANUNCIAN LA ACEPTACIÓN POR LA FDA DE LA APLICACIÓN DE LICENCIAS DE BIOLÓGICOS SUPLEMENTARIOS Y LA DESIGNACIÓN DE REVISIÓN PRIORITARIA PARA RITUXAN EN ARTRITIS REUMATOIDE" INTERNET ARTICLE, [Onlínea] 31 Octubre 2005 (2005-10-31), páginas 1-2, XP002425329 EEUU Recuperado de the Internet: URL: http://www.gene.com/gene/news/press-releases/display.do?method=detail&id=9047 > [retrieved on 2007-03-09] página 1, paragraph 1-7	1-61, 65-98, 101-112
P, X	HIBBLE: "ARTRITIS REUMATOIDE - MABTHERA PROPORCIONA BENEFICIOS DURADEROS" MEDICAL NEWS TODAY, [Onlínea] 21 Noviembre 2005 (2005-11-21), páginas 1-2, XP002425335 Recuperado de Internet: URL: http://www.medicalnewstoday.com/medicalnews.php?newsid=33811 > [retrieved on 2007-03-09] todo el documento	1-61, 65-98, 101-112
A	EDWARDS J C W ET AL: "TERAPIA DE DISIPACIÓN DE LINFOCITOS B EN ARTRITIS REUMATOIDE Y OTROS DESÓRDENES AUTOINMUNES" BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, COLCHESTER, ESSEX, GB, vol. 30, no. 4, Agosto 2002 (2002-08), páginas 824-828, XP002306250 ISSN: 0300-5127 página 826, columna derecha, paragrafo 4 – página 827, paragrafo 3; tabla 1	
A	FIELDS: "RITUXIMAB EN EL TRATAMIENTO DE ARTRITIS REUMATOIDE, LUPUS SISTÉMICA Y OTRAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES: REPORTE ESPECIAL DEL PASADO, PRESENTE Y FUTURO" HOSPITAL OF SPECIAL SURGERY, [Onlínea] 25 October 2002 (2002-10-25), páginas 1-9, XP002425336 Recuperado de Internet: URL: http://www.hss.edu/professional-conditions_13466.asp?refName=Autoimmune+Diseases > [retrieved on 2007-03-09]	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/044290

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
P, X	BATHON: "TRATAMIENTOS DE LA ARTRITIS REUMATOIDE" THE JOHN HOPKINS ARTHRITIS CENTER, 2005 AMERICAN COLEGE OF RHEUMATOLOGY, [Onlínea] - 17 Noviembre 2005 (2005-11-17) páginas 1-12, - XP002425337 EEUU Recuperado de Internet: URL: http://www.hopkins-arthritis.som.jhmi.edu/edu/acr200S/ra-treatments.html > [retrieved on 2007-03-09] paragrafo [ABS.1830], [1917], [1922] -----	1-112

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 1 de la primera hoja)

Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:
Aunque las reivindicaciones 1-64, 67-100, 104-112 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición.
2. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones No.:

porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.

☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/044290

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda		Fecha de publicación		Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 0222212	A2	21-03-2002	CA	2422076 A1	21-03-2002
			CN	1592645 A	09-03-2005
			JP	2004508420 T	18-03-2004
			MX	PA03002262 A	15-10-2003
			NO	20031218 A	19-05-2003
WO 2005060999	A	07-07-2005	AU	2004305560 A1	07-07-2005
			BR	PI0417105 A	06-02-2007
			CA	2549122 A1	07-07-2005
			CN	1917901 A	21-02-2007
			EP	1696955 A2	06-09-2006
			KR	20060109494 A	20-10-2006
			MX	PA06006864 A	23-08-2006
US 2004202658	A1	14-10-2004	US	2006240008 A1	26-10-2006
WO 0067796	A	16-11-2000	AT	311199 T	15-12-2005
			AU	777970 B2	04-11-2004
			AU	4714300 A	21-11-2000
			AU	2005200462 A1	03-03-2005
			BR	0011197 A	19-02-2002
			CA	2372603 A1	16-11-2000
			CN	1378459 A	06-11-2002
			DE	60024436 D1	05-01-2006
			DE	60024436 T2	17-08-2006
			DK	1176981 T3	10-04-2006
			EP	1176981 A1	06-02-2002
			EP	1637160 A2	22-03-2006
			ES	2254174 T3	16-06-2006
			HK	1043312 A1	28-07-2006
			HU	0201009 A2	29-07-2002
			JP	2002544174 T	24-12-2002
			MX	PA01011279 A	02-07-2002
			NO	20015417 A	07-01-2002
			NZ	514914 A	24-09-2004
			PL	351962 A1	14-07-2003
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
			JP	2006517399 T	27-07-2006
			KR	20050086913 A	30-08-2005
			MA	27704 A1	02-01-2006
			MX	PA05006511 A	17-02-2006
			US	2006024300 A1	02-02-2006
WO 2004091657	A	28-10-2004	AU	2004229376 A1	28-10-2004
			BR	PI0409534 A	18-04-2006
			CA	2519870 A1	28-10-2004
			CN	1802176 A	12-07-2006
			EP	1613350 A2	11-01-2006
			HR	20050940 A2	31-12-2005
			JP	2006522811 T	05-10-2006
			KR	20050114273 A	05-12-2005
			MA	27838 A1	03-04-2006
			MX	PA05010778 A	12-12-2005

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 39766-0192 PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2006/044290	International filing date (day/month/year) 14/11/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 15/11/2005
Applicant F. HOFFMAN - LA ROCHE AG		

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 11 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:

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. 5
☐ as suggested by the applicant
☒ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/044290

Box No. I 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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/044290

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 A61P19/02 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, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PROTHEREO A ET AL: "REMISSION OF INFLAMMATORY ARTHROPATHY IN ASSOCIATION WITH ANTI-CD20 THERAPY FOR NON-HODGKIN'S LYMPHOMA" RHEUMATOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 38, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 1150-1152, XP000942661 ISSN: 1462-0324 the whole document	1-61, 65-98, 101-112
X	WO 02/22212 A2 (IDEC PHARMA CORP [US]) 21 March 2002 (2002-03-21) claim 34; example 1	1-61, 65-98, 101-112

☒ 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

19 March 2007

Date of mailing of the international search report

12/04/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Slater11, Maria

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/044290

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EDWARDS J C W ET AL: "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" RHEUMATOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 40, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 205-211, XP002348931 ISSN: 1462-0324 page 206, right-hand column, paragraph 2; tables 1,2 page 207, left-hand column, paragraph 2-4 -----	1-61, 65-98, 101-112
X	KNEITZ C ET AL: "Improvement of refractory rheumatoid arthritis after depletion of B cells." SCANDINAVIAN JOURNAL OF RHEUMATOLOGY 2004, vol. 33, no. 2, 2004, pages 82-86, XP008076371 ISSN: 0300-9742 page 82, right-hand column, last paragraph - page 83, left-hand column, line 1; table 1 page 83, left-hand column, paragraph 2 page 85, right-hand column, last paragraph -----	1-61, 65-98, 101-112
X	WO 2005/060999 A (GENENTECH INC [US]; BRUNETTA PAUL G [US]) 7 July 2005 (2005-07-07) page 12, line 19 - page 14, column 1, line 14; claims 1-7 example 1 -----	1-112
X	GENENTECH: "Phase III Study Shows Rituxan Significantly Improves Symptoms in Patients with Rheumatoid Arthritis Who Inadequately Responded to Anti-TNF Therapies" GENENTECH PRESS RELEASE, [Online] 5 April 2005 (2005-04-05), pages 1-2, XP002425321 Internet Retrieved from the Internet: URL: http://www.gene.com/gene/news/press-releases/display.do?method=print&id=8267 [retrieved on 2007-03-12] the whole document -----	1-61, 65-98, 101-112
X	US 2004/202658 A1 (BENYUNES MARK C [US]) 14 October 2004 (2004-10-14) claim 12; example 1 ----- -/--	1-112

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/044290

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/67796 A (GENENTECH INC [US]; IDEC PHARMACEUTICALS INC [US]) 16 November 2000 (2000-11-16) example 1	1-61, 65-98, 101-112
X	EDWARDS: "Efficacy and Safety of Rituximab, a B-Cell Targeted Chimeric Monoclonal Antibody: A Randomized, Placebo-Controlled Trial in Patients with Rheumatoid Arthritis" ARTHRITIS & RHEUMATISM, [Online] vol. 46, no. 9suppl, 25 October 2002 (2002-10-25), - 29 October 2002 (2002-10-29) XP002425322 USA abstract 446 Retrieved from the Internet: URL: http://www.hopkins-arthritis.com.jhmi.edu/edu/acr2002/ra-treatments.html#rituximab [retrieved on 2007-03-09] abstract	1-61, 65-98, 101-112
X	EMERY: "PRIMARY ANALYSIS OF A DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED, DOSE-RANGING TRIAL OF RITUXIMAB, AN ANTI-CD20 MONOCLONAL ANTIBODY, IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS RECEIVING METHOTREXATE (DANCER TRIAL)" ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, [Online] vol. 64, no. suppl3, June 2005 (2005-06), pages 1-2, XP002425323 oral presentation Retrieved from the Internet: URL: http://eular.bmj.com/cgi/content/abstract/ardmtg;64/Suppl_3/182?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=1&author1=emery&andorexacttitle=and&andorexacttitleabs=and&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDE X=20&sortspec=relevance&volume=64&resource type=HWCIT,HWELTR [retrieved on 2009] the whole document	1-61, 65-98, 101-112
X	LEANDRO M J ET AL: "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, LONDON, GB, vol. 61, no. 10, October 2002 (2002-10), pages 883-888, XP002348932 ISSN: 0003-4967 page 884; tables 1,2	1-61, 65-98, 101-112
	-/--	

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 3 of 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/044290

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE VITA SALVATORE ET AL: "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 46, no. 8, August 2002 (2002-08), pages 2029-2033, XP002306249 ISSN: 0004-3591 page 2032, left-hand column, last paragraph; tables 1,2	1-112
X	MOORE J ET AL: "A phase II study of Rituximab in rheumatoid arthritis patients with recurrent disease following haematopoietic stem cell transplantation." BONE MARROW TRANSPLANTATION AUG 2004, vol. 34, no. 3, August 2004 (2004-08), pages 241-247, XP002425324 ISSN: 0268-3369 page 242, left-hand column, paragraph 2 page 245, right-hand column, paragraph 2 - page 246, left-hand column, last paragraph	1-61, 65-98, 101-112
X	GOTTENBERG J-E ET AL: "Tolerance and short term efficacy of rituximab in 43 patients with systemic autoimmune diseases." ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES JUN 2005, vol. 64, no. 6, June 2005 (2005-06), pages 913-920, XP002425325 ISSN: 0003-4967 page 916, left-hand column, paragraph 5; table 1	1-61, 65-98, 101-112
X	ANONYMOUS: "MabThera highly effective in treating rheumatoid arthritis" NEWS-MEDICAL.NET, [Online] 9 June 2005 (2005-06-09), pages 1-2, XP002425326 Retrieved from the Internet: URL:http://www.news-medical.net/print_article.asp?id=10840> [retrieved on 2007-03-09] the whole document	1-61, 65-98, 101-112

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/044290

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HIGASHIDA: "Safety and Efficacy of Rituximab in the Treatment of Refractory Rheumatoid Arthritis. Session Type: Poster Session 139-I" BLOOD, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), page 1, XP002425327 USA abstract	1-61, 65-98, 101-112
X	WO 2004/056312 A (GENENTECH INC [US]; ADAMS CAMELLIA W [US]; CHAN ANDREW C [US]; CROWLEY) 8 July 2004 (2004-07-08) examples 3,6,16; sequences 21, 22	1-61, 65-98, 101-112
X	WO 2004/091657 A (GENENTECH INC [US]; BENYUNES MARK [US]) 28 October 2004 (2004-10-28) example 1; sequences 1-4	1-112
X	ANONYMOUS, NCT00077870: "A Safety Study of Escalating Doses of PRO70769 for Subjects With Moderate to Severe Rheumatoid Arthritis Receiving Stable Doses of Concomitant Methotrexate" CLINICALTRIALS.GOV, [Online] 12 February 2004 (2004-02-12), - 12 August 2005 (2005-08-12) pages 1-3, XP002425328 internet Retrieved from the Internet: URL: http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00077870;jsessionid=CDF4C4B9EF58B79A0FEED8ACAAB7AC4F?order=21 [retrieved on 2007-03-19] page 1, paragraph	1-61, 65-98, 101-112
A	EDWARDS J C W ET AL: "B LYMPHOCYTE DEPLETION THERAPY WITH RITUXIMAB IN RHEUMATOID ARTHRITIS" RHEUMATIC DISEASES CLINICS OF NORTH AMERICA, W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 30, no. 2, 2004, pages 393-403, XP008076293 ISSN: 0889-857X page 398, paragraph 3 page 396, paragraph 4 - page 397, paragraph 4	1-112
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/044290

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GENENTECH: "Biogen Idec and Genentech Announce FDA Acceptance of Supplemental Biologics License Application and Priority Review Designation for Rituxan in Rheumatoid Arthritis" INTERNET ARTICLE, [Online] 31 October 2005 (2005-10-31), pages 1-2, XP002425329 USA Retrieved from the Internet: URL: http://www.gene.com/gene/news/press-releases/display.do?method=detail&id=9047 [retrieved on 2007-03-09] page 1, paragraph 1-7	1-61, 65-98, 101-112
P,X	HIBBLE: "Rehaumatoid arthritis - MabThera provides lasting benefits" MEDICAL NEWS TODAY, [Online] 21 November 2005 (2005-11-21), pages 1-2, XP002425335 Retrieved from the Internet: URL: http://www.medicalnewstoday.com/medicalnews.php?newsid=33811 [retrieved on 2007-03-09] the whole document	1-61, 65-98, 101-112
A	EDWARDS J C W ET AL: "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders" BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, COLCHESTER, ESSEX, GB, vol. 30, no. 4, August 2002 (2002-08), pages 824-828, XP002306250 ISSN: 0300-5127 page 826, right-hand column, paragraph 4 - page 827, paragraph 3; table 1	
A	FIELDS: "Rituximab in the treatment of rheumatoid arthritis, systemic lupus, and other autoimmune diseases: past, present, and future Special Report" HOSPITAL OF SPECIAL SURGERY, [Online] 25 October 2002 (2002-10-25), pages 1-9, XP002425336 Retrieved from the Internet: URL: http://www.hss.edu/professional-conditions_13466.asp?refName=Autoimmune+Diseases > [retrieved on 2007-03-09]	
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/044290

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BATHON: "Rheumatoid arthritis treatments" THE JOHN HOPKINS ARTHRITIS CENTER, 2005 AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY, [Online] - 17 November 2005 (2005-11-17) pages 1-12, XP002425337 USA Retrieved from the Internet: URL: http://www.hopkins-arthritis.com.jhmi.edu/edu/acr2005/ra-treatments.html> [retrieved on 2007-03-09] paragraphs [ABS.1830], [1917], [1922]	1-112

Form PCT/ISA/E210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 7 of 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/044290

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-64, 67-100, 104-112 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/US2006/044290

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0222212	A2	21-03-2002	CA 2422076 A1	21-03-2002
			CN 1592645 A	09-03-2005
			JP 2004508420 T	18-03-2004
			MX PA03002262 A	15-10-2003
			NO 20031218 A	19-05-2003
WO 2005060999	A	07-07-2005	AU 2004305560 A1	07-07-2005
			BR PI0417105 A	06-02-2007
			CA 2549122 A1	07-07-2005
			CN 1917901 A	21-02-2007
			EP 1696955 A2	06-09-2006
			KR 20060109494 A	20-10-2006
			MX PA06006864 A	23-08-2006
US 2004202658	A1	14-10-2004	US 2006240008 A1	26-10-2006
WO 0067796	A	16-11-2000	AT 311199 T	15-12-2005
			AU 777970 B2	04-11-2004
			AU 4714300 A	21-11-2000
			AU 2005200462 A1	03-03-2005
			BR 0011197 A	19-02-2002
			CA 2372603 A1	16-11-2000
			CN 1378459 A	06-11-2002
			DE 60024436 D1	05-01-2006
			DE 60024436 T2	17-08-2006
			DK 1176981 T3	10-04-2006
			EP 1176981 A1	06-02-2002
			EP 1637160 A2	22-03-2006
			ES 2254174 T3	16-06-2006
			HK 1043312 A1	28-07-2006
			HU 0201009 A2	29-07-2002
			JP 2002544174 T	24-12-2002
			MX PA01011279 A	02-07-2002
			NO 20015417 A	07-01-2002
			NZ 514914 A	24-09-2004
			PL 351962 A1	14-07-2003
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
			JP 2006517399 T	27-07-2006
			KR 20050086913 A	30-08-2005
			MA 27704 A1	02-01-2006
			MX PA05006511 A	17-02-2006
			US 2006024300 A1	02-02-2006
WO 2004091657	A	28-10-2004	AU 2004229376 A1	28-10-2004
			BR PI0409534 A	18-04-2006
			CA 2519870 A1	28-10-2004
			CN 1802176 A	12-07-2006
			EP 1613350 A2	11-01-2006
			HR 20050940 A2	31-12-2005
			JP 2006522811 T	05-10-2006
			KR 20050114273 A	05-12-2005
			MA 27838 A1	03-04-2006
			MX PA05010778 A	12-12-2005

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
24 de Mayo de 2007 (24.05.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/059188 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(74) Agentes: DREGER, Ginger, R.; HELLER EHRMAN LLP,
275 MIDDLEFIELD ROAD, Menlo Park, CA 94025-3506
(US).

(21) Número de Solicitud Internacional:

PCT/US2006/044290

(22) Fecha de Registro Internacional:

14 de Noviembre de 2006
(14.11.2006)

(25) Idioma de registro:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(30) Información de Prioridad:

60/737,291 15 de Noviembre de 2005 (15.11.2005) US
60/864,463 6 de Noviembre de 2006 (06.11.2006) US

(71) Solicitante (Para todos los estados designados excepto US): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH). BIOGEN IDEC INC. [US/US]; 14 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142 (US) (All Except US). GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventor; e

(75) Inventor/solicitante: (para US solamente): TOTORITIS, Mark [US/US]; 15797 Caminito Cantaras, Del Mar, CA 92014 (US). SHAW, Timothy, Mark [GB/GB]; 3 Brackenhill, Berkhamsted, Hertfordshire (GB). AGARWAL, Sunil [US/US]; 4 Wildflower Court, Corte Madera, CA 94925 (US). YOCUM, David [US/US]; 1149 Shoreline Drive, San Mateo, CA 94404 (US). KELMAN, Ariella [US/US]; 1732 Jackson Street, #204, South San Francisco, CA 94109 (US).

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra forma, para toda clase de protección nacional requerida): 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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra forma, para toda clase de protección regional requerida): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (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, 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).

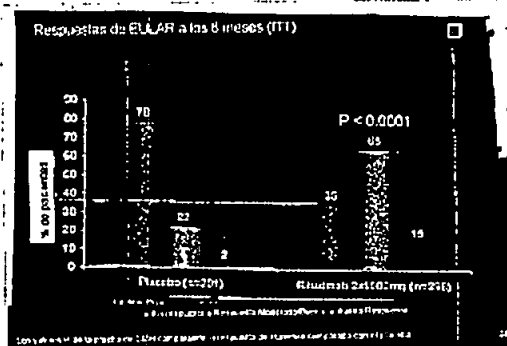
Publicado:

— con reporte de Búsqueda Internacional

— antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: MÉTODO PARA TRATAR DAÑOS EN LAS ARTICULACIONES



(57) Resumen: Se proporcionan unos métodos para tratar daños en las articulaciones en un sujeto elegible para el tratamiento, que involucran administrar un antagonista que se une a un marcador de superficie de célula B, tal como el anticuerpo CD20, al sujeto en una cantidad efectiva para retardar la progresión del daño en la articulación, según lo medido por radiografía. Se proporcionan adicionalmente unos artículos de elaboración útiles para tales métodos

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 May 2007 (24.05.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/059188 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2006/044290

(22) International Filing Date:

14 November 2006 (14.11.2006)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/737,291 15 November 2005 (15.11.2005) US
60/864,463 6 November 2006 (06.11.2006) US

(71) Applicants (for all designated States except US): F. HOFFMAN - LA ROCHE AG (CH/CH); Grenzacherstrasse 124, CH-4002 Basel (CH). BIOGEN IDEC INC. (US/US); 14 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142 (US). GENENTECH, INC. (US/US); 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US)

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): TUTORITIS, Mark (US/US); 15797 Camino Cantarus, Del Mar, CA

92014 (US). SHAW, Timothy, Mark (GB/GB); 3 Brackenhill, Berkhamsted, Hertfordshire (GB). AGARWAL, Sunil (US/US); 4 Wildflower Court, Corte Madera, CA 94925 (US). YOCUM, David (US/US); 1149 Shoreline Drive, San Mateo, CA 94404 (US). KELMAN, Ariella (US/US); 1732 Jackson Street, #204, South San Francisco, CA 94109 (US).

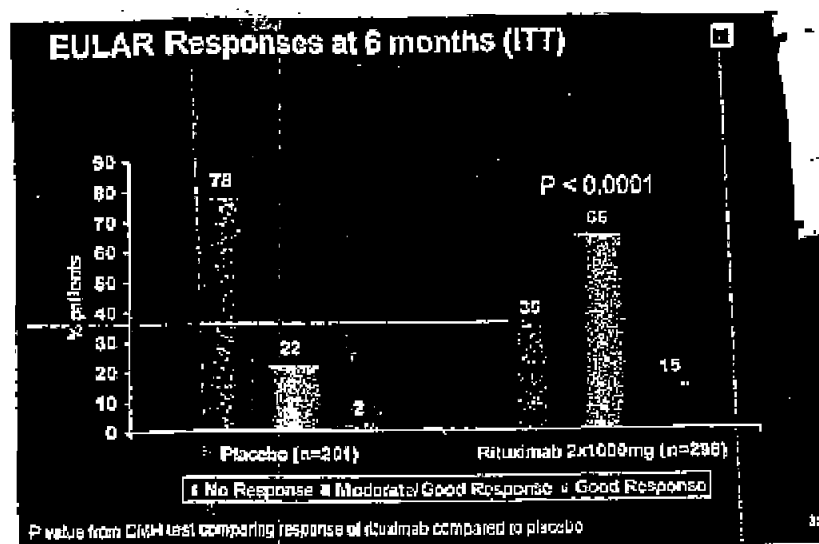
(74) Agents: DRÖGER, Ginger, R. et al.; KELLER EHRMAN LLP, 275 MIDDLEFIELD ROAD, Menlo Park, CA 94025-3506 (US).

(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, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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,

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR TREATING JOINT DAMAGE



(57) Abstract: Methods of treating joint damage in a subject eligible for treatment are provided involving administering an antagonist that binds to a B-cell surface marker, such as CD20 antibody, to the subject in an amount effective to slow progression of the joint damage as measured by radiography. Further provided are articles of manufacture useful for such methods.

WO 2007/059188 A1

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para:		PCT	
ver forma PCT/ISA/220		OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis.1)	
		Fecha de envío por correo (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda página)	
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220		PARA FUTURAS ACCIONES Ver el párrafo 2 a continuación	
Solicitud Internacional No. PCT/US2006/044290	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 14.11.2006	Fecha de prioridad (día/mes/año) 15.11.2005	
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC INV. A61K39/395 A61P19/02 A61K31/00 ADD. C07K16/28			
Solicitante F. HOFFMAN-LA ROCHE AG			
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: ☒ Casilla No. I Bases del Reporte ☒ Casilla No. II Prioridad ☒ Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial. ☐ Casilla No. IV Falta de unidad de invención ☒ Casilla No. V Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación. ☐ Casilla No. VI Ciertos documentos citados ☒ Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional ☐ Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional 2. ACCIONES FUTURAS Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad Examinadora Preliminar. Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde. Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220 3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220			
Nombre y dirección de correo de 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		Fecha de la terminación de esta opinión ver forma PCT/ISA/220	Funcionario Autorizado Siaterli, Maria Teléfono No. +31 70 340-8922

Forma (PCT/ISA/237) (portada) (Abril de 2005)

Casilla No. I. Bases de la opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión ha sido establecida con base en:
 - ☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó
 - ☐ una traducción de la solicitud internacional en , la cual es el idioma de una traducción proporcionada para los propósitos de búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b)).
2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:
 - a. tipo de material:
 - ☒ un listado de secuencia
 - ☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia
 - b. formato de material:
 - ☒ en formato escrito
 - ☒ en formato legible por computador
 - c. tiempo de presentación/suministro:
 - ☒ contenido en la solicitud internacional según se registró
 - ☒ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador
 - ☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda.
3. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.
4. Comentarios adicionales:

Casilla No. II Prioridad

1. ☒ No se ha considerado la validez de la reivindicación de la prioridad porque la Autoridad de Búsqueda Internacional no tiene una copia de la solicitud anterior cuya prioridad se ha reivindicado o, cuando sea necesario, una traducción de esa solicitud anterior. Sin embargo, esta opinión se ha establecido con base en el hecho de que la fecha relevante (Reglas 43bis.1 y 64.1). es la fecha de la prioridad reivindicada.
2. ☐ Esta opinión se ha establecido como si ninguna prioridad se hubiese reivindicado debido al hecho de que se ha encontrado que la reivindicación de la prioridad no es válida (Reglas 43bis.1 y 64.1).. Por consiguiente, para los propósitos de esta opinión, se considera que la fecha de la presentación internacional indicada anteriormente es la fecha relevante.
3. Observaciones adicionales, si es necesario:

OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/044290

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un paso inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 1-64, 67-100, 104-112

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 1-64, 67-100, 104-112 con respecto a la aplicabilidad industrial relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):

ver hoja separada

- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de dichas reivindicaciones Nos. son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*):
Por favor ver hoja a continuación
- ☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. _____ son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa.
- ☐ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos.
- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin el listado de secuencia; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no:
- ☐ suministró un listado de secuencias en papel para cumplir con el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicho listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
 - ☐ suministró un listado de secuencias en formato electrónico para cumplir en el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas y tal listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
 - ☐ pagó la tarifa de suministro tardío para el suministro de un listado de secuencia en respuesta a una invitación de acuerdo con las Reglas 13ter.1(a) o (b).
- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con los listados de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no suministró dichas tablas en formato electrónico para cumplir con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas y dichas tablas no estuvieron disponibles para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
- ☐ las tablas relacionadas con el nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida, si están en formato legible por computador únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Ver la hoja separada para más detalles.

Casilla No. V Afirmación razonada bajo el Artículo 43bis.1 (a) (i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Si: Reivindicaciones	<u>15-17, 22, 71-73, 85-87, 98-100, 110-112</u>
	No: Reivindicaciones	<u>1-14, 18-21, 23-70, 74-84, 88-97, 101-109</u>
Nivel inventivo (IS)	Si: Reivindicaciones	
	No: Reivindicaciones	<u>1-112</u>
Aplicabilidad industrial (IA)	Si: Reivindicaciones	<u>65-66, 101-103</u>
	No: Reivindicaciones	

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

Casilla No. VII Algunas defectos en la solicitud internacional

Los siguientes defectos en la forma o contenido de la solicitud internacional han sido anotados:

ver hoja separada

Re Item III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

- 1 Las reivindicaciones 1-61, 67-100, 104-112 se relacionan con la materia objeto que esta Autoridad considera que está cubierta por la disposición de la Regla 67.1(iv) PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(i) PCT).

Re Item V Afirmación razonada respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

- 2 Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: Prothereo et al: "Remisión de Artropatía Inflamatoria en Asociación con Terapia de Anti-CD20 para el Linfoma No de Hodgkins" *Rheumatology*, vol. 38, no. 11, 1999-11, páginas 1150-1152, XP000942661.

D2: WO02/22212

D3: Edwards et al: "Mejora sostenida en artritis reumatoidea después de un protocolo diseñado para reducir Linfocitos B" *Rheumatology*, vol. 40, no. 2, 2001-02, 2001-02, páginas 205-211, XP002348931.

D4: Kneitz et al: "Mejora de la artritis reumatoidea refractaria después de la reducción de células B" *Scandinavian Journal of Rheumatology*, vol. 33, no. 2, 2004, páginas 82-86, XP008076371.

D5: WO200506060999

D6: Genentech: "El Estudio de la Fase III Muestra que el Rituxan Mejora Significativamente los Síntomas en Pacientes con Artritis Rematoidea Que Respondieron Inadecuadamente a Terapias Anti-TNF" *Genentech Press-Release*, 2005-04-05, páginas 1-2, XP002425321.

D7: US2004/0202658

D8: Leandro et al: "Resultado clínico en 22 pacientes con artritis reumatoidea tratados con reducción de Linfocitos B" *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 61, no. 10, 2002-10, páginas 883-888, XP002348932.

D9: De Vita et al: "Eficacia del bloqueo de células B selectivas en el tratamiento de la artritis reumatoidea: evidencia para un papel patogénico de las células B" *Arthritis and Rheumatism*, vol. 46, no. 8, 2002-08, 2029-08, páginas 2029-2033, XP002306249.

D10: Moore et al: "Un estudio de la fase II de Rituximab en pacientes con artritis reumatoidea con enfermedad recurrente después del trasplante de células madre hematopoyéticas". *Bone Marrow Transplantation*, vol. 34, no. 3, 2004-08, páginas 241-247, XP002425324.

D11: Gottenberg et al: "Tolerancia y eficacia a corto plazo de rituximab en 43 pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas" *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 64, no. 6,

2, XP002425326.

D13: Higashida: "Seguridad y Eficacia del Rituximab en el Tratamiento de Artritis Reumatoidea Refractaria, Tipo de Sesión: Sesión de Afiches 139-I" BLOOD, vol. 102, no. 11, 2003-11-16, página 1, XP002425327.

D14: WO2004056312

D15: WO2004091657

3 NOVEDAD

- 3.1 Las reivindicaciones 1-61, 67-98, 104-112 se refieren a un método para tratar daño articular que comprende evaluación radiográfica del tratamiento. Sin embargo, el método de evaluación de una terapia por radiografía en cierto momento no es una característica técnica del método de tratamiento. Por lo tanto, no puede tenerse en cuenta para establecer la novedad y nivel inventivo de dicho método de tratamiento. Lo mismo aplica para las reivindicaciones 62-64, 99-100, que se refieren a un método de evaluación radiográfica de un daño articular que comprende un método para tratar daño articular.
- 3.2 El documento D1 revela el uso de 700mg de Rituximab (MabThera) en infusiones semanales para tratar daño articular (artropatía) en un paciente que sufre también del linfoma no de Hodgkins. El paciente también tomó diclofenaco brevemente en el momento de la terapia de anticuerpos (Historia del caso) pero no agentes anti-reumáticos. El pie y las radiografías mostraron erosiones tempranas de la articulación metatarsal y un estiloides ulnar. No se revela el tiempo de la radiografía. Por lo tanto, D1 destruye la novedad de las reivindicaciones 1-13, 18, 19, 21, 23, 26, 29, 32, 33, 35, 37-44, 47-51, 53, 54, 58, 65-69, 74-76, 78-80, 84, 88, 91-94, 96, 101-102.
- 3.3 D2 revela (ejemplo 1, reivindicación 34) tratamiento de pacientes con diagnóstico clínico de artritis reumatoidea (RA) con Rituximab (RITUXAN). Los pacientes son además opcionalmente tratados con uno o más agentes empleados para tratar RA tal como salicilato; NSAIDs tal como indometacina, fenilbutazona, derivados del ácido fenilacético (v.g. ibuprofeno y fenoprofeno), ácidos acéticos naftalenos (naproxeno), ácido pirrolealcanólico, ácidos indoleacéticos, ácido antranílico halogenado, piroxicam, zomepirac, diflunisal; cloroquina; sales doradas, penicilamina; o agentes inmunosupresivos tales como metotrexato o corticosteroides en dosis conocidas para dichas drogas o dosis reducidas. Rituximab es administrado por vía intravenosa de conformidad con cualquiera de los siguientes horarios de dosis: (A) 50mg/m² IV día 1, 150mg/m² IV en los días 8, 15 & 22, (B) 150mg/m² IV día 1, 375/m² IV los días 8, 15 & 22, (C) 375 mg/m² IV los días 1, 8, 15 & 22. Por lo tanto, D2

destruye la novedad de las reivindicaciones 1-13, 18-21, 23, 26, 28, 29, 32, 33, 35-51, 65-69, 74-80, 82-84, 88-97, 101.

- 3.4 D3 revela un tratamiento de cinco pacientes con RA no controlada adecuadamente con medicación previa (tabla 1). Rituximab fue administrado como cuatro iv infusiones en los días 2, 8, 15 y 22 de 300, 600, 600 y 600mg respectivamente. Prednisolono oral fue también administrado en los días 1-22 y 750mg de ciclofosfamida en los días 4 y 17 (página 206, columna de la derecha, § 2). Los pacientes fueron evaluados al comienzo del tratamiento, a los 3 meses y luego mensualmente. El tratamiento mejoró la condición de los pacientes (Tabla 2) y todos los pacientes redujeron el consumo de analgésicos (página 207, columna de la izquierda, § 2-4). Por lo tanto, D3 destruye la novedad de las reivindicaciones 1-13, 18-21, 23, 26, 29, 32, 33, 35-36, 38-41, 43-50, 53, 65-69, 74-80, 82-84, 88-93, 96, 97, 101-102.
- 3.5 D4 revela un tratamiento de cinco pacientes con RA refractaria a terapia convencional incluyendo bloqueadores TNF-alfa (TNFa) (página 82, columna de la derecha § última a la página 83, columna de la izquierda, § 1, Tabla 1). El tratamiento con corticosteroides o NSAIDs fue permitido durante el estudio. Los pacientes recibieron 375mg/m² de Rituximab cuatro iv infusiones semanalmente y metotrexato. Se permitieron glucocorticoides al inicio del estudio (página 83, columna de la izquierda, § 2). Los pacientes fueron observados durante al menos 44 semanas. Los resultados demostraron ser efectivos que el Rituximab es seguro y eficaz para pacientes con RA resistentes a una variedad de tratamientos incluyendo bloqueo TNF (página 85, columna de la derecha, § último). Por lo tanto, D4 destruye la novedad de las reivindicaciones 1-13, 18-21, 23, 26, 28, 29, 32, 33, 35-45, 47-51, 53-60, 65-69, 74-75, 77-80, 82-84, 88-97, 101-108.
- 3.6 D5 revela un tratamiento de RA con Rituximab o 2H7 humanizado (página 12, línea 19-página 14, línea 14, SEQ ID No. 1 & 2) usando un régimen de dosis seleccionado de cuatro administraciones semanales de 375mg/m², dos administraciones de 100mg en los días 1 y 15 o 1g tres veces. Los pacientes también pueden recibir metotrexato (10-25mg/semana) junto con un corticosteroide (metilprednisolono). Se lleva a cabo la evaluación con respuesta ACR20 en la semana 24 incluyendo puntaje radiográfico Sharp (ejemplo 1, reivindicaciones 1-7). Por lo tanto, D5 destruye la novedad de las reivindicaciones 1-14, 18-21, 26-29, 32-44, 48-51, 62-64, 65-70, 74-76, 78-84, 88-94, 97, 101-103.
- 3.7 DD6 revela el estudio REFLEX que comprende el tratamiento de pacientes con RA activa quienes han tenido una respuesta inadecuada o fueron intolerantes a un tratamiento previo con una o más terapias anti-TNF. Los pacientes recibieron Rituximab de 1000mg por vía intravenosa en los días 1 y 15, metotrexato y un curso de dos semanas de corticosteroides. La evaluación se llevó a cabo usando ACR20 en la semana 24. Por lo tanto, anticipa la materia objeto de las reivindicaciones 1-

13, 18-21, 23, 26, 28, 29, 32, 32-44, 48-51, 59-61, 65-69, 74-84, 88-97, 101-108.

- 3.8 D7 revela (ejemplo 1) el tratamiento de pacientes con RA activa quienes han tenido una respuesta inadecuada a una terapia TNF (etanercept, infliximab y/o adalimumab) con un anticuerpo anti-CD20. La evidencia radiográfica de al menos una erosión articular atribuible a RA. Se usa Rituximab o 2H7v16, 1000mg iv en los días 10 y 15 o 375mg/m² iv semanalmente por 4 semanas. La terapia de metotrexato concomitante (25mg/semanal) y el corticosteroide que comprende metilprednisolono. La evaluación con ACR20 y puntaje radiográfico Sharp en la semana 24. Por lo tanto, D7 destruye la novedad de las reivindicaciones 1-14, 18-20, 23, 26, 28-29, 32-42, 48-51, 59-70, 74-84, 88-94, 97, 101-109.
- 3.9 D8 revela el tratamiento de 22 pacientes que tienen RA activa quienes han tenido una respuesta inadecuada a las drogas anti-reumáticas que modifican la enfermedad estándar (DMARDs) con varias combinaciones de Rituximab, ciclofosfámid y prednisolono (Tabla 1). Dos pacientes tuvieron un factor negativo reumatoide (tabla 1, pacientes 8 & 20). Todos los pacientes usaron NSAID o analgésicos según fue necesario. Los pacientes (pacientes 2, 6, 7, 10, 12) fueron tratados después de la recaída o si falló un protocolo reducido (Tabla 2). Por lo tanto, destruye la novedad de las reivindicaciones 1-13, 18-21, 23, 25, 28-40, 47-50, 52-53, 65-69, 74-84, 88-93, 95-97, 101-102.
- 3.10 D9 revela el tratamiento de pacientes que tienen RA activa y la respuesta inadecuada a la terapia inmunosupresiva incluyendo anti-TNFα (tabla 1). La terapia de Rituximab comprendió infusiones intravenosas durante 4 semanas de 375mg/m² de Rituximab con esteroides de dosis baja o NSAIDs (Tabla 1). La evaluación incluyó radiografías (página 2032, columna izquierda, § último). Por lo tanto, destruye la novedad de las reivindicaciones 1-13, 18-21, 23, 26, 28-29, 32-33, 35-43, 47-50, 52-55, 58-59, 65-69, 74-80, 82-84, 88-93, 95-97, 101-102, 104-108.
- 3.11 D10 revela el tratamiento de pacientes (RF positivo y negativo) que tienen RA activa quienes han tenido trasplante de células madre hematopoyéticas con 2x1g iv Rituximab con 2 semanas de diferencia (página 242, columna de la izquierda § 2). Los pacientes permanecieron con medicación de prednisolono y DMARD. Por lo tanto, anticipa la materia objeto de las reivindicaciones 1-13, 18-21, 23, 27-41, 48-50, 52, 53, 65-69, 74-76, 78-84, 88-93, 95-97, 101, 102.
- 3.12 D11 revela el tratamiento de pacientes con RA con 4x375mg/m², 27x375mg/m² o 2x1000mg/m² de Rituximab solo o en combinación con metotrexato, metilprednisolono, ciclofosfámid y/o hidroxiquina (tabla 1). Por lo tanto, D11 anticipa la materia objeto de las reivindicaciones 1-13, 18-21, 23, 26, 28-43, 47-53, 59-61, 65-69, 74-78, 88-97, 101-108.

- 3.13 D12 revela el tratamiento de pacientes con RA con 2 dosis de Rituximab (MabThera) dada con 2 semanas de separación (prueba DANCER, página 1, § 2, 7) y tratamiento de pacientes con RA que no respondieron al tratamiento previo con terapia TNFa. Por lo tanto, destruye la novedad de las reivindicaciones 1-13, 18-21, 23-26, 28-61, 65-69, 74-84, 88-98, 101-108.
- 3.14 D13 revela el tratamiento de pacientes con RA refractaria a múltiples tratamientos previos incluyendo DMARD y agentes anti-TNF. Rituximab fue dado a una dosis total de 100mg durante 1 semana, seguido por 375mg/m² en la semana 2 y 500mg/m² en las semanas 3 y 4. Los pacientes continuaron con su terapia de línea de base (DMARD y/o esteroides). Por lo tanto, anticipa la materia objeto de las reivindicaciones 1-13, 18-21, 26, 28, 29, 32-41, 59, 65-69, 74-84, 88-93, 97, 101-102, 104-108.
- 3.15 D14 revela el anticuerpo humanizado 2H7.v16 (ejemplos 5 & 6) y su uso, dos infusiones iv en los días 1 y 15 para tratar artritis reumatoidea severa en combinación con metotrexato. Los pacientes recibieron 10-25 mg de metotrexato semanalmente durante al menos 12 semanas previas al estudio, prednisono oral y NSAIDs. El uso de dosis escaladas de 2H7.v16 de 10mg a 1g. Por lo tanto, anticipa la materia objeto de las reivindicaciones 1-14, 18-21, 23, 26, 28-29, 32-42, 48-51, 54-58, 65-70, 73-76, 78-84, 89-94, 97, 101-103.
- 3.16 D15 revela (ejemplo 1) terapia para pacientes con RA refractaria hasta terapia anti-TNF usando un anticuerpo anti-CD20 seleccionado de Rituximab o 2H7.16 humanizado. Los pacientes recibieron 100mg iv del anticuerpo anti-CD20 los días 1 y 15 o 375mg/m² iv semanalmente durante 4 semanas. También pueden recibir metotrexato (10-25mg/semana) y corticosteroides. Por lo tanto, D15 destruye la novedad de las reivindicaciones 1-14, 18-21, 23, 26, 28-29, 32-42, 48-51, 59-61, 65-70, 74-84, 89-94, 101-109.
- 3.17 A la luz de las reivindicaciones de la técnica anterior disponible 15-17, 22, 71-73, 85-87, 98-100, 110-112 son nuevas en el sentido del Artículo 33(2) PCT.

4 NIVEL INVENTIVO

- 4.1 Se considera que el documento D5 es la técnica anterior más cercana a la materia objeto de la reivindicación 15, y revela el tratamiento de RA con Rituximab o 2H7 humanizado (SEQ ID No. 1 & 2) usando un régimen de dosis seleccionado de cuatro administraciones semanales de 375mg/m², dos administraciones de 100mg en los días 1 y 15 o 1g 3 veces. Los pacientes también pueden recibir metotrexato (10-25mg/semanal) junto con metilprednisono. Alternativamente, cualquiera de los documentos D1-D15 revelan terapia de daño articular usando un anticuerpo anti-CD20 pueden considerarse como la técnica anterior más cercana.

-
- 4.2 La materia objeto de la reivindicación 15 difiere de D5 en que se usa un anticuerpo 2H7 humanizado con secuencia aminoácida diferente. No hay ningún efecto asociado con la diferencia.
- 4.3 El problema que hay que solucionar por medio de la presente invención puede por lo tanto considerarse como el suministro de un tratamiento alternativo para el daño articular usando otro anticuerpo 2H7 humanizado.
- 4.4 La solución propuesta en la reivindicación 15 de la presente solicitud no puede considerarse que comprende un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT) por las siguientes razones: el uso de un anticuerpo 2H7 humanizado alternativo es simplemente una de varias posibilidades claras obvias para la persona versada. El uso del anticuerpo de la reivindicación 15 sólo podría considerarse como inventivo, si presenta efectos o propiedades inesperadas en comparación con los anticuerpos anti-CD10 usados en la técnica anterior. Sin embargo, no se indican dichos efectos o propiedades en la solicitud. Por lo tanto, no está presente el nivel inventivo en la materia objeto de la reivindicación 15. Lo mismo aplica a las reivindicaciones 16-17, 71-73 y 110-112 que no cumplen con los requerimientos del Artículo 33(3) PCT.
- 4.5 Las reivindicaciones dependientes 22 & 98, relacionadas con la administración subcutánea del anticuerpo CD20, y las reivindicaciones 86-87 relacionadas con el cronograma de retratamiento caen dentro del conocimiento y habilidad de la persona versada y podrían considerarse únicamente como inventivas si se mostrara que un efecto inesperado está asociado con los métodos reivindicados. Por lo tanto, las reivindicaciones 22 & 98, 85-87 cumplen con el requerimiento del Artículo 33(3) PCT.
- 4.6 Las reivindicaciones 99-110 se relacionan con un método para monitorear el tratamiento del daño articular midiendo por radiografía después de al menos 52 semanas después del tratamiento y comparación frente a la línea de base antes del tratamiento. Difieren de D5 que revelan la evaluación con puntaje radiográfico Sharp llevado a cabo en la semana 24 incluyendo y más allá en que la radiografía se lleva a cabo después de al menos 52 semanas.
- 4.7 El problema que hay que resolver puede considerarse como el suministro de un tiempo alternativo para monitorear el tratamiento del daño articular por radiografía.
- 4.8 Puesto que no se muestra ningún efecto inesperado particular asociado con la evaluación después de al menos 52 semanas según se comparó con la técnica anterior (evaluación a las 24 semanas) se considera que la solución propuesta es una escogencia arbitraria que no requiere habilidades inventivas. Por las mismas razones, la reivindicación 100 no es inventiva.

5 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 1-61, 67-100, 104-112 sobre la pregunta de si son industrialmente aplicables, no existen criterios unificados en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como aplicable industrialmente la materia objeto de las reivindicaciones en cuanto al uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para primer uso en el tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

Re Item VI Ciertos documentos citados

Hibble: "Artritis Reumatoidea - MabThera proporciona beneficios duraderos" MEDICAL NEWS TODAY, [Online] 21 de noviembre de 2005 (2005-11-21), páginas 1-2, XP002425335.

Bathon: "Tratamientos para la artritis reumatoidea" The John Hopkins Arthritis Center, 2005 American College of Rheumatology, [Online] - 17 de noviembre de 2005 (2005-11-17) páginas 1-12, XP002425337.

- 6 La presente opinión se basa en el supuesto de que todas las reivindicaciones disfrutan una prioridad válida. Si el examen posterior de los documentos de prioridad revela que la reivindicación de prioridad no es válida, entonces los documentos Hibble (XP002425335, 21-11-2005) y Bathon et al. (American College of Rheumatology, 17-11-2005, Abstract 1830, 1917 & 1922) se consideraría como relevante.

7 Re Item VII Ciertos defectos en la solicitud internacional

- 7.1 Las reivindicaciones 65-66 & 101-103 contradicen los requerimientos de la Regla 6.3 PCT y los Lineamientos, CIII, 2.1. (Instrucciones para tratar" no son consideradas como características técnicas de la reivindicación de producto. Por consiguiente, dichas instrucciones no pueden ser usadas para establecer novedad y/o nivel inventivo sobre la técnica anterior.
- 7.2 En las reivindicaciones 28-31, 33-35, 78-81 se reivindica la dosis del anticuerpo anti-CD20. Sin embargo, no es claro si esta dosis se refiere a la cantidad total del anticuerpo administrado durante todo el tratamiento o por inyección/ciclo de terapia. Por lo tanto, las reivindicaciones 28-31, 33-35, 78-81 no cumplen con los requerimientos del Artículo 6 PCT.
- 7.3 Los términos "otra molécula" (reivindicación 27), "segundo medicamento (reivindicaciones 38, 39,

91, 92, 102), "un agente inmunosupresor" (reivindicación 40, 77) son vagos y confusos y dejan al lector en duda en cuanto al significado de las características técnicas a las que se refieren, por lo tanto haciendo que la definición de la materia objeto de dichas reivindicaciones sea confusa, Artículo 6 PCT.

Se informa que los trabajos citados de la literatura que no es d
patentes tal como documentos científicos o técnicos o semejantes
pueden estar sujetos a protección de propiedad intelectual y/o otra
protección de trabajos escritos según sea apropiado con base n las
leyes pertinentes. Los textos de propiedad intelectual no pueden ser
copiados o usados en otras publicaciones electrónicas o impresas o
redistribuidos sin el permiso expreso del propietario de la propiedad
intelectual.

XS CRPTENFRDE

BNSDPCOD: <XS____2006100103CF_1_>

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

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/US2006/044290	International filing date (day/month/year) 14.11.2006	Priority date (day/month/year) 15.11.2005
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. A61K39/395 A61P19/02 A61K31/00 ADD. C07K16/28		
Applicant F.HOFFMAN - LA ROCHE AG		

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. 5318 Patentlaan 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 Siaterli, Maria Telephone No. +31 70 340-8922 
--	--	---

Form (PCT/ISA/237) (Cover Sheet) (April 2005)

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2006/044290

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 43bis.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 43bis.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/US2006/044290

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. 1-64, 67-100, 104-112

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-64, 67-100, 104-112 with respect to industrial applicability 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

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2006/044290

**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	<u>15-17, 22, 71-73, 85-87, 98-100, 110-112</u>
	No: Claims	<u>1-14, 18-21, 23-70, 74-84, 88-97, 101-109</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-112</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>65-66, 101-103</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Re Item III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

- 1 Claims 1-61, 67-100, 104-112 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

- 2 Reference is made to the following documents:
- D1:** Prothero et al: "Remission of Inflammatory Arthropathy in Association with Anti-CD20 Therapy for Non-Hodgkin's Lymphoma" Rheumatology, vol. 38, no. 11, 1999-11, pages 1150-1152, XP000942661.
- D2:** WO02/22212.
- D3:** Edwards et al: "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B Lymphocytes" Rheumatology, vol. 40, no. 2, 2001-02, pages 205-211, XP002348931.
- D4:** Kneitz et al: "Improvement of refractory rheumatoid arthritis after depletion of B cells." Scandinavian Journal of Rheumatology, vol. 33, no. 2, 2004, pages 82-86, XP008076371.
- D5:** WO2005060999
- D6:** Genentech: "Phase III Study Shows Rituxan Significantly Improves Symptoms in Patients with Rheumatoid Arthritis Who Inadequately Responded to Anti-TNF Therapies" Genentech Press-Release, 2005-04-05, pages 1-2, XP002425321.
- D7:** US2004/0202658
- D8:** Leandro et al: "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 61, no. 10, 2002-10, pages 883-888, XP002348932.
- D9:** De Vita et al: "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells" Arthritis and Rheumatism, vol. 46, no. 8, 2002-08, pages 2029-2033, XP002306249.
- D10:** Moore et al: "A phase II study of Rituximab in rheumatoid arthritis patients with recurrent disease following haematopoietic stem cell transplantation." Bone Marrow Transplantation, vol. 34, no. 3, 2004-08, pages 241-247, XP002425324.
- D11:** Gottenberg et al: "Tolerance and short term efficacy of rituximab in 43 patients with systemic autoimmune diseases." Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 64, no. 6,

2005-06, pages 913-920, XP002425325.

D12: Anonymous: "MabThera highly effective in treating rheumatoid arthritis" News-medical.net, [Online] 9 June 2005 (2005-06-09), pages 1-2, XP002425326.

D13: Higashida: "Safety and Efficacy of Rituximab in the Treatment of Refractory Rheumatoid Arthritis. Session Type: Poster Session 139-I" BLOOD, vol. 102, no. 11, 2003-11-16, page 1, XP002425327.

D14: WO2004056312

D15: WO2004091657

3 NOVELTY

- 3.1 Claims 1-61, 67-98, 104-112 refer to a method of treating joint damage comprising radiographic evaluation of the treatment. However, the method of evaluation of a therapy by radiography at certain time point is not a technical feature of the method of treatment. Therefore it cannot be taken into account for establishing novelty and inventive step of said method of treatment. The same applies for claims 62-64, 99-100, which refer to a method of radiographic evaluation of a joint damage comprising a method of treating joint damage.
- 3.2 Document D1 discloses the use 700mg of Rituximab (MabThera) in weekly infusions to treat joint damage (arthropathy) in a patient suffering also from non-Hodgkin's lymphoma. The patient also took diclofenac briefly at the time of antibody therapy (Case history) but no anti-rheumatic agents. Foot and radiographs showed early erosions of metatarsophalangeal joint and one ulnar styloid. The time of the radiography is not disclosed. Thus, D1 destroys novelty of claims 1-13, 18, 19, 21, 23, 26, 29, 32, 33, 35, 37-44, 47-51, 53, 54, 58, 65-69, 74-76, 78-80, 84, 88, 91-94, 96, 101-102.
- 3.3 D2 discloses (example 1, claim 34) treatment of patients with clinical diagnosis of rheumatoid arthritis (RA) with Rituximab (RITUXAN). The patients are optionally further treated with any one or more agents employed for treating RA such as salicylate; NSAIDs such as indomethacin, phenylbutazone, phenylacetic acid derivatives (e. g. ibuprofen and fenoprofen), naphthalene acetic acids (naproxen), pyrrolealkanoic acid, indoleacetic acids, halogenated anthranilic acid, piroxicam, zomepirac, diflunisal; chloroquine; gold salts; penicillamine; or immunosuppressive agents such as methotrexate or corticosteroids in dosages known for such drugs or reduced dosages. Rituximab is administered intravenously according to any of the following dosing schedules: (A) 50mg/m² IV day 1, 150 mg/m² IV on days 8, 15 & 22, (B) 150mg/m² IV day 1, 375 mg/m² IV on days 8, 15 & 22, (C) 375 mg/m² IV days 1, 8, 15 & 22. Thus, D2

destroys novelty of claims 1-13, 18-21, 23, 26, 28, 29, 32, 33, 35-51, 65-69, 74-80, 82-84, 88-97, 101.

- 3.4 D3 discloses treatment of five patients with RA not adequately controlled with previous medication (table 1). Rituximab was administrated as four iv infusions on days 2, 8, 15 and 22 of 300, 600, 600 and 600mg respectively. Oral prednisolone was also administrated on days 1-22 and 750mg cyclophosphamide on days 4 and 17 (page 206, right-hand column, § 2). The patients were assessed at the begin of treatment, at 3 months and then monthly. The treatment improved patients condition (Table 2) and all patients reduced analgesic intake (page 207, left-hand column, § 2-4). Thus D3 destroys novelty of claims 1-13, 18-21, 23, 26, 29, 32, 33, 35-36, 38-41, 43-50, 53, 65-69, 74-80, 82-84, 88-93, 96, 97, 101-102.
- 3.5 D4 discloses treatment of five patients with RA refractory to conventional therapy including TNF-alpha (TNFa) blockers (page 82, right-hand column, § last to page 83, left-hand column, § 1, Table 1). Treatment with corticosteroids or NSAID's was allowed during the study. Patients received 375mg/m² Rituximab four iv infusions weekly and methotrexate. Glucocorticoids were allowed at the beginning of the study (page 83, left-hand column, § 2). Patients were observed for at least 44 weeks. The results provide effective that Rituximab is safe and efficacious for treating RA patients resistant to a variety of treatments including TNFa blockade (page 85, right-hand column, § last). Thus, D4 destroys novelty of claims 1-13, 18-21, 23, 26, 28, 29, 32, 33, 35-45, 47-51, 53-60, 65-69, 74-75, 77-80, 82-84, 88-97, 101-108.
- 3.6 D5 discloses treatment of RA with Rituximab or humanized 2H7 (page 12, line 19-page 14, line 14, SEQ ID No 1 & 2) using a dosing regimen selected from four weekly administrations of 375mg/m², two administrations of 100mg on days 1 and 15 or 1g three times. The patients may also receive methotrexate (10-25mg/week) together with a corticosteroid (methylprednisolone). Evaluation is performed with ACR20 response at week 24 including Sharp radiographic score (example 1, claims 1-7). Thus D5 destroys novelty of claims 1-14, 18-21, 26-29, 32-44, 48-51, 62-64, 65-70, 74-76, 78-84, 88-94, 97, 101-103.
- 3.7 D6 discloses the REFLEX study consisting in the treatment of patients with active RA who have had an inadequate response or were intolerant to prior treatment with one or more anti TNF therapies. The patients received 1000mg Rituximab intravenously on days 1 and 15, methotrexate and a two week course of corticosteroids. Evaluation was performed using ACR20 at week 24. Thus, it anticipates the subject-matter of claims 1-

13, 18-21, 23, 26, 28, 29, 32-44, 48-51, 59-61, 65-69, 74-84, 88-97, 101-108.

- 3.8 D7 discloses (example 1) the treatment of patients with active RA who have had an inadequate response to one or more anti TNF therapies (etanercept, infliximab and/or adalimumab) with an anti CD20 antibody. Radiographic evidence of at least one joint erosion attributable to RA. Rituximab or 2H7v16 are used, 1000mg iv on days 10 and 15 or 375mg/m² iv weekly for 4 weeks. Concomitant methotrexate therapy (25mg/week) and corticosteroid consisting in methylprednisolone. Evaluation with ACR20 and Sharp radiographic score at week 24. Thus, D7 destroys novelty of claims 1-14, 18-20, 23, 26, 28-29, 32-42, 48-51, 59-70, 74-84, 88-94, 97, 101-109.
- 3.9 D8 discloses the treatment of 22 patients having active RA who have had an inadequate response to standard disease modifying anti rheumatic drugs (DMARDs) with various combinations of Rituximab, cyclophosphamide and prednisolone (Table 1). Two patients were rheumatoid factor negative (table 1, patients 8 & 20). All patients used NSAID or analgesics as needed. Patients (patients number 2, 6, 7, 10, 12) were retreated either following relapse or if a reduced protocol failed (Table 2). Thus, it destroys novelty of claims 1-13, 18-21, 23, 25, 26, 28-40, 44, 47-50, 52-53, 65-69, 74-84, 88-93, 95-97, 101-102.
- 3.10 D9 discloses the treatment of patients having active RA and inadequate response to immunosuppressive therapy including anti TNFa (table 1). Rituximab therapy consisted in 4 weekly intravenous infusions of 375 mg/m² of Rituximab with low dose steroids or NSAIDs (Table 1). Evaluation included radiographs (page 2032, left-hand column, § last). Thus, it destroys novelty of claims 1-13, 18-21, 23, 26, 28-29, 32-33, 35-43, 47-50, 52-55, 58-59, 65-69, 74-80, 82-84, 88-93, 95-97, 101-102, 104-108.
- 3.11 D10 discloses the treatment of patients (RF positive and negative) having active RA who have had haematopoietic stem cell transplantation with 2x1g iv Rituximab 2 weeks apart (page 242, left-hand column, § 2). Patients remained on prednisolone and DMARD medication. Thus, it anticipates the subject-matter of claims 1-13, 18-21, 23, 27-41, 48-50, 52, 53, 65-69, 74-76, 78-84, 88-93, 95-97, 101, 102.
- 3.12 D11 discloses treatment of patients with RA with 4x375mg/m², 27x375mg/m² or 2x1000mg/m² Rituximab alone or in combination with methotrexate, methylprednisolone, cyclophosphamide and/or hydroxychloroquine (table 1). Thus, D11 anticipates the subject-matter of claims 1-13, 18-21, 23, 26, 28-43, 47-53, 59-61, 65-69, 74-84, 88-97, 101-108.

- 3.13 D12 discloses treatment of patients with RA with 2 doses of Rituximab (MabThera) given 2 weeks apart (DANCER trial, page 1, § 2, 7) and treatment of patients with RA which did not respond to prior treatment with anti TNF α therapy. Thus, it destroys novelty of claims 1-13, 18-21, 23-26, 28-61, 65-69, 74-84, 88-98, 101-108.
- 3.14 D13 discloses treatment of patients with RA refractory to multiple previous treatments including DMARD and anti TNF agents. Rituximab was given at a total dose of 100mg during week 1, followed by 375mg/m² at week 2 and 500mg/m² at weeks 3 and 4 patients continued their baseline therapy (DMARD and/or steroids). Thus it anticipates the subject-matter of claims 1-13, 18-21, 26, 28, 29, 32-41, 59, 65-69, 74-84, 88-93, 97, 101-102, 104-108.
- 3.15 D14 discloses the humanized antibody 2H7.v16 (examples 5 & 6) and its use, two iv infusions on days 1 and 15 to treat severe rheumatoid arthritis in combination with methotrexate. Patients received methotrexate 10-25mg weekly for at least 12 weeks prior the study, oral prednisone and NSAIDs. Use of escalating doses of 2H7.v16 from 10mg to 1g. Thus, it destroys novelty of claims 1-14, 18-21, 23, 26, 28-29, 32-42, 48-51, 54-58, 65-70, 73-76, 78-84, 89-94, 97, 101-103.
- 3.16 D15 discloses (example 1) therapy of patients with RA refractory to anti TNF therapy using an anti CD20 antibody selected from Rituximab or humanized 2H7.v16. Patients receive either 100mg iv of the anti CD20 antibody on days 1 and 15 or 375mg/m² iv weekly for 4 weeks. They may also receive methotrexate (10-25mg/week) and corticosteroids. Thus, D15 destroys novelty of claims 1-14, 18-21, 23, 26, 28-29, 32-42, 48-51, 59-61, 65-70, 74-84, 89-94, 97, 101-109.
- 3.17 In the light of the available prior art claims 15-17, 22, 71-73, 85-87, 98-100, 110-112 are new in the sense of Article 33(2) PCT.

4 INVENTIVE STEP

- 4.1 The document D5 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claim 15, and discloses treatment of RA with Rituximab or humanized 2H7 (SEQ ID No 1 & 2) using a dosing regimen selected from four weekly administrations of 375mg/m², two administrations of 100mg on days 1 and 15 or 1g 3 times. The patients may also receive methotrexate (10-25mg/week) together with methylprednisolone. Alternatively any of the documents D1-D15 disclosing therapy of joint damage using an anti CD20 antibody can

be considered as the closest prior art.

- 4.2 The subject-matter of claim 15 differs from D5 in that a humanized 2H7 antibody with different amino acid sequence is used. There is no effect associated with the difference.
- 4.3 The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of an alternative treatment of joint damage using another humanized 2H7 antibody.
- 4.4 The solution proposed in claim 15 of the present application cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons: the use of an alternative humanized 2H7 antibody is merely one of several straightforward possibilities obvious to the skilled person. The use of the antibody of claim 15 could only be regarded as inventive, if it presents unexpected effects or properties in comparison with the anti CD20 antibodies used in the prior art. However, no such effects or properties are indicated in the application. Hence, no inventive step is present in the subject-matter of claim 15. The same applies to claims 16-17, 71-73 and 110-112 which are not meeting the requirements of Article 33(3) PCT.
- 4.5 The dependent claims 22 & 98, relating to the subcutaneous administration of the anti CD20 antibody, and claims 86-87 relating to the retreatment schedule fall within the knowledge and ability of the skilled person and could only be considered as inventive if an unexpected effect was shown to be associated with the claimed methods. Thus, claims 22 & 98, 85-87 do not meet the requirement of Art. 33(3) PCT.
- 4.6 Claims 99-100 relate to a method of monitoring the treatment of joint damage by measuring by radiography after at least 52 weeks after treatment and comparison versus baseline obtained before treatment. They differ from D5 disclosing evaluation with Sharp radiographic score performed at week 24 including and beyond in that the radiography is performed after at least 52 weeks.
- 4.7 The problem to be solved can be considered as the provision of an alternative time for monitoring the treatment of joint damage by radiography.
- 4.8 Since not particular unexpected effect is shown to be associated with the evaluation after at least 52 weeks as compared with the prior art (evaluation at 24 weeks) the proposed solution is considered to be an arbitrary choice not requiring inventive skills. For the same reasons claim 100 is not inventive.

5 INDUSTRIAL APPLICABILITY

For the assessment of the present claims 1-61, 67-100, 104-112 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

Hibble: "Rehaumatoid arthritis - MabThera provides lasting benefits" MEDICAL NEWS TODAY, [Online] 21 November 2005 (2005-11-21), pages 1-2, XP002425335.

Bathon: "Rheumatoid arthritis treatments" The John Hopkins Arthritis Center, 2005 American College of Rheumatology, [Online] - 17 November 2005 (2005-11-17) pages 1-12, XP002425337.

- 6 Present opinion is based in the assumption that all claims enjoy a valid priority. Should later examination of the priority documents reveal that the priority claim is not valid, then documents Hibble (XP002425335, 21-112005) and Bathon et al. (American College of Rheumatology, 17-11-2005, Abstract 1830, 1917 & 1922) would be considered as relevant.

7 Re Item VII Certain defects in the international application

- 7.1 Claims 65-66 & 101-103 contravene the requirements of Rule 6.3 PCT and the Guidelines, CIII, 2.1. "instructions for treating" are not regarded as technical features of product claim. Consequently, said instructions cannot be used for establishing novelty and/or inventive step over the prior art.
- 7.2 In claims 28-31, 33-35, 78-81 the dose of the anti CD20 antibody is claimed. However it is unclear if this dose refers to the total amount of the antibody administrated during the entire treatment or per injection/cycle of therapy. Thus claims 28-31, 33-35, 78-81 do not meet the requirements of Article 6 PCT.
- 7.3 The terms "another molecule (claim 27)", "second medicament (claims 38, 39, 91,

92,102), "an immunosuppressive agent" (claim 40, 77) are vague and unclear and leave the reader in doubt as to the meaning of the technical features to which they refer, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear, Article 6 PCT.

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

XS CPRTENFRDE

BNSDOCID: <XS____2006100109CF_I_>

MÉTODO PARA TRATAR DAÑOS EN LAS ARTICULACIONES

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Se proporcionan unos métodos para tratar daños en las articulaciones en un sujeto elegible para el tratamiento, que involucran administrar un antagonista que se une a un marcador de superficie de célula B, tal como el anticuerpo CD20, al sujeto en una cantidad efectiva para retardar la progresión del daño en la articulación, según lo medido por radiografía. Se proporcionan adicionalmente unos artículos de elaboración útiles para tales métodos.

plazo de la RA es pobre, aproximadamente 50% de los pacientes experimentando una incapacidad funcional significativa en el lapso de 10 años a partir del momento del diagnóstico. Keystone, *Rheumatology*, 44 (Supl. 2): ii8-iii2 (2005). La expectativa de vida se reduce en un promedio de 3-10 años. Alamanos y Rosos, *supra*. Los pacientes con un alto título de factor reumatoide (RF por sus siglas en inglés) (aproximadamente 80% de los pacientes) tienen una enfermedad más agresiva (Bukhari y col., *Arthritis Rheum.* 46: 906-912 (2002)), con un peor resultado a largo plazo y mortalidad aumentada sobre aquéllos de RF negativo. Heliövaara y col., *Ann. Rheum. Dis.* 54: 811-814 (1995)).

La patogénesis de las enfermedades óseas inflamatorias crónicas, tales como RA, no está totalmente dilucidada. Tales enfermedades están acompañadas por pérdida de hueso alrededor de las articulaciones afectadas debido a una resorción osteoclástica incrementada. Este proceso es mediado ampliamente por una producción local incrementada de citocinas pro-inflamatorias. Teitelbaum, *Science*, 289: 1504-1508 (2000); Goldring y Gravallesse, *Arthritis Res.* 2(1): 33-37 (2000). Estas citocinas pueden actuar directamente sobre las células en el linaje de los osteoclastos o indirectamente afectando la producción del factor esencial de diferenciación de osteoclastos, activador de receptor de ligando NF κ B (RANKL), I y/o su receptor de señuelo soluble, osteoprotegerina (OPG), por células de osteoblastos/estromas. Hossbauer y col., *J. Bone Miner. Res.* 15(1): 2-12 (2000). TNF-alfa es un mediador mayor de la inflamación, cuya importancia en la patogénesis de varias formas de pérdida de hueso es soportada por diversas líneas de

evidencia experimental y clínica (Feldmann y col., *Cell* 85(3): 307-310 (1996)). Sin embargo, TNF-alfa no es esencial para la osteoclastogénesis (Douni y col., *J. Inflamm.* 47: 27-38 (1996)), la artritis erosiva (Campbell y col., *J. Clin. Invest.* 107(12): 1519-1527 (2001)) u osteólisis (Childs y col., *J. Bone Min. Res.* 16: 338-347 (2001)), ya que éstas pueden ocurrir en ausencia de TNF-alfa.

En RA, específicamente, se piensa que una respuesta inmune es iniciada/perpetuada por uno o varios antígenos que se presentan en el compartimiento sinovial, produciendo un influjo de células inflamatorias agudas y linfocitos a la articulación. Unas ondas sucesivas de inflamación conducen a la formación de un tejido invasivo y erosivo llamado pannus. Éste contiene macrófagos y sinoviocitos similares a fibroblastos proliferantes que producen citocinas pro-inflamatorias tales como el factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa) e interleucina-1 (IL-1). La liberación local de enzimas proteolíticas, varios mediadores inflamatorios y la activación de osteoclastos contribuyen a gran parte al daño al tejido. Hay una pérdida de cartílago articular y la formación de erosiones óseas. Los tendones y sacos circundantes pueden verse afectados por el proceso inflamatorio. Finalmente, la integridad de la estructura de la articulación es comprometida, produciendo incapacidad.

Las contribuciones precisas de las células B a la inmunopatogénesis de la RA no están totalmente caracterizadas. Sin embargo, hay varios mecanismos posibles mediante los cuales las células B pueden participar en el proceso de la enfermedad.

Silverman y Carson, *Arthritis Res. Ther.* 5, Supl. 4: S1-6 (2003).

Históricamente, se pensaba que las células B contribuían al proceso de la enfermedad en RA predominantemente sirviendo como los precursores de células de producción de autoanticuerpos. Varias especificidades de autoanticuerpos han sido identificadas, incluyendo anticuerpos al colágeno Tipo II, y proteoglicanos, así como factores reumatoides. La generación de grandes cantidades de anticuerpos conduce a la formación de complejos inmunes y la activación de la cascada de complemento. Esto, a su vez, amplifica la respuesta inmune y puede culminar en lisis celular local. La síntesis de RF incrementada y el consumo de complemento han sido correlacionados con la actividad de la enfermedad. La presencia de RF propiamente dicho es asociada con una forma más severa de RA y la presencia de características extra-articulares.

La evidencia reciente (Janeway y Katz, *J. Immunol.*, 138: 1051 (1998); Rivera y col., *Int. Immunol.*, 13: 1583-1593 (2001)) muestra que las células B son unas células presentadoras de antígenos (APC por sus siglas en inglés) sumamente eficientes. Las células B RF-positivas pueden ser unas APC particularmente potentes, ya que su inmunoglobulina superficial permitiría rápidamente la captura de cualesquiera complejos inmunes independientemente de los antígenos presentes dentro de los mismos. Muchos antígenos pueden ser así procesados para su presentación a las células T. Además, se ha sugerido recientemente que esto también puede permitir que las células B RF-positivas se auto-perpetúen. Edwards y col., *Immunology*, 97: 188-196 (1999).

Para la activación de las células T, dos señales necesitan ser entregadas a la célula; una a través del receptor de célula T (TCR por sus siglas en inglés), el cual reconoce al péptido procesado en la presencia de un antígeno de complejo de histocompatibilidad mayor (MHC por sus siglas en inglés), y una segunda a través de moléculas co-estimuladoras. Cuando son activadas, las células B expresan moléculas co-estimuladoras sobre su superficie y pueden así proporcionar la segunda señal para la activación de células T y la generación de células efectoras.

Las células B pueden promover su propia función así como aquélla de otras células produciendo citocinas. Harris y col., *Nat. Immunol.*, 1:475-482 (2000). TNF-alfa e IL-1, linfotoxina-alfa, IL-6 e IL-10 están entre aquéllas de las citocinas que las células B pueden producir en la sinovia de RA.

Aunque la activación de las células T es considerada como un componente clave en la patogénesis de RA, el trabajo reciente usando explantaciones de sinovia humana en ratones con trastornos de inmunodeficiencia combinada severa (SCID por sus siglas en inglés) ha demostrado que la activación de las células T y su retención dentro de la articulación es críticamente dependiente de la presencia de células B. Takemura y col., *J. Immunol.*, 167: 4710-4718 (2001). El papel preciso de las células B en esto no es claro, ya que otras APC no parecen tener el mismo efecto sobre las células T.

El daño estructural a las articulaciones es una consecuencia importante de la inflamación sinovial crónica. Entre 60% y 95% de los pacientes con artritis reumatoide (RA) desarrollan por lo menos una erosión radiográfica dentro de los

3-8 años desde el inicio de la enfermedad (Paulus y col., *J. Rheumatol.*, 23: 801-805 (1996); Hulsmans y col., *Arthritis Rheum.* 43: 1927-1940 (2000)). En la RA temprana, la correlación entre las calificaciones de daños radiográficos y la capacidad funcional es débil, pero después de 8 años de enfermedad, los coeficientes de correlación puede llegar a ser de hasta 0,68 (Scott y col., *Rheumatology*, 39: 122-132 (2000)). En 1.007 pacientes de edad inferior a 60 años que tenían RA por al menos cuatro años, Wolfe y col. (*Arthritis Rheum.* 43, Supl. 9: S403 (2000)) encontraron una asociación significativa entre la tasa de progresión de la calificación de daño radiográfico de Larsen (Larsen y col., *Acta Radiol. Diagn.* 18: 481-491 (1977)), el aumento de la condición de incapacidad en el seguro social, y la disminución del ingreso familiar.

La prevención o el retardo del daño radiográfico es una de las metas del tratamiento de RA (Edmonds y col., *Arthritis Rheum.* 36: 336-340 (1993)). Unos ensayos clínicos controlados de 6 a 12 meses de duración han documentado que la progresión de las calificaciones de daños radiográficos fue más rápida en el grupo de placebo que en los grupos que recibieron metotrexato (MTX) (Sharp y col., *Arthritis Rheum.* 43: 495-505 (2000)), leflunomida (Sharp y col., *supra*), sulfasalazina (SSZ) (Sharp y col., *supra*), prednisolona (Kirwan y col., *N. Engl. J. Med.*, 333: 142-146 (1995); Wassenburg y col., *Arthritis Rheum.* 42: Supl. 9: S243 (1999)), antagonista de receptor de interleucina-1 (Bresnihan y col., *Arthritis Rheum.*, 41: 2196-2204 (1998)), o una combinación de infliximab/MTX (Lipsky y col., *N. Eng. J. Med.*, 343: 1594-1604 (2000)), y que la progresión radiográfica después del tratamiento con etanercept

fue menos rápida que después del tratamiento con MTX (Bathon y col., *N. Engl. J. Med.*, 343: 1586-1593 (2000)). Otros estudios han calificado la progresión radiográfica en pacientes tratados con corticosteroides (Comité Conjunto del Concejo de Investigación Médica y la Fundación Nuffield, *Ann. Rheum. Dis.* 19: 331-337 (1960); Van Everdingen y col., *Ann. Intern. Med.*, 136: 1-12 (2002)), ciclosporina A (Pasero y col., *J. Rheumatol.*, 24: 2113-2118 (1997); Forre, *Arthritis Rheum.*, 37: 1506-1512 (1994)), MTX versus azatioprina (Jeurissen y col., *Ann. Intern. Med.*, 114: 999-1004 (1991)), MTX versus auranofina (Weinblatt y col., *Arthritis Rheum.*, 36: 613-619 (1993)), MTX (meta-análisis) (Alarcón y col., *J. Rheumatol.*, 19: 1868-1873 (1992)), hidroxicloroquina (HCQ) versus SSZ (Van der Heijde y col., *Lancet*, 1: 1036-1038), SSZ (Hannonen y col., *Arthritis Rheum.* 36: 1501-1509 (1993)), la combinación COBRA (Combinatietherapei Bij Reumatoide Artritis) de prednisolona, MTX y SSZ (Boers y col., *Lancet*, 350: 309-318 (1997); Landewe y col., *Arthritis Rheum.*, 46: 347-356 (2002)), combinaciones de MTX, SSZ y HCQ (O'Dell y col., *N. Engl. J. Med.*, 334: 1287-1291 (1996); Mottonen y col., *Lancet*, 353: 1568-1573 (1999)), la combinación de ciclofosfamida, azatioprina y HCQ (Csuka y col., *JAMA*, 255: 2115-2119 (1986)), y la combinación de adalimumab con MTX (Keystone y col., *Arthritis Rheum.*, 46 Supl. 9: S205 (2002)).

La Dirección de Alimentos y Medicinas (FDA por sus siglas en inglés) ha aprobado ahora unas reivindicaciones calificadas de que ciertas medicaciones, por ejemplo leflunomida, etanercept e infliximab, retardan la progresión del daño radiográfico de las articulaciones. Estas reivindicaciones

están basadas en las diferencias estadísticamente significativas en las tasas de progresión observadas entre grupos de tratamiento y grupos de control asignados al azar. Sin embargo, las tasas de progresión en los individuos dentro de los grupos de tratamiento y control se superponen en alto grado; por lo tanto, a pesar de las diferencias significativas entre los grupos de tratamiento, estos datos no pueden ser usados para estimar la probabilidad de que un paciente que está comenzando un tratamiento tendrá un resultado favorable con respecto a la progresión del daño radiográfico. Varios métodos han sido sugeridos para categorizar radiografías pareadas de pacientes individuales como no progresivas, por ejemplo calificaciones de daño de 0 en ambos puntos en el tiempo, ningún aumento en las calificaciones de daño, ninguna articulación nueva con erosiones, y un cambio en la calificación que no excede la menor diferencia detectable (es decir, intervalo de confianza de 95% para la diferencia entre lecturas repetidas de la misma radiografía) (Lassere y col., *J. Rheumatol.*, 26: 731-739 (1999)).

La determinación de que haya habido un daño estructural incrementado en un paciente individual durante el intervalo entre radiografías pareadas obtenidas al comienzo y al final de un ensayo clínico de 6 a 12 meses ha sido difícil, por diversas razones. La tasa de daño radiográfico no es uniforme dentro de una población de pacientes con RA; unos pocos pacientes pueden tener un daño que progresa rápidamente, pero muchos pueden tener poca o ninguna progresión, especialmente si el intervalo de tiempo es relativamente corto. Los métodos para calificar el daño radiográfico, por ejemplo Sharp (Sharp y col., *Arthritis*

Rheum., 14: 706-720 (1971); Sharp y col., *Arthritis Rheum.*, 28: 1326-1335 (1985)), Larsen (Larsen y col., *Acta Radiol. Diagn.*, 18: 481-491 (1977)), y modificaciones de estos métodos (Van der Heijde, *J. Rheumatol.*, 27: 261-263 (2000)), dependen del juicio y la interpretación del lector con respecto a si una interrupción aparente de la placa cortical subcondral es real, o si una disminución en la distancia entre las cortezas sobre los lados opuestos de una articulación es real o es debida a un ligero cambio en la posición de la articulación con relación a la película y el haz radiográfico, a un cambio en la exposición radiográfica o a algún otro factor técnico.

Por lo tanto, la calificación registrada es una aproximación del daño real y, para muchos sujetos, la menor diferencia detectable entre calificaciones repetidas de las mismas radiografías es más grande que el cambio real que ha ocurrido durante el intervalo entre las radiografías de línea de base y final. Si el lector no se percata de la secuencia temporal de las películas, estos errores de calificación inevitables pueden ser en cualquier dirección, conduciendo a un "sanado" aparente cuando la calificación disminuye o a una progresión rápida aparente cuando el error de lectura aumenta la diferencia entre las películas. Cuando el estudio involucra una población suficientemente grande de pacientes que han sido asignados al azar para recibir un tratamiento efectivo en comparación con placebo, los errores de lectura positivos y negativos se compensan, y unas diferencias pequeñas pero reales entre los grupos de tratamiento pueden ser detectadas.

La imprecisión de las medidas clínicas que son usadas para cuantificar la actividad de la enfermedad de RA ha causado un

problema similar; las diferencias estadísticamente significativas entre ciertas medidas de resultados de ensayos clínicos no fueron útiles para estimar la probabilidad de mejoría para un individuo que estaba comenzando el tratamiento (Paulus y col., *Arthritis Rheum.*, 33: 477-484 (1990)). La atribución de una mejoría individual se hizo práctica con la creación de los criterios compuestos de 20% del Colegio Americano de Reumatología (ACR por sus siglas en inglés) para la mejoría (ACR20), los cuales designaban a un paciente como mejorado si había un 20% de mejoría en los conteos de articulaciones sensibles e hinchadas y un 20% de mejoría en por lo menos 3 de 5 medidas adicionales (dolor, función física, evaluación de salud general por el paciente, evaluación de salud general por el médico y niveles reactivos de fase aguda) (Felson y col., *Arthritis Rheum.*, 38: 727-735 (1995)). Todas estas medidas tienen grandes valores para la menor diferencia detectable, pero al requerir la mejora simultánea en 5 de los 7 aspectos del mismo proceso (actividad de la enfermedad), la aleatoriedad de los 7 errores de medición es restringida y es más fácil atribuir una mejora real al individuo.

En la RA, el daño en la articulación es una característica prominente. Los parámetros radiológicos de la destrucción de la articulación son observados como una medida clave del resultado en las descripciones del resultado de la enfermedad. En la reunión reciente de consenso de OMERACT (siglas en inglés para las Medidas de Resultados en Ensayos Clínicos de Reumatología), la radiología fue seleccionada como parte del conjunto esencial de medidas de resultados para los estudios de observación longitudinal (Wolfe y col., *Arthritis Rheum.*, 41

Supl. 9: S204 (1998) resumen). La radiología es también parte del conjunto esencial de medidas requerido por la OMS/ILAR (Organización Mundial de la Salud/Liga Internacional de Asociaciones para Reumatología) para los ensayos clínicos a largo plazo (Tugwell y Boers, *J. Rheumatol.*, 20: 528-530 (1993)).

Los datos disponibles sobre el resultado del daño radiológico en RA han sido obtenidos en estudios tanto a corto plazo como a largo plazo. En los estudios a corto plazo de pacientes con RA con enfermedad de inicio reciente, las radiografías obtenidas cada 6 meses mostraron que, después una progresión rápida inicial, hubo disminución de la tasa de progresión del daño radiológico en las manos y los pies después de 2-3 años (Van der Heijde y col., *Arthritis Rheum.*, 35: 26-34 (1992); Fex y col., *Br. J. Rheumatol.*, 35: 1106-1055 (1996)). En estudios a largo plazo con radiografías tomadas con menos frecuencia, se encontró una tasa constante de progresión, con deterioro implacable del daño hasta 25 años de duración de la enfermedad (Wolfe y Sharp, *Arthritis Rheum.*, 41: 1571-1582 (1998); Graudal y col., *Arthritis Rheum.*, 41: 1470-1480 (1998); Plant y col., *J. Rheumatol.*, 25: 417-426 (1998); Kaarela y Kautiainen, *J. Rheumatol.*, 24: 1285-1287 (1997)). No está claro si estas diferencias en el patrón de progresión radiográfico son debidas a diferencias en las técnicas de calificación.

Los sistemas de calificación usados difieren en el número de articulaciones que están siendo calificadas, la presencia de calificaciones independientes para erosiones (ERO) y estrechamiento del espacio de las articulaciones (JSN por sus

siglas en inglés), la máxima calificación por articulación, y la ponderación de una anomalía radiológica. Hasta ahora, no hay consenso sobre el método de calificación de preferencia. Durante los primeros 3 años de seguimiento en un estudio de grupo de pacientes con artritis temprana, se encontró que JSN y ERO diferían en su contribución a la progresión medida en el daño radiológico de las manos y los pies (Van der Heijde y col., *Arthritis Rheum.*, 35: 26-34 (1992)). Adicionalmente, se encontró que los métodos que califican independientemente ERO y JSN, tales como las calificaciones Sharp y Kellgren, eran más sensibles a los cambios en la RA temprana que los métodos que usan una medida general, tales como la calificación de Larsen (Plant y col., *J. Rheumatol.*, 21: 1808-1813 (1994); Cuchacovich y col., *Arthritis Rheum.*, 35: 736-739 (1992)). La calificación de Sharp es un método de mano de obra muy intensa (Van der Heijde, *Baillieres Clin. Rheumatol.*, 10: 435-533 (1996)). En la RA tardía o destructiva, se encontró que los métodos de Sharp y Larsen proporcionaban una información similar. Sin embargo, la sensibilidad al cambio de los varios métodos de calificación tarde en la enfermedad aún no ha sido investigada y se puede argumentar que los métodos de calificación que miden independientemente ERO y JSN proporcionan información útil (Pincus y col., *J. Rheumatol.*, 24: 2106-2122 (1997)). Véase también Drossaers-Bakker y col., *Arthritis Rheum.*, 43: 1465-1472 (2000), que compararon los tres sistemas de calificación radiológica para la evaluación a largo plazo de RA.

Paulus y col., *Arthritis Rheum.*, 50: 1083-1096 (2004) clasificaron el daño radiográfico de las articulaciones como progresivo o no progresivo en individuos con RA que

participaron en ensayos clínicos, y concluyeron que el daño a las articulaciones por RA en un grupo de observación puede ser clasificado como progresivo o no progresivo con el uso de una definición compuesta que incluye un número de medidas imprecisas y relacionadas, pero distintas, de daño estructural a la articulación. Parece que en el manejo clínico diario de un paciente de RA, un cambio de intervalo entre un par de radiografías de por lo menos cinco unidades de calificación de daño radiográfico de Sharp debe estar presente antes de que se considere que el cambio estructural es real y se use como la base para una decisión de tratamiento.

Durante los últimos 10 años ha habido unos avances mayores en el tratamiento de RA. El uso en combinación de medicamentos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD por sus siglas en inglés), junto con nuevos agentes biológicos, ha proporcionado unos niveles superiores de eficacia en una mayor proporción de pacientes, mientras que el diagnóstico y tratamiento temprano de la enfermedad también ha mejorado los resultados.

El etanercept es una proteína de fusión totalmente humana que inhibe el factor de necrosis tumoral (TNF) y la cascada de citocina inflamatoria subsiguiente. Se ha mostrado que el etanercept es seguro y efectivo en la reducción rápida de la actividad de la enfermedad en adultos con RA y en el mantenimiento de esa mejoría (Bathon y col., *N. Eng. J. Med.*, 343: 1586-1593 (2000); Moreland y col., *N. Engl. J. Med.*, 337: 141-147 (1997); Moreland y col., *Ann. Intern. Med.*, 130: 478-486 (1999); Weinblatt y col., *N. Engl. J. Med.*, 340: 253-259 (1999); Moreland y col., *J. Rheumatol.*, 28: 1238-1244 (2001)).

Es igualmente efectivo en los niños con RA juvenil poliarticular (Lovell y col., *N. Engl. J. Med.*, 342: 763-769 (2000)). El etanercept ha sido aprobado para ser usado como monoterapia, así como en terapia de combinación con MTX, para el tratamiento de RA.

La pérdida de función y el cambio radiográfico ocurren de manera temprana en el curso de la enfermedad. Estos cambios pueden ser retardados o prevenidos con el uso de ciertos DMARD. Aunque varios DMARD son inicialmente clínicamente efectivos y bien tolerados, muchos de estos medicamentos se hacen menos efectivos o exhiben una toxicidad aumentada con el tiempo. En base a su eficacia y tolerabilidad, el MTX se ha convertido en la terapia estándar por la cual otros tratamientos son medidos (Bathon y col., *N. Eng. J. Med.*, 343: 1586-1593 (2000); Albert y col., *J. Rheumatol.*, 27: 644-652 (2000)).

Unos estudios recientes han examinado la progresión radiográfica en pacientes con RA de etapa tardía que han tomado leflunomida, MTX o placebo (Strand y col., *Arch. Intern. Med.*, 159: 2542-2550 (1999)) así como pacientes que han tomado infliximab más MTX o placebo más MTX después de una respuesta parcial al MTX (Lipsky y col., *N. Engl. J. Med.*, 343: 1594-1602 (2000); Maini y col., *Lancet*, 354: 1932-1939 (1999)). En el primer año del ensayo de ERA (RA temprana) de Enbrel, se mostró que el etanercept era significativamente más efectivo que el MTX en la mejora de los signos y síntomas de la enfermedad y en la inhibición de la progresión radiográfica (Bathon y col., *N. Eng. J. Med.*, 343: 1586-1593 (2000)). Genovese et al., *Arthritis Rheum.* 46: 1443-1450 (2002) reportan unos resultados del segundo año del estudio, concluyendo que el etanercept como

monoterapia era seguro y superior al MTX en la reducción de la actividad de la enfermedad, la detención del daño estructural, y la disminución de la incapacidad durante 2 años en pacientes con RA temprana y agresiva.

Adicionalmente, la reducción en la progresión radiográfica en las manos y los pies fue observada en pacientes con artritis reumatoide temprana después de recibir infliximab en combinación con metotrexato (Van der Heijde y col., *Annals Rheumatic Diseases* 64: 418-419 (2005)). Los pacientes con artritis reumatoide temprana lograron una mejoría clínica significativa y sostenida en la función física después del tratamiento con infliximab (Smolen y col., *Annals Rheumatic Diseases* 64: 418 (2005)). El efecto del infliximab y el metotrexato sobre la progresión radiográfica en pacientes con artritis reumatoide temprana es reportado en Van der Heijde y col., *Annals Rheumatic Diseases* 64: 417 (2005). El tratamiento con infliximab en pacientes con espondilitis anquilosante conduce a unos cambios en los marcadores de cambio de inflamación y hueso asociados con la eficacia clínica (Visvanathan et al., *Annals Rheumatic Diseases* 64: 319 (2005)).

El efecto de la terapia con infliximab sobre la densidad mineral ósea en pacientes con espondilitis anquilosante (AS por sus siglas en inglés) que resulta de un ensayo distribuido aleatoriamente, controlado por placebo llamado ASSERT es reportado por Van der Heijde y col., *Annals Rheumatic Diseases* 64: 319 (2005). Se encontró que el infliximab mejora la fatiga y el dolor en pacientes con AS, en resultados del ASSERT (Van der Heijde y col., *Annals Rheumatic Diseases* 64: 318-319 (2005)). Adicionalmente, la eficacia y la seguridad del

infliximab en pacientes con AS como un resultado del ASSERT son descritos por Van der Heijde y col., *Arthritis Rheum.* 5:582-591 (2005). Los autores concluyen que el infliximab fue bien tolerado y efectivo en un gran grupo de pacientes con AS durante un período de estudio de 24 semanas. Además, el efecto de la terapia con infliximab sobre la inflamación espinal fue evaluado por imaginología de resonancia magnética en un ensayo distribuido aleatoriamente, controlado por placebo de 279 pacientes con AS (Van der Heijde y col., *Annals Rheumatic Diseases* 64: 317 (2005)). La forma en la cual el efecto del tratamiento sobre la progresión radiográfica espinal en pacientes con AS debería ser medida es encarada por Van der Heijde y col., *Arthritis Rheum.* 52: 1979-1985 (2005).

Los resultados de los análisis radiográficos del ensayo controlado multinacional de artritis por soriasis con infliximab (IMPACT por sus siglas en inglés) después de un año son reportados por Antoni y col., *Annals Rheumatic Diseases* 64: 107 (2005). La evidencia del beneficio radiográfico del tratamiento con infliximab más MTX en pacientes con artritis reumatoide que no tenían mejoría clínica, con un subanálisis detallado de los datos del ensayo de factor de necrosis tumoral en artritis reumatoide con estudio de terapia concomitante, es reportado por Smolen y col., *Arthritis Rheum.* 52: 1020-1030 (2005). La progresión radiográfica según lo medido por el cambio promedio en la calificación de Sharp/Van der Heijde modificada fue mucho mayor en pacientes que recibieron MTX más placebo que en pacientes que recibieron infliximab más MTX. Los autores concluyen que, incluso en pacientes sin mejoría clínica, el tratamiento con infliximab más MTX proporcionó un

beneficio significativo con respecto al proceso destructivo, sugiriendo que en tales pacientes estas 2 medidas de la enfermedad están separadas. La asociación entre el daño radiográfico de línea de base y la mejoría en la función física después del tratamiento de pacientes que tienen artritis reumatoide con infliximab es descrito por Breedveld y col., *Annals Rheumatic Diseases* 64: 52-55 (2005). El daño estructural fue evaluado usando la modificación de Van der Heijde de la calificación de Sharp. Los autores concluyen que un mayor daño en la articulación en la línea de base estaba asociado con una función física más pobre en la línea de base y una mejoría menor en la función física después del tratamiento, subrayando la importancia de la intervención temprana para retardar la progresión de la destrucción de la articulación.

Anticuerpos CD20 y Terapia con los Mismos

Los linfocitos son uno de los muchos tipos de glóbulos blancos producidos en la médula ósea durante el proceso de hematopoyesis. Existen dos poblaciones mayores de linfocitos: linfocitos B (células B) y linfocitos T (células T). Los linfocitos de interés particular aquí son las células B.

Las células B maduran con la médula ósea y salen de la médula expresando un anticuerpo de unión a antígeno sobre su superficie celular. Cuando una célula B ingenua encuentra por primera vez el antígeno para el cual su anticuerpo unido a 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 tiene un lapso de vida más largo y continúan expresando el anticuerpo unido a membrana con la

misma especificidad que la célula madre original. Las células plasmáticas no producen anticuerpo unido a membrana, sino que producen en cambio el anticuerpo en una forma que puede ser secretada. Los anticuerpos secretados son las mayores moléculas efectoras de la inmunidad humoral.

El antígeno CD20 (también llamado antígeno de diferenciación restringido a linfocitos B humanos, Bp35 o B1) es una proteína de membrana integral glucosilada de cuatro passes con un peso molecular de aproximadamente 35 kD localizada en los 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 es también expresado sobre más del 90% de linfomas no de Hodgkin (NHL por sus siglas en inglés) de células B (Anderson y col., *Blood* 63(6):1424-1433 (1984)), pero no es encontrado en células germinales hematopoyéticas, células pro-B, células plasmáticas normales u otros tejidos normales (Tedder y col., *J. Immunol.* 135(2):973-979 (1985)). CD20 regula uno o más pasos previos en el proceso de activación para la iniciación y diferenciación del ciclo celular (Tedder y col., *supra*), y posiblemente funciona como un canal de ion calcio. Tedder y col., *J. Cell. Biochem.* 14D:195 (1990). CD20 experimenta fosforilación en células B activadas (Riley y Sliwowski, *Semin. Oncol.*, 27(12), 17-24 (2000)). CD20 aparece sobre la superficie de los linfocitos B en la etapa pre-célula B y es encontrado sobre células B maduras y de memoria, pero no sobre células plasmáticas (Stashenko y col., *J Immunol* 1980; 125:1678-1685 (1980)); Clark y Ledbetter, *Adv. Cancer Res.* 52, 81-149 (1989)). CD20 tiene actividad de canal de calcio y puede tener un papel en el desarrollo de células B.

La relación entre la lisis de las células B CD20⁺ periféricas in vitro y la actividad de rituximab in vivo no es clara. El rituximab muestra citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC por sus siglas en inglés) in vitro (Reff y col., *Blood* 83:435-445 (1994)). Una potente actividad citotóxica dependiente de complemento (CDC por sus siglas en inglés) también ha sido observada para el rituximab sobre células de linfoma y líneas celulares (Reff y col., supra, 1994) y en ciertos modelos de xenoinjerto de ratón (Di Gaetano y col., *J Immunol* 171:1581-1587 (2003)). Se ha mostrado que varios anticuerpos anti-CD20, incluyendo rituximab, inducen apoptosis in vitro cuando son enlazados transversalmente por un anticuerpo secundario o por otro medio (Ghetie y col., *Proc Natl Acad Sci.* 94, 7509-7514 (1997)).

Dada la expresión de CD20 en los linfomas de células B, este antígeno puede servir como un candidato para "la elección como objetivo" de tales linfomas. En esencia, tal elección como objetivo puede ser generalizada como sigue: unos anticuerpos específicos al antígeno superficial CD20 de células B son administrados a un paciente. Estos anticuerpos anti-CD20 se unen específicamente al antígeno CD20 de células B normales y malignas (de manera manifiesta), el anticuerpo unido al antígeno superficial CD20 puede conducir a la destrucción y depleción de células B neoplásicas. Adicionalmente, unos agentes químicos o marcadores radioactivos que tienen el potencial de destruir el tumor pueden ser conjugados con el anticuerpo anti-CD20 de tal modo que el agente sea específicamente "entregado" a las células B neoplásicas. Independientemente del enfoque, una meta primaria es destruir

el tumor; el enfoque específico puede ser determinado por el anticuerpo anti-CD20 particular que es utilizado y, así, los enfoques disponibles para elegir como objetivo el antígeno CD20 pueden variar considerablemente.

El anticuerpo rituximab (RITUXAN®) es un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico diseñado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20. Rituximab es el anticuerpo llamado "C2B8" en la Patente de EE.UU. N° 5.736.137 expedida el 7 de abril de 1998 (Anderson y col.). Rituximab es indicado para el tratamiento de pacientes con linfoma no de Hodgkin de células B, CD20-positivo, de bajo grado o folicular refractario o de relapso. Los estudios de mecanismo de acción in vitro han demostrado que el rituximab se une al complemento humano y efectúa la lisis de líneas celulares B linfoides a través de CDC. Reff y col., *Blood* 83(2):435-445 (1994). Adicionalmente, tiene una actividad significativa en ensayos para ADCC. Más recientemente, se ha mostrado que el rituximab tiene efectos anti-proliferativos en ensayos de incorporación de timidina tritiada e induce apoptosis directamente, mientras que otros anticuerpos anti-CD19 y anti-CD20 no lo hacen. Maloney y col., *Blood* 88(10):637a (1996). La sinergia entre rituximab y quimioterapias y toxinas también ha sido observada experimentalmente. En particular, el rituximab sensibiliza las líneas celulares de linfoma de células B humano resistente a medicamento a los efectos citotóxicos de doxorubicina, CDDP, VP-16, toxina diftérica y ricina (Demidem y col., *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12(3):177-186 (1997)). Los estudios preclínicos in vivo han mostrado que el rituximab vacía las células B desde la sangre periférica, los nodos

OP004 (2003); Emery y col., *Arthritis Rheum.* 48(9): S439 (2003)), 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)), 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 (Supl. 12):99-103 (2000); Zaia y col., *Haematologica*, 87: 189-195 (2002); Ratanatharathorn y col., *Ann. Int. Med.*, 133: 275-279 (2000)), aplasia de glóbulos rojos puros (Auner y col., *Br. J. Haematol.*, 116: 725-728 (2002)); anemia autoinmune (Zaja y col., *Haematologica* 87:189-195 (2002) (una fe de erratas aparece en *Haematologica* 87:336 (2002)), enfermedad de aglutininas frías (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)), síndrome tipo B de resistencia severa a insulina (Coll y col., *N. Engl. J. Med.*, 350: 310-311 (2004)), crioglobulinemia mezclada (DeVita y col., *Arthritis Rheum.* 46 Supl. 9:S206/S469 (2002)), miastenia gravis (Zaja y col., *Neurology*, 55: 1062-63 (2000); Wylam y col., *J. Pediatr.*, 143: 674-677 (2003)), granulomatosis de Wegener (Specks y col., *Arthritis & Rheumatism* 44: 2836-2840 (2001)), pénfigo vulgaris refractario (Dupuy y col., *Arch Dermatol.*, 140:91-96 (2004)), dermatomiositis (Levine, *Arthritis Rheum.*, 46 (Supl. 9):S1299 (2002)), síndrome de Sjogren (Somer y col., *Arthritis & Rheumatism*, 49: 394-398 (2003)), crioglobulinemia mezclada tipo II activa (Zaja y col., *Blood*, 101: 3827-3834 (2003)), pénfigo vulgaris (Dupay y col., *Arch. Dermatol.*, 140: 91-95 (2004)),

neuropatía autoinmune (Pestronk y col., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74:485-489 (2003)), síndrome opsoclonus-mycoclonus paraneoplásico (Pranzatelli y col., *Neurology* 60 (Supl. 1) PO5.128:A395 (2003)), y esclerosis múltiple de remisión-relapso (RRMS). Cross y col. (resumen) "Resultados Preliminares de un Ensayo de Fase II de Rituximab en Esclerosis Múltiple", Octava Reunión Anual de los Comités de las Américas para la Investigación y el Tratamiento en la Esclerosis Múltiple, 20-21 (2003).

Un estudio de Fase II (WA16291) ha sido conducido en pacientes con artritis reumatoide (RA), proporcionando datos de seguimiento de 48 semanas sobre la seguridad y la eficacia del rituximab. Emery y col., *Arthritis Rheum.* 48(9):S439 (2003); Szczepanski y col., *Arthritis Rheum.* 48(9):S121 (2003). Un total de 161 pacientes fueron distribuidos de manera aleatoria y regular en cuatro ramas de tratamiento: metotrexato, rituximab solo, rituximab más metotrexato y rituximab más ciclofosfamida (CTX). El régimen de tratamiento de rituximab fue de un gramo administrado de manera intravenosa en los días 1 y 15. Las infusiones de rituximab en la mayoría de los pacientes con RA fueron bien toleradas, 36% de los pacientes experimentando por lo menos un evento adverso durante su primera infusión (en comparación con 30% de los pacientes que recibieron placebo). En general, la mayoría de los eventos adversos fueron considerados como de severidad suave a moderada y estuvieron bien balanceados en todos los grupos de tratamiento. Hubo un total de 19 eventos adversos serios en los cuatro ramas durante las 48 semanas, que fueron ligeramente más frecuentes en el grupo de rituximab/CTX. La

incidencia de infecciones estuvo bien balanceada en todos los grupos. La tasa media de infección seria de esta población de pacientes con RA fue de 4,66 por 100 pacientes-años, que es menor que la tasa de infecciones que requirieron admisión hospitalaria en pacientes con RA (9,57 por 100 pacientes-años) reportada en un estudio epidemiológico basado en la comunidad. Doran y col., *Arthritis Rheum.* 46:2287-2293 (2002).

El perfil de seguridad reportado del rituximab en un pequeño número de pacientes con trastornos neurológicos, incluyendo neuropatía autoinmune (Pestronk y col., *supra*), síndrome opsoclonus-myoclonus (Pranzatelli y col., *supra*) y RRMS (Cross y col., *supra*), fue similar a aquél reportado en oncología o RA. En un ensayo en curso patrocinado por el investigador (IST por sus siglas en inglés) de rituximab en combinación con interferón beta (IFN- β) o acetato de glatiramer en pacientes con RRMS (Cross y col., *supra*), 1 de 10 pacientes tratados fue admitido al hospital para ser observado toda la noche después de experimentar fiebre moderada y rigores luego de la primera infusión de rituximab, mientras que los otros 9 pacientes completaron el régimen de cuatro infusiones sin eventos adversos reportados.

Unas patentes y publicaciones de patente concernientes los anticuerpos CD20 y moléculas de unión a CD20 incluyen las Patentes de EE.UU. Nos. 5.776.456, 5.736.137, 5.843.439, 6.399.061 y 6.682.734, así como EE.UU. 2002/0197255, EE.UU. 2003/0021781, EE.UU. 2003/0082172, EE.UU. 2003/0095963, EE.UU. 2003/0147885 (Anderson y col.); Patente de EE.UU. N° 6.455.043 y WO 2000/09160 (Grillo-López, A.); WO 2000/27428 (Grillo-López y White); WO 2000/27433 (Grillo-López y Leonard); WO 2000/44788

(Goldenberg y Hansen); WO 2000/76542 (Golay y col.); WO 2001/72333 (Wolin y Rosenblatt); Patente de EE.UU. N° 6.368.596 (Ghetie y col.); Patente de EE.UU. N° 6.306.393 y EE.UU. 2002/0041847 (Goldenberg, D.); EE.UU. 2003/0026801 (Weiner y Hartmann); WO 2002/102312 (Engleman, E.); EE.UU. 2003/0068664 (Albitar y col.); WO 2003/002607 (Leung, S.); WO 2003/049694, EE.UU. 2002/0009427 y EE.UU. 2003/0185796 (Wolin y col.); WO 2003/061694 (Sing y Siegall); EE.UU. 2003/0219818 (Bohen y col.); EE.UU. 2003/0219433 y WO 2003/068821 (Hansen y col.); EE.UU. 2003/0219818 (Bohen y col.); EE.UU. 2002/0136719 (Shenoy y col.); WO 2004/032828 y EE.UU. 2005/0180972 (Wahl y col.); y WO 2002/56910 (Hayden-Ledbetter). Véase también la Patente de EE.UU. N° 5.849.898 y EP 330,191 (Seed y col.); EP332.865A2 (Meyer y Weiss); Patente de EE.UU. N° 4.861.579 (Meyer y col.); EE.UU. 2001/0056066 (Bugelski y col.); WO 1995/03770 (Bhat y col.); EE.UU. 2003/0219433 A1 (Hansen y col.); WO 2004/035607 (Teeling y col.); WO 2005/103081 (Teeling y col.); WO 2004/056312 (Lowman y col.); EE.UU. 2004/0093621 (Shitara y col.); WO 2004/103404 (Watkins y col.); WO 2005/000901 (Tedder y col.); EE.UU. 2005/0025764 (Watkins y col.); WO 2005/016969 (Carr y col.); EE.UU. 2005/0069545 (Carr y col.); WO 2005/014618 (Chang y col.); EE.UU. 2005/0079174 (Barbera-Guillem y Nelson); EE.UU. 2005/0106108 (Leung y Hansen); WO 2005/044859 y EE.UU. 2005/0123546 (Umana y col.); WO 2005/070963 (Allan y col.); EE.UU. 2005/0186216 (Ledbetter y Hayden-Ledbetter); EE.UU. 2005/0202534 (Hayden-Ledbetter y Ledbetter); EE.UU. 2005/0202028 (Hayden-Ledbetter y Ledbetter); EE.UU. 2005/0202023 (Hayden-Ledbetter y Ledbetter); Patente de

rituximab a 375 mg/m² cada tres meses, y un segundo paciente con SLE fue tratado exitosamente con rituximab y está recibiendo terapia de mantenimiento cada tres meses, ambos pacientes respondiendo bien a la terapia con rituximab; Edwards y Cambridge, "Mejoría sostenida en artritis reumatoide después de un protocolo diseñado para reducir los linfocitos B", *Rheumatology* 40:205-211 (2001); Cambridge y col., "Depleción de linfocitos B en pacientes con artritis reumatoide: estudios en serie de parámetros inmunológicos", *Arthritis Rheum.*, 46 (Supl. 9): S1350 (2002); Cambridge y col., "Cambios serológicos después de la terapia de depleción de linfocitos B para artritis reumatoide", *Arthritis Rheum.*, 48: 2146-2154 (2003); Edwards y col., "Terapia de depleción de linfocitos B en artritis reumatoide y otros trastornos autoinmunes", *Biochem Soc. Trans.*, supra; Edwards y col., "Eficacia y seguridad del rituximab, un anticuerpo monoclonal quimérico apuntado a las células B: Un ensayo distribuido aleatoriamente, controlado por placebo, en pacientes con artritis reumatoide", *Arthritis and Rheumatism* 46(9): S197 (2002); Edwards y col., "Eficacia de la terapia apuntada a células B con rituximab en pacientes con artritis reumatoide", *N Engl. J. Med.* 350:2572-2582 (2004); Pavelka y col., *Ann. Rheum. Dis.* 63: (S1):289-290 (2004); Emery y col., *Arthritis Rheum.* 50 (S9):S659 (2004); Levine y Pestronk, "Polineuropatías relacionadas con anticuerpos de IgM: quimioterapia de depleción de células B usando rituximab", *Neurology* 52: 1701-1704 (1999); Uchida y col., "La red de fagocitos mononucleares innatos varía los linfocitos B a través de mecanismos dependientes del receptor Fc durante la inmunoterapia con anticuerpos anti-CD20", *J. Exp. Med.* 199:

1659-1669 (2004); Gong y col., "Importancia de la dinámica circulatoria y el microambiente celular en la inmunoterapia de células B", *J. Immunol.* 174: 817-826 (2005); Hamaguchi y col., "La cavidad peritoneal proporciona un nicho protector para linfocitos B1 y B convencionales durante la inmunoterapia anti-CD20 en ratones", *J. Immunol.* 174: 4389-4399 (2005); Cragg y col., "La biología de CD20 y su potencial como un objetivo para la terapia mAB", *Curr. Dir. Autoimmun.* 8:140-174 (2005); Eisenberg, "Mecanismos de autoinmunidad", *Immunol. Res.* 27: 203-218 (2003); DeVita y col., "Eficacia del bloqueo selectivo de células B en el tratamiento de artritis reumatoide", *Arthritis & Rheum* 46:2029-2033 (2002); Hideshida y col., "Tratamiento de artritis reumatoide refractaria-DMARD con rituximab", presentado en la Reunión Científica Anual del Colegio Americano de Reumatología; 24-29 de octubre; Nueva Orleáns, LA 2002; Tuscano, J., "Tratamiento exitoso de la artritis reumatoide refractaria-infliximab con rituximab", presentado en la Reunión Científica Anual del Colegio Americano de Reumatología; 24-29 de octubre; Nueva Orleáns, LA 2002 y publicado, Tuscano, *Arthritis Rheum.* 46: 3420 (2002); "Papeles patogénicos de las células B en autoinmunidad humana; percepciones de la clínica", Martin y Chan, *Immunity* 20:517-527 (2004); Silverman y Weisman, "Terapia con rituximab y trastornos autoinmunes, prospectos para la terapia anti-células B", *Arthritis and Rheumatism*, 48: 1484-1492 (2003); Kazkaz y Isenberg, "Terapia anti-células B (rituximab) en el tratamiento de enfermedades autoinmunes", *Current opinion in pharmacology*, 4: 398-402 (2004); Virgolini y Vanda, "Rituximab en enfermedades autoinmunes", *Biomedicine & pharmacotherapy*, 58:

299-309(2004); Klemmer y col., "Tratamiento de trastornos autoinmunes mediados por anticuerpos con un anticuerpo monoclonal anti-CD20, Rituximab", *Arthritis and Rheumatism*, 48: (9) 9,8 (SEP), páginas S624-S624 (2003); Kneitz y col., "Depleción efectiva de células B con rituximab en el tratamiento de enfermedades autoinmunes", *Immunobiology*, 206: 519-527 (2002); Arzoo y col., "Tratamiento de trastornos autoinmunes mediados por anticuerpos refractarios con un anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab)", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61 (10), p. 922-924 (2002), Comentario en *Ann Rheum Dis.* 61: 863-866 (2002); "Estrategias futuras en inmunoterapia" por Lake y Dionne, en *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (2003 por John Wiley & Sons, Inc.), artículo en línea de fecha 15 de enero de 2003 (Capítulo 2 "Inmunoterapia dirigida a anticuerpos"); Liang y Tedder, *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, Sección: CD20 como un Objetivo de Inmunoterapia, artículo en línea de fecha 15 de enero de 2002 titulado "CD20"; Apéndice 4A titulado "Anticuerpos Monoclonales a Antígenos de Superficie Celular Humana" por Stockinger y col., eds: Coligan et al., in *Current Protocols in Immunology* (2003 John Wiley & Sons, Inc.), fecha de puesta en línea: Mayo de 2003; Publicación Impresa de fecha: Febrero de 2003; Penichet y Morrison, "Anticuerpos/moléculas CD: Definición; Diseño de Anticuerpos" en *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, Sección: Anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos; puesto en línea el 15 de enero 2002.

Adicionalmente, véase Looney, "Células B como un objetivo terapéutico en enfermedades autoinmunes diferentes a la artritis reumatoide", *Rheumatology*, 44 Supl. 2: ii13-ii17

(2005); Chambers y Isenberg, "Terapia anti-células B (rituximab) en el tratamiento de enfermedades autoinmunes", *Lupus* 14(3): 210-214 (2005); Looney y col., "Depleción de células B como un tratamiento novedoso para lupus sistémico eritematoso: un ensayo de intensificación de dosis de fase I/II de rituximab", *Arthritis Rheum.* 50: 2580-2589 (2004); Looney, "Tratamiento de enfermedad autoinmune humana por depleción de células B", *Ann Rheum. Dis.* 61: 863-866 (2002); Edelbauer y col., "Rituximab en lupus sistémico eritematoso infantil refractario a inmunosupresión convencional, Informe de caso", *Pediatr. Nephrol.* 20(6): 811-813 (2005); D'Cruz y Hughes, "El tratamiento de nefritis de lupus", *BMJ* 330(7488): 377-378 (2005); Looney, "Terapia apuntada a células B en enfermedades diferentes a la artritis reumatoide", *J. Rheumatol. Supl.* 73: 25-28; discusión 29-30 (2005); Sfrikakis y col., "La remisión de nefritis de lupus proliferativo después de la terapia por depleción de células B está precedida por la regulación descendente del ligando CD40 de moléculas co-estimulantes de células T: un ensayo de marcador abierto", *Arthritis Rheum.* 52(2): 501-513 (2005); Rastetter y col., "Rituximab: expansión de su papel en la terapia para linfomas y enfermedades autoinmunes", *Ann. Rev. Med.* 55: 477-503 (2004); Silverman, "Terapia anti-CD20 en lupus sistémico eritematoso: un paso más cerca de la clínica", *Arthritis Rheum.* 52(2): 371-7 (2005), Fe de erratas en: *Arthritis Rheum.* 52(4): 1342 (2005); Ahn y col., "Remisión a largo plazo de la condición hipercoagulable que amenaza la vida asociada con lupus anticoagulante (LA) después de la terapia con rituximab", *Am. J. Hematol.* 78(2): 127-129 (2005); Tahir y col., "Anticuerpo monoclonal anti-CD20

humanizado en el tratamiento de lupus sistémico eritematoso resistente severo en un paciente con anticuerpos contra rituximab", *Rheumatology*, 44(4): 561-562 (2005), Epub 11 de enero de 2005; Looney y col., "Tratamiento de SLE con anticuerpo monoclonal anti-CD20", *Curr. Dir. Autoimmun.* 8: 193-205 (2005); Cragg y col., "La biología de CD20 y su potencial como un objetivo para terapia mAb", *Curr. Dir. Autoimmun.* 8: 140-174 (2005); Gottenberg y col., "Tolerancia y eficacia a corto plazo de rituximab en 43 pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas", *Ann. Rheum. Dis.* 64(6): 913-920 (2005) Epub 18 de noviembre de 2004; Tokunaga y col., "Regulación descendente de CD40 y CD80 en células B en pacientes con lupus sistémico eritematoso que amenaza la vida después de un tratamiento exitoso con rituximab", *Rheumatology* 44(2): 176-182 (2005), Epub 19 de octubre de 2004. Véase también Leandro y col., "La repoblación de células B ocurre principalmente a partir de células B ingenuas en pacientes con artritis reumatoide y lupus sistémico eritematoso", *Arthritis Rheum.*, 48 (Supl. 9): S1160 (2003).

Specks y col., "Respuesta de la granulomatosis de Wegener a la terapia con anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20", *Arthritis & Rheumatism* 44(12):2836-2840 (2001) describen el uso exitoso de cuatro infusiones de 375 mg/m² de rituximab y glucocorticoides en dosis elevadas para tratar la granulomatosis de Wegener. La terapia fue repetida después de 11 meses cuando cANCA recurrió, pero la terapia fue sin glucocorticoides. A los 8 meses después del segundo curso de rituximab, la enfermedad de los pacientes permaneció en remisión completa. Adicionalmente, en otro estudio, se

encontró que el rituximab era un agente de inducción de remisión efectivo y bien tolerado para vasculitis asociada con ANCA severa, cuando fue usado en una dosis de 375 mg/m² x 4 junto con prednisona oral a 1 mg/kg/día, la cual fue reducida para la semana 4 a 40 mg/día, y a una discontinuación completa durante las siguientes 16 semanas. Cuatro pacientes fueron tratados nuevamente con rituximab solo para títulos de ANCA recurrentes/en aumento. Aparte de los glucocorticoides, ningún otro agente inmunosupresor adicional parece ser necesario para la inducción de la remisión y el mantenimiento de la remisión sostenida (6 meses o más). Véase la presentación e invitación de resumen en línea de Keogh y col., "Rituximab para la Inducción de Remisión en Vasculitis Asociada con ANCA Severa: Informe de un Posible Ensayo Piloto de Marcador Abierto en 10 Pacientes", Colegio Americano de Reumatología, Número de Sesión: 28-100, Título de Sesión: Vasculitis, Tipo de Sesión: Sesión Concurrente ACR, Categoría Primaria: 28 Vasculitis, Sesión del 18/10/2004 (<www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.asp>). Véase también Keogh y col., *Kidney Blood Press. Res.* 26:293 (2003), en el cual se reporta que once pacientes con vasculitis asociada con ANCA refractaria fueron tratados con cuatro dosis semanales de 375 mg/m² de rituximab y glucocorticoides en dosis elevadas, resultando en remisión.

Se administró rituximab a unos pacientes con vasculitis asociada con ANCA refractaria junto con medicamentos inmunosupresores, tales como ciclofosfamida intravenosa, micofenolato mofetil, azatioprina o leflunomida, con aparente eficacia. Eriksson, "Seguridad y resultado a corto plazo en 5 pacientes con vasculitis ANCA-positiva tratada con rituximab",

Kidney and Blood Pressure Research, 26: 294 (2003) (cinco pacientes con vasculitis asociada con ANCA tratados con rituximab a 375 mg/m² una vez a la semana por 4 semanas respondieron al tratamiento); Jayne y col., "Depleción de células B con rituximab para vasculitis refractaria", *Kidney and Blood Pressure Research*, 26: 294-295 (2003) (seis pacientes con vasculitis refractaria que recibieron cuatro infusiones semanales de rituximab a 375 mg/m² con ciclofosfamida junto con inmunosupresión de fondo y prednisolona experimentaron unas caídas mayores en la actividad vasculítica). Un informe adicional del uso de rituximab junto con ciclofosfamida intravenosa a 375 mg/m² por dosis en 4 dosis para su administración a pacientes con vasculitis sistémica refractaria es proporcionado en Jayne, afiche 88 (11^o Taller Internacional de Vasculitis y ANCA), 2003, Sociedad Americana de Nefrología. Véase también Stone y Specks, "Terapia con rituximab para la inducción de remisión y tolerancia en Vasculitis asociada con ANCA", en el Resumen de Investigación de Ensayos Clínicos de la Red de Inmuno-tolerancia 2002-2003, <http://www.immunetolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html>, en el cual un ensayo de rituximab en vasculitis asociada con ANCA es propuesto por una duración total de 18 meses. Véase también Eriksson, J. *Internal Med.*, 257: 540-548 (2005) con respecto a nueve pacientes con vasculitis ANCA-positiva que fueron exitosamente tratados con dos a cuatro dosis semanales de 200 mg de rituximab, así como Keogh y col., *Arthritis and Rheumatism*, 52: 262-268 (2005), quienes reportaron que, en 11 pacientes con vasculitis asociada con ANCA refractaria, el tratamiento o re-tratamiento con cuatro dosis semanales de 375 mg/m² de

rituximab indujo la remisión por depleción de linfocitos B, el estudio siendo conducido entre enero 2000 y Septiembre 2002.

En cuanto la actividad de un anticuerpo anti-CD20 humanizado, véase, por ejemplo, Vugmeyster y col., "Depleción de células B por un anticuerpo anti-CD20 humanizado PRO70769 en *Macaca fascicularis*", *J. Immunother.* 28: 212-219 (2005). Para una discusión de un anticuerpo monoclonal humano, véase Baker y col., "Generación y caracterización de LymphoStat-B, un anticuerpo monoclonal humano que antagoniza las bioactividades de un estimulador de linfocitos B", *Arthritis Rheum.* 48: 3253-3265 (2003).

Los hallazgos del estudio WA17043, un estudio de variación de dosis, doble ciego, distribuido aleatoriamente, de fase IIb en pacientes con artritis reumatoide que habían tenido una respuesta inadecuada a DMARD (incluyendo agentes anti-TNF) (Emery y col., *European League against Rheumatism (EULAR)* (Junio de 2005) OP0008; Van Vollenhoven y col., *EULAR* (Junio de 2005) SAT0072), indican que la combinación de rituximab con MTX está asociada con una mejoría clínica y estadísticamente significativa en los síntomas de la enfermedad. Este estudio identificó las dosis de rituximab en combinación con MTX que requieren investigación y confirmación adicional dentro del escenario de un estudio clínico de fase III. Véase también *World Pharmaceutical News*, www.scrippharma.com, artículo fechado al 13 de junio de 2005, titulado "Rituximab: ¿un futuro reto para los anti-TNF?" que describe los estudios de la EULAR y especula si los datos de rayos X del estudio REFLEX en fase III mostrarían si el rituximab puede retardar el daño en la articulación. Además, WO 2004/091657, publicada el 28 de

octubre de 2004, describe el tratamiento de pacientes que tienen artritis reumatoide, que exhiben una respuesta inadecuada a las terapias de inhibidor de TNF α con anticuerpos CD20, en donde los pacientes pueden tener evidencia radiográfica de por lo menos una articulación con erosión definida atribuible a la artritis reumatoide, según lo determinado por el sitio de lectura central (cualquier articulación de las manos, muñecas o pies con la excepción de las articulaciones DIP de las manos). Un punto final secundario potencial incluye el cambio en la calificación total radiográfica de Sharp modificada, la calificación de erosión y la calificación de estrechamiento de espacio en la articulación, las cuales pueden ser analizadas usando una metodología continua o categórica, según sea apropiado. Unos análisis y puntos finales exploratorios puede involucrar unos análisis radiográficos que incluyen la proporción de pacientes sin progresión erosiva, que puede ser evaluada a las 24 semanas y más. Véase también EE.UU. 2005/00001862, publicada el 25 de agosto de 2005 equivalente a WO 2005/060999, publicada el 7 de julio de 2005 con relación al tratamiento de pacientes que tienen artritis reumatoide con rituximab, en donde el punto final secundario potencial y los análisis y puntos finales exploratorios incluyen aquéllos en WO 2004/091657, *supra*.

A pesar de los avances en el tratamiento de la enfermedad de la articulación, un número significativo de pacientes no califican para los tratamientos actuales, o experimentan una respuesta insuficiente a los mismos. Por lo tanto, unas nuevas opciones de tratamiento, particularmente aquéllas que puedan apuntar a diferentes aspectos de la patología de la enfermedad

y ofrezcan niveles similares o mejores de beneficio clínico, son necesarias.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención involucra la administración de un antagonista CD20 que proporciona un régimen de tratamiento seguro y activo en sujetos con daño en una articulación, incluyendo la selección de un régimen de dosificación eficaz y un re-tratamiento programado o no programado. Este antagonista es efectivo tanto en la terapia inicial como en el manejo de la enfermedad refractaria.

Por consiguiente, la invención es como se reivindica. En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar el daño en una articulación en un sujeto, que comprende administrar un anticuerpo CD20 al sujeto y realizar al sujeto, por lo menos aproximadamente un mes después de la administración, una prueba radiográfica que mide una reducción en el daño en la articulación en comparación con una línea de base anterior a la administración, en donde la cantidad de anticuerpo CD20 administrada es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para monitorizar el tratamiento del daño en una articulación en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo CD20 al sujeto y medir por radiografía, después de por lo menos aproximadamente un mes desde la administración, si el daño en la articulación ha sido reducido sobre la línea de base antes de la administración, en donde una disminución versus la línea de base en el sujeto después del tratamiento indica que el anticuerpo CD20 está teniendo un efecto sobre el

daño en la articulación. En una realización preferida, el grado de reducción versus la línea de base es medido una segunda vez después de la administración del anticuerpo CD20.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para determinar si se continúa administrando un anticuerpo CD20 a un sujeto con daño en una articulación, que comprende medir por radiografía la reducción en el daño en la articulación en el sujeto después de administrar el anticuerpo CD20 una primera vez, medir por radiografía la reducción en el daño en la articulación en el sujeto después de administrar el anticuerpo CD20 una segunda vez, comparar las calificaciones de radiografía en el sujeto en la primera vez y en la segunda vez, y si la calificación es menor en la segunda vez que en la primera vez, continuar la administración del anticuerpo CD20.

En aún otro aspecto, la invención está dirigida a un artículo de elaboración, que comprende:

(a) un recipiente que comprende un anticuerpo CD20; y

(b) un inserto de empaque con instrucciones para tratar el daño en la articulación en un sujeto, en donde las instrucciones indican que se administra al sujeto el anticuerpo CD20 y entonces es sometido, por lo menos aproximadamente un mes después de la administración, a un prueba radiográfica que mide una reducción en el daño en la articulación en comparación con una línea de base antes de la administración, en donde la cantidad de anticuerpo CD20 administrada es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación.

En un aspecto preferido, el artículo comprende adicionalmente un recipiente que comprende un segundo medicamento, en donde el anticuerpo CD20 es un primer

medicamento, que comprende adicionalmente unas instrucciones en el inserto de empaque para tratar al sujeto con una cantidad efectiva del segundo medicamento.

En otra realización de la invención, se proporciona un método para tratar el daño en una articulación en un sujeto, que comprende administrar un anticuerpo CD20 al sujeto, y realizar al sujeto, por lo menos aproximadamente 52 semanas después de la administración, una prueba radiográfica que mide una reducción en el daño en la articulación en comparación con una línea de base antes de la administración, en donde la cantidad de anticuerpo CD20 administrada es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación.

En otra realización adicional, la invención proporciona un método para monitorizar el tratamiento del daño en una articulación en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo CD20 al sujeto y medir por radiografía, después de por lo menos aproximadamente 52 semanas desde la administración, si el daño en la articulación ha sido reducido sobre la línea de base antes de la administración, en donde una disminución versus la línea de base en el sujeto después del tratamiento indica que el anticuerpo CD20 está teniendo un efecto sobre el daño en la articulación.

Adicionalmente, la invención proporciona un artículo de elaboración, que comprende:

(a) un recipiente que comprende un anticuerpo CD20; y

(b) un inserto de empaque con instrucciones para tratar el daño en la articulación en un sujeto, en donde las instrucciones indican que se administra al sujeto el anticuerpo CD20 y entonces es sometido, por lo menos aproximadamente 52

semanas después de la administración, a un prueba radiográfica que mide una reducción en el daño en la articulación en comparación con una línea de base antes de la administración, en donde la cantidad de anticuerpo CD20 administrada es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento del daño en una articulación en un sujeto, en donde (a) el sujeto ha exhibido una respuesta inadecuada a uno o más inhibidores anti-factor de necrosis tumoral (TNF); (b) el sujeto recibió por lo menos un curso previo de tratamiento con un anticuerpo CD20, y (c) el tratamiento comprende administrar por lo menos un curso adicional de tratamiento con un anticuerpo CD20.

Estos aspectos y otros aspectos adicionales será evidentes a partir del resto de la descripción, incluyendo los ejemplos y las reivindicaciones anexas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra el diseño de estudio para tratar pacientes con RA con control (placebo más MTX) o rituximab (1000 mg x 2) más MTX (Ejemplo 1 en la presente).

La FIG. 2 muestra las respuestas de ACR a los seis meses de pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 3 muestra las respuestas de ACR20 durante seis meses de pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 4 muestra los cambios en 328DS a los seis meses de pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 5 muestra las respuestas de EULAR a los seis meses de pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 6 muestra la enfermedad baja o remisión de EULAR a los seis meses de pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 7 muestra la proteína C-reactiva media (CRP) durante seis meses de pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 8 muestra la proporción de pacientes de RA con mejoría clínicamente relevante en la función a los seis meses, en donde los pacientes son tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 9 muestra el cambio de porcentaje en la calificación ACR establecida a los seis de pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 10 muestra el cambio en FACIT-F a los seis meses de pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 11 muestra los cambios en categorías SF-36 (salud mental y física) a los seis meses de pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 12 muestra el factor reumatoide total a los seis meses de pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 13 muestra el cambio medio en la calificación total Sharp-Genant a los seis meses de pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 14 muestra el cambio medio en la calificación de erosión Sharp-Genant a los seis meses de pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 15 muestra el cambio medio en la calificación de estrechamiento de espacio de articulación (JSN) Sharp-Genant a los seis meses de pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 16 muestra la proporción de pacientes con RA sin cambio en la calificación de erosión a los seis meses, en donde los pacientes son tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 17 muestra el cambio en los puntos finales radiográficos a la semana 24 (punto final exploratorio) para pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 18 muestra el cambio porcentual medio en los parámetros establecidos esenciales de ACR a la semana 24 para pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 19 muestra el CD19 mediano a los seis meses de pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 20 muestra los eventos adversos reportados más comúnmente en el estudio de pacientes con RA durante seis meses, en donde los pacientes son tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 21 muestra los eventos adversos que conducen a un retiro en el estudio de pacientes con RA durante seis meses, en donde los pacientes son tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 22 muestra los eventos que ocurren durante/dentro de las 24 horas de las infusiones en el estudio de pacientes con RA durante seis meses, en donde los pacientes son tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 23 muestra las reacciones agudas a la infusión en el estudio de pacientes con RA durante seis meses, en donde los pacientes son tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 24 muestra los eventos adversos serios que ocurren durante/dentro de las 24 horas de las infusiones en el estudio de pacientes con RA durante seis meses, en donde los pacientes son tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 25 muestra infecciones e infestaciones de tipo orgánico en el sistema, en el estudio de pacientes con RA durante seis meses, en donde los pacientes son tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 26 muestra infecciones serias en el estudio de pacientes con RA durante seis meses, en donde los pacientes son tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 27 muestra la tasa de infección en el estudio de pacientes con RA durante seis meses, en donde los pacientes son tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 28 muestra HACA en el estudio de pacientes con RA durante seis meses, en donde los pacientes son tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 29 muestra los niveles de IgG durante seis meses en pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 30 muestra los niveles de IgA durante seis meses en pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 31 muestra los niveles de IgM durante seis meses en pacientes con RA tratados con control o con rituximab (1000 mg x 2) más MTX.

La FIG. 32A es una alineación de secuencias que compara las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena liviana (V_L) de cada uno de murino 2H7 (SEQ ID NO:1), variante 2H7.v16 humanizada (SEQ ID NO:2), y el subgrupo de cadena liviana kappa humano (SEQ ID NO:3). Las CDR de V_L de 2H7 y hu2H7.v16 son como sigue: CDR1 (SEQ ID NO:4), CDR2 (SEQ ID NO:5) y CDR3 (SEQ ID NO:6).

La FIG. 32B es una alineación de secuencias que compara las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada (V_H) de cada uno de murino 2H7 (SEQ ID NO:7), variante 2H7.v16 humanizada (SEQ ID NO:8) y la secuencia de consenso humana del subgrupo III de cadena pesada (SEQ ID NO:9). Las CDR de V_H de 2H7 y hu2H7.v16 son como sigue: CDR1 (SEQ ID NO:10), CDR2 (SEQ ID NO:11) y CDR3 (SEQ ID NO:12).

En la FIG. 32A y la FIG. 32B, CDR1, CDR2 y CDR3 en cada cadena están encerrados dentro de paréntesis, limitados por las regiones de armazón, FR1-FR4, como se indica. 2H7 se refiere al anticuerpo 2H7 de murino. Los asteriscos entre dos filas de secuencias indican las posiciones que son diferentes entre las dos secuencias. La numeración de los residuos es de acuerdo

con Kabat y col., *Sequences of Immunological Interest*, 5ª Ed. Servicio Público de Salud, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1991), con inserciones mostradas como a, b, c, d y e.

La FIG. 33 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena 2H7.v16 L madura (SEQ ID NO:13).

La FIG. 34 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena 2H7.v16 H madura (SEQ ID NO:14).

La FIG. 35 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena 2H7.v31 H madura (SEQ ID NO:15). La cadena L de 2H7.v31 es la misma que para 2H7.v16.

La FIG. 36 es una alineación de secuencias que compara las secuencias de aminoácidos de cadena liviana de la variante 2H7.v16 humanizada (SEQ ID NO:2) y la variante 2H7.v138 humanizada (SEQ ID NO:28).

La FIG. 37 es una alineación de secuencias que compara las secuencias de aminoácidos de cadena pesada de la variante 2H7.v16 humanizada (SEQ ID NO:8) y la variante 2H7.v138 humanizada (SEQ ID NO:29).

La FIG. 38 muestra una alineación de las cadenas livianas 2H7.v16 y 2H7.v511 maduras (SEQ ID NOS: 13 y 30, respectivamente), con numeración de residuos de dominio variable de Kabat y numeración de residuos de dominio constante Eu.

La FIG. 39 muestra una alineación de las cadenas pesadas 2H7.v16 y 2H7.v511 maduras (SEQ ID NOS:14 y 31, respectivamente), con numeración de residuos de dominio variable de Kabat y numeración de residuos de dominio constante Eu.

La FIG. 40A muestra la secuencia del dominio de cadena liviana variable 2H7.v114 humanizada (SEQ ID NO:32); La FIG. 40B muestra la secuencia del dominio de cadena pesada variable 2H7.v114 humanizada (SEQ ID NO:33); y la FIG. 40C muestra la secuencia de la cadena pesada de longitud total 2H7.v114 humanizada (SEQ ID NO:34), con numeración de residuos de dominio variable de Kabat y numeración de residuos de dominio constante Eu.

La FIG. 41 ilustra la disposición de los pacientes del ensayo clínico REFLEX a las 56 semanas, incluyendo tratamientos en curso de subgrupos de pacientes seleccionados de los ramales de tratamiento y placebo del ensayo clínico REFLEX de Fase III.

FIG. 42. Cambio en puntos finales radiográficos a la semana 56.

FIG. 43. Cambio medio en la calificación Sharp-Genant total con el tiempo.

FIG. 44. Distribución acumulativa del cambio en la calificación Sharp-Genant total.

FIG. 45. Análisis de sensibilidad: cambio en la calificación Sharp-Genant total.

FIG. 46. Pacientes sin cambios radiográficos a la semana 56.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

I. Definiciones

Una "célula B" es un linfocito que madura dentro de la médula ósea, e incluye una célula B ingenua, una célula B de memoria, o una célula B efectora (células plasmáticas). La célula B en la presente es una célula B normal o no maligna.

Un "marcador de superficie de célula B" o "antígeno de superficie de célula B" en la presente es un antígeno expresado sobre la superficie de una célula B que puede ser apuntado con un antagonista que se une al mismo. Unos ejemplos de marcadores de superficie de célula B incluyen los marcadores de superficie de leucocitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw76, CD77, CDw78, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86 (para las descripciones, véase el Libro de Hechos sobre Antígenos de Leucocitos, 2ª Edición, 1997, ediciones Barclay y col., Academic Press, Harcourt Brace & Co., Nueva York). Otros marcadores de superficie de célula B incluyen RP105, FcRH2, CR2 de célula B, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA y 239287. El marcador de superficie de célula B de interés particular es expresado de preferencia sobre células B en comparación con otros tejidos de un mamífero que no son células B y puede ser expresado sobre las células B precursoras y las células B maduras. Los marcadores de superficie de células B preferidos en la presente son CD20 y CD22.

El antígeno "CD20", o "CD20", es una fosfoproteína no glucosilada, de aproximadamente 35 kDa, encontrada sobre la superficie de más del 90% de células B de la sangre periférica o los órganos linfoides. CD20 está presente sobre células B normales así como células B malignas, pero no es expresado sobre células germinales. Otros nombres para CD20 en la literatura incluyen "antígeno restringido a linfocitos B" y "Bp35". El antígeno CD20 es descrito en Clark y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 1766 (1985), por ejemplo.

El antígeno "CD22", o "CD22", también conocido como BL-CAM o Lyb8, es una glicoproteína de membrana integral tipo 1 con un peso molecular de aproximadamente 130 (reducido) a 140 kD (no reducido). Es expresado en el citoplasma y la membrana celular de los linfocitos B. El antígeno CD22 aparece temprano en la diferenciación de linfocitos de células B aproximadamente en la misma etapa que el antígeno CD19. A diferencia de otros marcadores de células B, la expresión en membrana de CD22 está limitada a las etapas tardías de diferenciación comprendidas entre las células B maduras (CD22+) y las células plasmáticas (CD22-). El antígeno CD22 es descrito, por ejemplo, en Wilson y col., *J. Exp. Med.* 173: 137 (1991) y en Wilson y col., *J. Immunol.* 150: 5013 (1993).

Un "antagonista" es una molécula que, al unirse a CD20 en las células B, destruye o vacía las células B en un mamífero y/o interfiere con una o más funciones de las células B, por ejemplo reduciendo o impidiendo una respuesta humoral producida por la célula B. El antagonista es preferiblemente capaz de reducir las células B (es decir, reducir los niveles de células B en circulación) en un mamífero tratado con el mismo. Tal depleción puede ser lograda por medio de varios mecanismos tales como ADCC y/o CDC, inhibición de la proliferación de células B y/o inducción de muerte de las células B (por ejemplo por apoptosis). Los antagonistas incluidos dentro del alcance de la presente invención incluyen anticuerpos, péptidos sintéticos o de secuencia nativa, inmunoadhesinas y antagonistas de molécula pequeña que se unen a CD20, opcionalmente conjugados con otra molécula o fusionados a la misma. El antagonista preferido comprende un anticuerpo

Un "antagonista de anticuerpo" en la presente es un anticuerpo que, al unirse a un marcador de superficie de célula B sobre células B, destruye o vacía las células B en un mamífero y/o interfiere con una o más funciones de las células B, por ejemplo reduciendo o impidiendo una respuesta humoral producida por la célula B. El antagonista de anticuerpo es preferiblemente capaz de reducir las células B (es decir, reducir los niveles de células B en circulación) en un mamífero tratado con el mismo. Tal depleción puede ser lograda por medio de varios mecanismos tales como ADCC y/o CDC, inhibición de la proliferación de células B y/o inducción de muerte de las células B (por ejemplo por apoptosis).

El término "anticuerpo" en la presente es usado en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, comprendiendo preferiblemente la región de unión a antígeno del mismo. Unos ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Para los fines en la presente, un "anticuerpo intacto" es uno que comprende los dominios variables pesado y liviano así como una región Fc.

Un "anticuerpo que se une a un marcador de superficie de célula B" es una molécula que, al unirse a un marcador de superficie de célula B, destruye o vacía las células B en un mamífero y/o interfiere con una o más funciones de las células B, por ejemplo reduciendo o impidiendo una respuesta humoral producida por la célula B. El anticuerpo es preferiblemente capaz de reducir las células B (es decir, reducir los niveles de células B en circulación) en un mamífero tratado con el mismo. Tal depleción puede ser lograda por medio de varios mecanismos tales como ADCC y/o CDC, inhibición de la proliferación de células B y/o inducción de muerte de las células B (por ejemplo por apoptosis). En una realización preferida, el marcador de superficie de célula B es CD20 o CD22, de modo que el anticuerpo que se une a un marcador de superficie de célula B es un anticuerpo que se une a CD20 o CD22, respectivamente, o un "anticuerpo CD20" o "anticuerpo CD22", respectivamente. Unos ejemplos de anticuerpos CD22 incluyen aquéllos descritos en EP 1.476.129 (Tedder y Tuscano), EP 1.485.130 (Tedder) y EP 1.504.035 (Popplewell y col.), así como aquéllos descritos en EE.UU. 2004/0258682 (Leung y col.). En una realización aún más preferida, el anticuerpo es un anticuerpo CD20. Una realización particularmente preferida es un anticuerpo CD20 o CD22, preferiblemente un anticuerpo CD20.

Unos ejemplos de anticuerpos CD20 incluyen: "C2B8", el cual es ahora llamado "rituximab" ("RITUXAN®/MABTHERA®") (Patente de EE.UU. N° 5.736.137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con itrio-[90] designado como "Y2B8" o "Ibritumomab Tiuxetan" (ZEVALIN®) disponible en el comercio de Biogen Idec, Inc. (por ejemplo, Patente de EE.UU. N° 5.736.137; 2B8 depositado en la

ATCC bajo el N° de acceso HB11388 el 22 de junio de 1993); IgG2a murina "B1", también llamada "Tositumomab", opcionalmente marcada con I^{131} para generar el anticuerpo "131I-B1" o "tositumomab yodo I131" (BEXXAR™) disponible en el comercio de Corixa (véase también, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.595.721); el anticuerpo monoclonal murino "1F5" (por ejemplo, Press y col., *Blood* 69(2):584-591 (1987)) y variantes del mismo incluyendo 1F5 "de armazón parcheado" o humanizado (por ejemplo, WO 2003/002607, Leung, S.; depósito ATCC HB-96450); anticuerpo 2H7 murino y 2H7 quimérico (por ejemplo, Patente de EE.UU. N° 5.677.180); un 2H7 humanizado (por ejemplo, WO 2004/056312 (Lowman y col.) y como se expone más adelante); anticuerpo de alta afinidad, totalmente humano HUMAX-CD20™ que apunta a la molécula CD20 en la membrana celular de 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)); los anticuerpos monoclonales humanos expuestos en WO 2004/035607 y WO 2005/103081 (Teeling y col., GenMab/Medarex); los anticuerpos que tienen cadenas de azúcar enlazadas a N-glucósido complejas unidas a la región Fc descritos en EE.UU. 2004/0093621 (Shitara y col.); anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión de antígeno que se unen a CD20 (por ejemplo, WO 2005/000901, Tedder y col.) tales como HB20-3, HB20-4, HB20-25 y MB20-11; proteínas de cadena única que se unen a CD20 (por ejemplo, EE.UU. 2005/0186216 (Ledbetter y Hayden-Ledbetter); EE.UU. 2005/0202534 (Hayden-Ledbetter y Ledbetter); EE.UU. 2005/0202028 (Hayden-Ledbetter y Ledbetter); EE.UU. 2005/0202023 (Hayden-Ledbetter y Ledbetter) - Trubion Pharm Inc.); moléculas de unión a CD20 tales como la serie AME

series de anticuerpos, por ejemplo los anticuerpos AME-33TM como se expone, por ejemplo, en WO 2004/103404 y EE.UU. 2005/0025764 (Watkins y col., Applied Molecular Evolution, Inc.) y los anticuerpos CD20 con mutaciones Fc como se expone, por ejemplo, en WO 2005/070963 (Allan y col., Applied Molecular Evolution, Inc.); moléculas de unión a CD20 tales como aquéllas descritas en WO 2005/016969 y EE.UU. 2005/0069545 (Carr y col.); anticuerpos biespecíficos como se expone, por ejemplo, en WO 2005/014618 (Chang y col.); anticuerpos monoclonales LL2 humanizados como se describe, por ejemplo, en EE.UU. 2005/0106108 (Leung y Hansen; Immunomedics); anticuerpos B-Ly1 quiméricos o humanizados a CD20 como se describe, por ejemplo, en WO2005/044859 y EE.UU. 2005/0123546 (Umana y col.; GlycArt Biotechnology AG); anticuerpo A20 o variantes del mismo tales como el anticuerpo A20 quimérico o humanizado (cA20, hA20, respectivamente) e IMMUN-106 (por ejemplo, EE.UU. 2003/0219433, Immunomedics); y los anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 disponibles del Taller Internacional de Determinación de Tipos de Leucocitos (por ejemplo, Valentine y col., en: *Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987))). Los anticuerpos CD20 preferidos en la presente son los anticuerpos CD20 quiméricos, humanizados o humanos, de preferencia rituximab, un 2H7 humanizado, anticuerpo A20 quimérico o humanizado (Immunomedics), anticuerpo CD20 humano HUMAX-CD20TM (Genmab) e inmunoglobulinas/proteínas que se unen a CD20 (Trubion Pharm Inc.).

Los términos "rituximab" o "RITUXAN®" se refieren en la presente al anticuerpo monoclonal murino/humano diseñado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20 y designado

"C2B8" en la Patente de EE.UU. N° 5.736.137, incluyendo fragmentos del mismo que retienen la capacidad de unión a CD20.

Puramente para los fines de la presente y a menos que se indique lo contrario, un "2H7 humanizado" se refiere a un anticuerpo CD20 humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis de las siguientes secuencias de CDR:

secuencia de CDR L1 RASSSVSYXH en la cual X es M o L (SEQ ID NO:35), por ejemplo, SEQ ID NO:4 (Fig. 32A),

secuencia de CDR L2 de SEQ ID NO:5 (Fig. 32A),

secuencia de CDR L3 QQWXFNPPT en la cual X es S o A (SEQ ID NO:36), por ejemplo, SEQ ID NO:6 (Fig. 32A),

secuencia de CDR H1 de SEQ ID NO:10 (Fig. 32B),

secuencia de CDR H2 de AIYPGNGXTSYNQKFKG en la cual X es D o A (SEQ ID NO:37), por ejemplo, SEQ ID NO:11 (Fig. 32B), y

secuencia de CDR H3 de VVYYSXXYWYFDV en la cual X en la posición 6 es N, A, Y, W o D, y X en la posición 7 es S o R (SEQ ID NO:38), por ejemplo, SEQ ID NO:12 (Fig. 32B).

Los anticuerpos 2H7 humanizados en la presente incluyen aquéllos con secuencias de aminoácidos de cadena pesada que contienen una lisina C-terminal y aquéllos sin la misma. Las secuencias de CDR anteriores están generalmente presentes dentro de secuencias de armazón pesado variable y liviano variable humano, tales como sustancialmente los residuos FR de consenso humanos del subgrupo I kappa de cadena liviana humano (V_L6I), y sustancialmente los residuos FR de consenso humanos del subgrupo III de cadena pesada humano (V_HIII). Véase también WO 2004/056312 (Lowman y col.).

La región pesada variable puede ser unida a una región constante de cadena de IgG humana, en donde la región puede ser, por ejemplo, IgG1 o IgG3, incluyendo regiones constantes de secuencia nativa y secuencia no nativa.

En una realización preferida, tal anticuerpo comprende la secuencia de dominio pesado variable de SEQ ID NO:8 (v16, como se muestra en la Fig. 32B), opcionalmente comprendiendo también la secuencia de dominio liviano variable de SEQ ID NO:2 (v16, como se muestra en la Fig. 32A), que comprende opcionalmente una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 56, 100 y/o 100a, por ejemplo D56A, N100A o N100Y y/o S100aR en el dominio pesado variable y una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 32 y/o 92, por ejemplo M32L y/o S92A, en el dominio liviano variable. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo intacto que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena liviana de SEQ ID NO:13 o 30, y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO:14, 15, 29, 31, 34, o 39, la secuencia de SEQ ID NO:39 siendo proporcionada más adelante.

Un anticuerpo 2H7 humanizado preferido es ocrelizumab (Genentech, Inc.).

El anticuerpo en la presente puede comprender adicionalmente por lo menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que mejora la actividad de ADCC, tal como uno en el cual las sustituciones de aminoácidos están en las posiciones 298, 333 y 334, preferiblemente S298A, E333A y K334A, usando la numeración Eu de residuos de cadena pesada. Véase también la Patente de EE.UU. N° 6.737.056, L. Presta.

Cualquiera de estos anticuerpos puede comprender por lo menos una sustitución en la región Fc que mejora la unión a FcRn o la vida media en suero, por ejemplo una sustitución en la posición 434 de cadena pesada, tal como N434W. Véase también la Patente de EE.UU. N° 6.737.056, L. Presta.

Cualquiera de estos anticuerpos puede comprender adicionalmente por lo menos una sustitución de aminoácido que aumenta la actividad de CDC, por ejemplo comprendiendo por lo menos una sustitución en la posición 326, preferiblemente K326A o K326W. Véase también la Patente de EE.UU. N° 6.528.624, Idusogie y col.

Algunas variantes 2H7 humanizadas preferidas son aquéllas que comprenden el dominio liviano variable de SEQ ID NO:2 y the el dominio pesado variable de SEQ ID NO:8, incluyendo aquéllas con o sin sustituciones en una región Fc (si está presente), y aquéllas que comprenden un dominio pesado variable con alteración en SEQ ID NO:8 de N100A; o D56A y N100A; o D56A, N100Y y S100aR; y un dominio liviano variable con alteración en SEQ ID NO:2 de M32L; o S92A; o M32L y S92A.

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

En un resumen de algunas realizaciones varias preferidas de la invención, la región variable de las variantes basadas en 2H7.v16 comprende las secuencias de aminoácidos de v16 excepto en las posiciones de sustituciones de aminoácidos que están indicadas en la tabla a continuación. A menos que se indique lo contrario, las variantes 2H7 tendrán la misma cadena liviana que aquélla de v16.

Ejemplos de Variantes de Anticuerpo 2H7 Humanizado

Versión de 2H7	Cambios (V _H) de cadena pesada	Cambios (V _L) de cadena liviana	Cambios de 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, K322A, K334A,
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K326A, E333A, K334A,
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K326A, E333A, K334A, N434W
375	-	-	K334L
588	-	-	S298A, K326A, E333A, K334A
511	D56A, N100Y, S100aR	M32L, S92A	S298A, K326A, E333A, K334A

Un 2H7 humanizado preferido comprende la secuencia de dominio liviano variable 2H7.v16 variable:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG
SGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:2);

y la secuencia de dominio pesado variable 2H7.v16:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFVDVWGQGTLLTVSS
(SEQ ID NO:8).

Cuando el anticuerpo 2H7.v16 humanizado es un anticuerpo intacto, puede comprender la secuencia de aminoácidos de cadena liviana:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASSSVSYMHWWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG
SGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13);

y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID
NO:14 o:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYNSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHY
TQKSLSLSPG (SEQ ID NO:15).

Otro anticuerpo 2H7 humanizado preferido comprende la
secuencia de dominio liviano variable 2H7.v511:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG
SGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:39)

y la secuencia de dominio pesado variable 2H7.v511:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWFYFDVWGQGLTVTVSS
(SEQ ID NO:40).

Cuando el anticuerpo 2H7.v511 humanizado es un anticuerpo
íntacto, puede comprender la secuencia de aminoácidos de cadena
liviana:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG
SGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:30)

y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO:31 o:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPNGATSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVWGQGT LVT VSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNAAALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHY
TQKSLSLSPG (SEQ ID NO:41).

Véanse las Figuras 38 y 39, las cuales alinean las cadenas liviana y pesada maduras, respectivamente, de 2H7.v511 humanizado con 2H7.v16 humanizado usando la secuencia de lisina C-terminal para la cadena pesada.

Cuando el anticuerpo 2H7.v31 humanizado es un anticuerpo intacto, puede comprender la secuencia de aminoácidos de cadena liviana:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13)

y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO:15 o:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFVDVWGQGTLLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHY
TQKSLSLSPG (SEQ ID NO:42) o:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWFVDVWGQGTLLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNAALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHY
TQKSLSLSPG (SEQ ID NO:43).

Una realización preferida en la presente es cuando el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende la secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:2 y 8 (versión 16). Otra realización preferida es cuando el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:39 y 40 (versión 511). Se prefiere adicionalmente cuando el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:32 y 33 (véase la Figura 40, re. versión 114), tal como uno que comprende el dominio de cadena liviana variable en SEQ ID NO:32 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO:34. Se prefiere adicionalmente cuando el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende un dominio de cadena pesada variable con alteración N100A, o D56A y N100A,

o D56A, N100Y y S100aR en SEQ ID NO:8 y un dominio de cadena liviana variable con alteración M32L, o S92A, o M32L y S92A en SEQ ID NO:2.

"Citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por célula en la cual unas células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR por sus siglas en inglés) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK) por sus siglas en inglés), neutrófilos y macrófagos) reconocen un anticuerpo unido en una célula objetivo y causan subsiguientemente la lisis de la célula objetivo. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas es resumida en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Ann. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, un ensayo de ADCC in vitro, tal como aquél descrito en las Patentes de EE.UU. Nos. 5.500.362 o 5.821.337, puede ser realizado. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) y las células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede ser evaluada in vivo, por ejemplo en un modelo animal tal como aquél descrito en Clynes y col., *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan por lo menos FcγRIII y llevan a cabo una función efectora de ADCC. Unos ejemplos de leucocitos humanos

que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; las PBMC y células NK siendo preferidas.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" son usados para describir un receptor que se enlaza a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que une un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente divididas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), los cuales tienen unas secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM por sus siglas en inglés) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM por sus siglas en inglés) en su dominio citoplásmico. (Véase Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR son revisados 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). Otros FcR, incluyendo aquéllos a ser identificados en el futuro, son abarcados por el término "FcR" en la presente. El término también incluye al receptor neonatal, FcRn, el cual es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto

(Guyer y col., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim y col., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula para efectuar la lisis de un objetivo en la presencia de complemento. La trayectoria de activación de complemento es iniciada por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo un anticuerpo) en complejo con un antígeno cognado. Para evaluar la activación de complemento, un ensayo de CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), puede ser realizado.

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

Los anticuerpos que "inducen apoptosis" son aquéllos que inducen la muerte de células programadas, por ejemplo de una célula B, según lo determinado por ensayos de apoptosis estándar, tales como unión de anexina V, fragmentación de ADN, contracción celular, dilación del retículo endoplasmático, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (llamadas cuerpos apoptóticos).

Los "anticuerpos nativos" son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas livianas (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena liviana está enlazada a una cadena pesada por un enlace de disulfuro covalente, mientras

que el número de enlaces de disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y liviana también tiene puentes de disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene, en un extremo, un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena liviana tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena liviana está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena liviana está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que unos residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena liviana y cadena pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos y son usadas en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida de manera regular en todos los dominios variables de anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos llamados regiones hipervariables en los dominios variables de cadena liviana y de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables son llamadas regiones de armazón (FR por sus siglas en inglés). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesadas y livianas nativas comprende cuatro FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina β , conectada por tres regiones hipervariables, las cuales forman espiras que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones

hipervariables en cada cadena son mantenidas conjuntamente en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en ADCC.

La digestión por papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio único de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar rápidamente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de unión a antígeno y es aún capaz de enlazar transversalmente el antígeno.

"Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y unión de antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena liviana en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión de antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L . Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad

de reconocer y unir un antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión entero.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena liviana y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos a la terminación carboxi del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente para un Fab' en el cual uno o más residuos de cisteína de los dominios constantes portan por lo menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ eran originalmente producidos como pares de los fragmentos Fab' que tienen cisteínas esenciales entre ellos. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos son también conocidos.

Las "cadenas livianas" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados pueden ser asignadas a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos pueden ser asignados a diferentes clases. Existen cinco clases mayores de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de éstos pueden ser adicionalmente divididos en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos son llamados α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y las

configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena simple" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazador de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión del scFv, véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión de antígeno, dichos fragmentos comprendiendo un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena liviana (V_L) en la misma cadena de polipéptido ($V_H - V_L$). Al usar un enlazador que es demasiado corto para permitir el pareo entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a parearse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión de antígeno. Los diacuerpos son descritos de manera más completa en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

El término "anticuerpo monoclonal" según se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o unen el mismo epítipo, excepto por variantes posibles que puedan surgir durante la producción del anticuerpo

monoclonal, tales variantes estando generalmente presentes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como siendo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe ser considerado como requiriendo la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser usados de acuerdo con la presente invención pueden ser elaborados por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o pueden ser elaborados por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden ser aislados de bibliotecas de anticuerpos fagos usando las técnicas descritas en Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en la presente incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de dichas una o más cadenas

es idéntico u homólogo a la secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Patente de EE.UU. N° 4.816.567; Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión de antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del Viejo Mundo, tal como mandril, mono rhesus o cynomolgus) y secuencias de regiones constantes humanas (Patente de EE.UU. N° 5.693.780).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región hipervariable del receptor son reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de región de armazón (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados con residuos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no son encontrados en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones son efectuadas para refinar adicionalmente el desempeño del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y

típicamente dos, dominios variables, en donde todas o sustancialmente todas las espiras hipervariables corresponden a aquéllas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son aquéllas de una secuencia de inmunoglobulina humana, excepto por una o más sustituciones de FR como se indicó anteriormente. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente aquélla de una inmunoglobulina humana. Para unos detalles adicionales, 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).

El término "región hipervariable", cuando es usado en la presente, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable comprende los 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) en el dominio variable de cadena liviana y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de una "espira hipervariable" (por ejemplo los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena liviana y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Los "residuos de armazón" o "FR" son aquellos residuos de dominio

variable diferentes de los residuos de región hipervariable como se definen en la presente.

Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo (como se define en la presente) que no está conjugado a una molécula heteróloga, tal como una porción citotóxica, polímero o radiomarcador.

Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos y no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo será purificado (1) hasta más de 95% en peso de anticuerpo según lo determinado por el método de Lowry, y de mayor preferencia más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácido N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza de giro, o (3) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones de reducción o no reducción usando coloración azul Coomassie o, preferiblemente, plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes ya que por lo menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, el anticuerpo aislado será preparado por al menos un paso de purificación.

El "daño en una articulación" es usado en el sentido más amplio y se refiere al daño o la destrucción parcial o completa de cualquier parte de una o más articulaciones, incluyendo el tejido conectivo y el cartílago, en donde el daño incluye daño estructural y/o funcional de cualquier causa, y puede causar o

no causar dolor/artralgia de la articulación. Incluye, sin limitación, el daño de articulación asociado con o resultante de una enfermedad inflamatoria de la articulación así como una enfermedad no inflamatoria de la articulación. Este daño puede ser causado por cualquier condición, tal como una enfermedad autoinmune tal como lupus (por ejemplo lupus sistémico eritematoso), artritis (por ejemplo artritis aguda y crónica, artritis reumatoide incluyendo artritis reumatoide de inicio juvenil, artritis idiopática juvenil (JIA) o RA juvenil (JRA), y etapas tales como sinovitis reumatoide, gota o artritis gotosa, artritis inmunológica aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis inducida por colágeno tipo II, artritis infecciosa, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis por soriasis, enfermedad de Still, artritis vertebral, osteoartritis, artritis crónica progrediente, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva, artritis menopáusica, artritis por depleción de estrógeno y espondilitis anquilosante/espondilitis reumatoide), enfermedad autoinmune reumática diferente a RA, complicación sistémica significativa secundaria a RA (incluyendo pero no limitada a vasculitis, fibrosis pulmonar o síndrome de Felty), síndrome de Sjögren, tal síndrome secundario particular, vasculitis cutánea limitada secundaria con RA, espondiloartropatía seronegativa, enfermedad de Lyme, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerodermia, miopatía inflamatoria, enfermedad del tejido conectivo mezclado, cualquier síndrome de superposición, bursitis, tendinitis, osteomielitis, enfermedades infecciosas, incluyendo influenza, sarampión (rubéola), fiebre reumática, síndrome viral de

Epstein-Barr, hepatitis, paperas, sarampión alemán y varicela (lechina), Chondromalacia patellae, colitis colágena, trastornos autoinmune asociados con enfermedad del colágeno, inflamación de la articulación, esfuerzo inusual o uso excesivo tal como esguinces o torceduras, lesión incluyendo fractura, gota, especialmente encontrada en el dedo gordo del pie, así como causada por trastornos neurológicos, trastornos hemofílicos (por ejemplo artropatía hemofílica), trastornos musculares, trastornos progresivos, trastornos óseos, trastornos del cartílago y trastornos vasculares. Para los fines en la presente, las articulaciones son puntos de contacto entre elementos de un esqueleto (de un vertebrado tal como un animal) con las partes que lo rodean y lo soportan e incluyen, pero no están limitadas a, por ejemplo, cadenas, articulaciones entre las vértebras de la espina dorsal, articulaciones entre la espina dorsal y la pelvis (articulaciones sacroilíacas), articulaciones en donde los tendones y ligamentos se unen a los huesos, articulaciones entre las costillas y la espina dorsal, hombros, rodillas, pies, codos, manos, dedos de la mano, tobillos y dedos del pie, pero especialmente las articulaciones en las manos y los pies.

Un "sujeto" en la presente es un sujeto humano, incluyendo un paciente, elegible para el tratamiento, que está experimentando o ha experimentado uno o más signos, síntomas u otros indicadores de daño en la articulación, ha sido diagnosticado con daño en la articulación, ya sea, por ejemplo, recién diagnosticado o previamente diagnosticado y que está experimentando ahora una recurrencia o relapso, o está en riesgo de desarrollar daño en la articulación, sin importar la

causa. El sujeto puede haber sido tratado previamente con anticuerpo CD20 o no tratado de ese modo. Un sujeto elegible para el tratamiento del daño en la articulación puede ser opcionalmente identificado como uno que ha sido sometido a despistaje, por ejemplo en la sangre, para detectar niveles elevados de células CD20 infiltrantes o es sometido a despistaje usando un ensayo para detectar auto-anticuerpos, en donde la producción de auto-anticuerpos es evaluada cualitativamente, y preferiblemente cuantitativamente. El sujeto puede ser ingenuo a un segundo medicamento que está siendo usado cuando el tratamiento es comenzado, es decir, el sujeto no ha sido tratado previamente con, por ejemplo, un agente inmunosupresor tal como metotrexato en la "línea de base" (es decir, en un punto establecido en el tiempo antes de la administración de una primera dosis de anticuerpo CD20 en el método de tratamiento en la presente, tal como el día de despistaje del sujeto antes de que el tratamiento sea comenzado). Tales sujetos son generalmente considerados como candidatos para tratamiento con tal segundo medicamento.

El "tratamiento" de un sujeto en la presente se refiere al tratamiento terapéutico y a las medidas profilácticas o preventivas. Aquéllos en necesidad de tratamiento incluyen aquéllos ya con daño en la articulación así como aquéllos en los cuales el daño en la articulación o el progreso del daño en la articulación debe ser impedido. Por lo tanto, el sujeto puede haber sido diagnosticado como teniendo un daño en la articulación o puede estar predispuesto o susceptible al daño en la articulación, o puede tener un daño de articulación limitado, que es probable que progrese en ausencia de

tratamiento. El tratamiento es útil en la presente si el daño en la articulación es aliviado o sanado, o la progresión del daño en la articulación o estructural es detenida o retardada en comparación con antes de la administración. Un tratamiento exitoso incluye adicionalmente una prevención completa o parcial del desarrollo del daño en la articulación. Para los fines en la presente, el retardo o la reducción del daño en la articulación o la progresión del daño en la articulación es igual a detención, disminución o reversión en el daño en la articulación.

Una "mejoría clínica" se refiere a la prevención de un progreso adicional de daño en la articulación o cualquier mejoría en el daño en la articulación como resultado del tratamiento, según lo determinado por un ensayo diferente a la prueba radiográfica. Así, la mejoría clínica puede ser determinada, por ejemplo, evaluando el número de articulaciones sensibles o hinchadas, el Índice de Severidad de Evaluación de Soriasis, una evaluación clínica global del sujeto, evaluación de la tasa de sedimentación de eritrocitos, o evaluación de la cantidad de nivel de proteína C-reactiva.

Para los fines en la presente, un sujeto está en "remisión" si no tiene síntomas de daño de articulación activo, tal como aquéllos detectables por los métodos descritos en la presente, y no ha tenido progresión de daño de articulación según lo evaluado en la línea de base o en un cierto punto en el tiempo durante el tratamiento. Aquéllos que no están en remisión incluyen, por ejemplo, aquéllos que experimentan un empeoramiento o una progresión del daño en la articulación. Tales sujetos que experimentan un retorno de los síntomas,

incluyendo daño de articulación activo, son aquéllos que han tenido un "relapso" o una "recurrencia".

Un "síntoma" del daño en la articulación es cualquier fenómeno mórbido o desviación de lo normal en estructura, función o sensación, experimentado por el sujeto e indicativo de daño en la articulación, tal como aquéllos indicados anteriormente, incluyendo articulaciones sensibles o hinchadas.

La expresión "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad del anticuerpo o antagonista que es efectiva para tratar el daño en la articulación, incluyendo una cantidad que es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación en comparación con la línea de base antes de la administración de tal cantidad según lo determinado por ensayo radiográfico. Una cantidad efectiva de otros medicamentos, tales como un segundo medicamento, es una cantidad de tal medicamento efectiva para tratar el daño en la articulación u otros efectos indeseables, incluyendo efectos o síntomas secundarios u otras condiciones que acompañan al daño en la articulación, incluyendo una enfermedad o trastorno subyacente.

La "calificación Sharp modificada total" significa una calificación obtenida para la evaluación de radiografías usando el método de acuerdo con Sharp, modificado por Genant, *Am. J. Med.*, 30: 35-47 (1983). La evaluación primaria será el cambio en la calificación Sharp-Genant total con respecto al despistaje. La calificación Sharp-Genant combina una calificación de la erosión y una calificación del estrechamiento del espacio de la articulación de manos y pies. El daño de la articulación es medido en esta calificación de ensayo por un cambio medio inferior a la calificación en la

línea de base (cuando el paciente es sometido a despistaje o ensayo antes de la primera administración de antagonista CD20 en la presente).

Según se usa en la presente, "artritis reumatoide" se refiere a un estado de enfermedad reconocido que puede ser diagnosticado de acuerdo con los criterios revisados en 2000 de la Asociación Reumatoide Americana para la clasificación de artritis reumatoide, o cualquier criterio similar. Los indicadores fisiológicos de RA incluyen: hinchazón simétrica de la articulación que es característica, aunque no invariable, en la artritis reumatoide. Hinchazón fusiforme de las articulaciones interfalangianas próximas (PIP por sus siglas en inglés) de las manos así como metacarpofalangianas (MCP por sus siglas en inglés); las muñecas, los codos, las rodillas, los tobillos y las articulaciones metatarsofalangianas (MTP por sus siglas en inglés) son comúnmente afectadas y la hinchazón es fácilmente detectada. El dolor en el movimiento pasivo es el ensayo más sensible para determinar inflamación de la articulación, y la inflamación y deformidad estructural a menudo limita el intervalo de movimiento para la articulación afectada. Los cambios visibles típicos incluyen desviación ulnar de los dedos en las articulaciones MCP, hiperextensión o hiperflexión de las articulaciones MCP y PIP, contractura de flexión de los codos, y sub-lujación de los huesos del carpo y dedos del pie. El sujeto con artritis reumatoide puede ser resistente a los DMARD, ya que los DMARD no son efectivos o totalmente efectivos en el tratamiento de los síntomas. Adicionalmente, los candidatos para terapia de acuerdo con esta invención incluyen aquéllos que han experimentado una respuesta

inadecuada a un tratamiento previo o actual con inhibidores de TNF tales como etanercept, infliximab y/o adalimumab debido a toxicidad o eficacia inadecuada (por ejemplo, etanercept por 3 meses a 25 mg dos veces por semana o por lo menos 4 infusiones de infliximab a 3 mg/kg). Un paciente con "artritis reumatoide activa" significa un paciente con síntomas activos y no latentes de artritis reumatoide. Los sujetos con "artritis reumatoide activa temprana" son aquéllos sujetos con artritis reumatoide activa diagnosticada por al menos 8 semanas pero no más de cuatro años, de acuerdo con los criterios de ACR revisados en 1987 para la clasificación de RA.

La artritis por soriasis (PsA) es una enfermedad inflamatoria de la articulación caracterizada por extensa resorción ósea. Como también se describe en la presente, las muestras de sangre de pacientes con PsA, particularmente aquéllos con erosiones óseas en radiografías simples, exhiben un aumento marcado en precursores de osteoclastos (OCP por sus siglas en inglés) en comparación con controles saludables.

La "exposición a anticuerpos" se refiere al contacto con o la exposición al anticuerpo en la presente en una o más dosis administradas durante un período de tiempo de aproximadamente 1 día hasta aproximadamente 5 semanas. Las dosis pueden ser administradas de una vez o en intervalos de tiempo fijos o irregulares durante este período de exposición, tal como, por ejemplo, una dosis semanal por cuatro semanas o dos dosis separadas por un intervalo de tiempo de aproximadamente 13-17 días. Las exposiciones inicial y posterior al anticuerpo son separadas en tiempo una de la otra, como se describe en detalle en la presente.

Una exposición que no es administrada o proporcionada hasta un cierto momento "desde la exposición inicial" o desde cualquier exposición previa significa que el tiempo para la exposición segunda o posterior es medido desde el momento en que cualesquiera de las dosis desde la exposición previa fueron administradas, si más de una dosis fue administrada en esa exposición. Por ejemplo, cuando dos dosis son administradas en una exposición inicial, la segunda exposición no es proporcionada hasta por lo menos aproximadamente 16-54 semanas según lo medido desde el momento en que la primera o la segunda dosis fue administrada dentro de esa exposición previa. Similarmente, cuando tres dosis son administradas, la segunda exposición puede ser medida desde el momento de la primera, segunda o tercera dosis dentro de la primera exposición. Preferiblemente, "desde la exposición inicial" o desde cualquier exposición media significa la medición desde el momento de la primera dosis.

El término "agente inmunosupresor" según se usa en la presente para terapia adjunta se refiere a unas sustancias que actúan para suprimir o enmascarar el sistema inmune del mamífero que está siendo tratado en la presente. Esto incluiría sustancias que suprimen la producción de citocinas, regulan hacia abajo o suprimen la auto-expresión de antígenos, o enmascaran los antígenos MHC. Unos ejemplos de tales agentes incluyen pirimidinas 2-amino-6-aril-5-sustituidas (véase la Patente de EE.UU. N° 4.665.077); medicamentos anti-inflamatorios no esteroides (NSAID por sus siglas en inglés); ganciclovir, tacrolimus, glucocorticoides tales como cortisol o aldosterona, agentes anti-inflamatorios tales como un inhibidor

de ciclooxigenasa, un inhibidor de 5-lipoxigenasa o un antagonista de receptor de leucotrieno; antagonistas de purina tales como azatioprina o micofenolato mofetil (MMF); agentes de alquilación tales como ciclofosfamida; bromocriptina; danazol; dapsona; glutaraldehído (el cual enmascara los antígenos MHC, como se describe en la Patente de EE.UU. N° 4.120.649); anticuerpos anti-idiotípicos para antígenos MHC y fragmentos MHC; ciclosporina A; esteroides tales como corticosteroides o glucocorticosteroides o análogos glucocorticoides, por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, incluyendo SOLU-MEDROL[®] succinato de sodio de metilprednisolona y dexametasona; inhibidores de dihidrofolato reductasa tales como metotrexato (oral o subcutáneo); agentes contra la malaria tales como cloroquina e hidroxicloroquina; sulfasalazina; leflunomida; antagonistas de citocina tales como anticuerpos de citocina o anticuerpos de receptor de citocina incluyendo anticuerpos anti-interferón-alfa, -beta o -gamma, anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa (infliximab (REMICADE[®]) o adalimumab), inmunoadhesina anti-TNF-alfa (etanercept), anticuerpos anti-TNF-beta, anticuerpos anti-interleucina-2 (IL-2) y anticuerpos de receptor anti-IL-2, y anticuerpos y antagonistas de receptor anti-interleucina-6 (IL-6); anticuerpos anti-LFA-1, incluyendo anticuerpos anti-CD11a y anti-CD18; anticuerpos anti-L3T4; globulina anti-linfocito heteróloga; anticuerpos pan-T, preferiblemente anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3 (WO 90/08187 publicada el 26/7/90); estreptoquinasa; factor-beta de crecimiento transformante (TGF-beta); estreptodornasa; ARN o ADN del huésped; FK506; RS-61443; clorambucil; deoxispergualin;

rapamicina; receptor de células T (Cohen y col., Patente de EE.UU. N° 5.114.721); fragmentos de receptor de células T (Offner y col., *Science*, 251: 430-432 (1991); WO 90/11294; Ianeway, *Nature*, 341: 482 (1989); y WO 91/01133); antagonistas de BAFF tales como anticuerpos de BAFF y anticuerpos de BR3 y antagonistas de zTNF4 (para una revisión, véase Mackay y Mackay, *Trends Immunol.*, 23:113-5 (2002)); agentes biológicos que interfieren con las señales coordinadoras de células T, tales como receptor anti-CD40 o ligando anti-CD40 (CD154), incluyendo anticuerpos de bloqueo a 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 anticuerpos de receptor de células T (EP 340.109) tales como T10B9. Algunos agentes inmunosupresores en la presente son también DMARD, tales como metotrexato. Unos ejemplos de agentes inmunosupresores preferidos en la presente incluyen ciclofosfamida, clorambucil, azatioprina, leflunomida, MMF o metotrexato.

El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra células como mediadores intercelulares. Unos ejemplos de tales citocinas son las linfocinas, monocinas; interleucinas (IL) tales como 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, incluyendo PROLEUKIN® rIL-2; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y ligando kit (KL por sus siglas inglés). Según se usa en la presente, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente

activos de las citocinas de secuencia nativa, incluyendo entidades de molécula pequeña producidas de manera sintética y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Un "antagonista de citocina" es una molécula que inhibe o antagoniza tales citocinas por cualquier mecanismo, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos a la citocina, anticuerpos al receptor de citocina, e inmunoadhesinas.

El término "hormona" se refiere a hormonas de polipéptidos, las cuales son generalmente secretadas por órganos glandulares con conductos. Entre las hormonas se incluyen, por ejemplo, la hormona del crecimiento tal como la hormona de crecimiento humano, la hormona de crecimiento humano de N-metionil y la hormona de crecimiento bovino; la hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; estradiol; terapia hormonal de reemplazo; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromoestanolona, epitioestanol, mepitioestano o testolactona; prorrelaxina; hormonas de glicoproteínas tales como la hormona folículo-estimulante (FSH por sus siglas en inglés), la hormona estimulante de la tiroides (TSH por sus siglas en inglés) y la hormona luteinizante (LH por sus siglas en inglés); prolactina, lactógeno de placenta, péptido asociado con gonadotropina de ratón, hormona de liberación de gonadotropina; inhibina; activina; sustancia inhibidora de mulleriana; y trombopoyetina. Según se usa en la presente, el término hormona incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos de la hormona de secuencia nativa, incluyendo entidades de molécula pequeña producidas de manera sintética y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

El término "factor de crecimiento" se refiere a unas proteínas que promueven el crecimiento, e incluyen, por ejemplo, factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; factor de crecimiento endotelial vascular; factor de crecimiento nervioso tal como NGF- β ; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor I y II de crecimiento similar a insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón- α , - β y - γ ; y factores de estimulación de colonias (CSF por sus siglas en inglés) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF). Según se usa en la presente, el término factor de crecimiento incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos del factor de crecimiento de secuencia nativa, incluyendo entidades de molécula pequeña producidas de manera sintética y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Para los fines en la presente, el "factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa)" se refiere a una molécula de TNF-alfa humana que comprende la secuencia de aminoácidos como se describe en Pennica y col., *Nature*, 312:721 (1984) o Aggarwal y col., *JBC*, 260:2345 (1985). Un "inhibidor de TNF-alfa" en la presente es un agente que inhibe, hasta cierto grado, una función biológica de TNF-alfa, generalmente a través de la unión a TNF-alfa y neutralizando su actividad. Unos ejemplos de inhibidores de TNF contemplados específicamente en la presente son etanercept (ENBREL®), infliximab (REMICADE®) and adalimumab (HUMIRA™).

Unos ejemplos de "medicamento anti-reumáticos modificadores de la enfermedad" o "DMARD" incluyen hidroxicloroquina, sulfasalazina, metotrexato, leflunomida, etanercept, infliximab (más metotrexato oral y subcutáneo), azatioprina, D-penicilamina, sales de oro (orales), sales de oro (intramusculares), minociclina, ciclosporina incluyendo ciclosporina A y ciclosporina tópica, proteína A de estafilococo (Goodyear y Silverman, *J. Exp. Med.*, 197, (9), p1125-39 (2003)), incluyendo sales y derivados de las mismas, etc. Un DMARD preferido en la presente es metotrexato.

Unos ejemplos de "medicamentos anti-inflamatorios no esteroides" o "NSAID" incluyen aspirina, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, flurbiprofeno, naproxeno, indometacina, sulindac, tolmetin, fenilbutazona, diclofenac, ketoprofeno, benorilato, ácido mefenámico, metotrexato, fenbufeno, azapropazona; inhibidores de COX-2 tales como celecoxib (CELEBREX®; 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il)bencenosulfonamida, valdecoxib (BEXTRA®), meloxicam (MOBIC®), GR 253035 (Glaxo Wellcome); y MK966 (Merck Sharp & Dohme), incluyendo sales y derivados de los mismos, etc. Preferiblemente, son aspirina, naproxeno, ibuprofeno, indometacina o tolmetin.

Unos ejemplos de "antagonistas o anticuerpos de integrina" en la presente incluyen un anticuerpo LFA-1, tal como efalizumab (RAPTIVA®) disponible en el comercio de Genentech, o un anticuerpo de integrina alfa 4 tal como natalizumab (ANTEGREN®) disponible de Biogen, o derivados de fenilalanina diazacíclica (WO 2003/89410), derivados de fenilalanina (WO 2003/70709, WO 2002/28830, WO 2002/16329 y WO 2003/53926),

derivados de ácido fenilpropiónico (WO 2003/10135), derivados de enamina (WO 2001/79173), derivados de ácido propanoico (WO 2000/37444), derivados de ácido alcanoico (WO 2000/32575), derivados de fenilo sustituido (Patentes de EE.UU. Nos. 6.677.339 y 6.348.463), derivados de amina aromática (Patente de EE.UU. N° 6.369.229), polipéptidos de dominio de desintegrina ADAM (US2002/0042368), anticuerpos a integrina alphavbeta3 (EP 633945), derivados de aminoácido bicíclico azaponteado (WO 2002/02556), etc.

Un "corticosteroide" se refiere a una cualquiera de varias sustanciales naturales o sintéticas con la estructura química general de los esteroides que imita o aumenta los efectos de los corticosteroides naturales. Unos ejemplos de corticosteroides sintéticos incluyen prednisona, prednisolona (incluyendo metilprednisolona, tal como SOLU-MEDROL[®] succinato de sodio de metilprednisolona), dexametasona o dexametasona triamcinolona, hidrocortisona y betametasona. Los corticosteroides preferidos en la presente son prednisona, metilprednisolona, hidrocortisona o dexametasona.

Los términos "BAFF", "polipéptido BAFF", "TALL-1" o "polipéptido TALL-1" y "BLys", cuando son usados en la presente, abarcan "polipéptidos BAFF de secuencia nativa" y "variantes BAFF". "BAFF" es una designación proporcionada a aquéllos polipéptidos que tienen una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas a continuación:

Secuencia de BAFF humano (SEQ ID NO:16):

1 MDDSTEREQSRLTSCCLKKREEMKLKECVSILPRKESPSVRSSKDGKLLAATLLLALLSCC
61 LTVVSFYQVAALQGD LASLRAELQGHHA EKLPAGAGAPKAGLEEAPAVTAGLKIFEPPAP
121 GEGNSSQNSRNKRAVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAL EE
181 KENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGH LIQRKKVHVFGDEL SLVTLFRCIQNMPETL
241 PNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL

Secuencia de BAFF de ratón (SEQ ID NO:17):

1 MDESAKTLPPPCLCFCSEKGEDMKVGYPDITPQKEEGAWFGICRDGRLLAATLLLALLSS
61 SFTAMSLYQLAALQADLMNLRMELQSYRGSATPAAAGAPELTAGVKLLTPAAPRPHNSSR
121 GHRNRRAFQGPETE QDVDLSAPPAPCLPGCRHSQHDDNGMNLRNIIQDCLQLIADSDTP
181 TIRKGTYTTFVPWLLSFKRGNAL EEKENKIVVRQTGYFFIYSQVLYTDPIFAMGHV IQRKK
241 VHVFGDEL SLVTLFRCIQNMPKTL PNNSCYSAGIARLEEGDEIQLAIPRENAQISRNGDD
301 TFFGALKLL

y homólogos y fragmentos y variantes de los mismos, que tienen la actividad biológica del BAFF nativo. Una actividad biológica de BAFF puede ser seleccionada del grupo consistente en promoción de supervivencia de células B, promoción de maduración de células B y unión a BR3. Las variantes de BAFF tendrán preferiblemente por lo menos 80% o cualquier entero sucesivo hasta 100% incluyendo, de preferencia, por lo menos 90%, e incluso de mayor preferencia, por lo menos 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia nativa de un polipéptido BAFF.

Un polipéptido BAFF de "secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido BAFF correspondiente derivado de la naturaleza. Por ejemplo, BAFF existe en forma soluble después de la división desde la superficie celular por proteasas tipo furina. Tales polipéptidos BAFF de secuencia nativa pueden ser aislados

de la naturaleza o pueden ser producidos por medios recombinantes y/o sintéticos.

El término "polipéptido BAFF de secuencia nativa" o "BAFF nativo" abarca específicamente las formas truncadas o secretadas naturales (por ejemplo una secuencia de dominio extracelular), las formas variantes naturales (por ejemplo, formas divididas alternativamente), y las variantes alélicas naturales del polipéptido. El término "BAFF" incluye aquéllos polipéptidos descritos en Shu y col., *J. Leukocyte Biol.*, 65:680 (1999); N° de Acceso a GenBank AF136293; WO 1998/18921 publicada el 7 de mayo de 1998; EP 869.180 publicada el 7 de octubre de 1998; WO 1998/27114 publicada el 25 de junio de 1998; WO 1999/12964 publicada el 18 de marzo de 1999; WO 1999/33980 publicada el 8 de julio de 1999; Moore y col., *Science*, 285:260-263 (1999); Schneider y col., *J. Exp. Med.*, 189:1747-1756 (1999) y Mukhopadhyay y col., *J. Biol. Chem.*, 274:15978-15981 (1999).

El término "antagonista de BAFF" según se usa en la presente es usado en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que (1) une un polipéptido BAFF de secuencia natural o una secuencia nativa de BR3 para bloquear parcial o totalmente la interacción de BR3 con el polipéptido BAFF y (2) bloquea, inhibe o neutraliza, total o parcialmente, la actividad del BAFF de secuencia nativa. En una realización preferida el receptor de BAFF a ser bloqueado es el receptor BR3. La actividad del BAFF nativo promueve, entre otras cosas, la supervivencia de las células B y/o la maduración de las células B. En una realización, la inhibición, el bloqueo o la neutralización de la actividad del BAFF resulta en una

reducción en el número de células B. Un antagonista de BAFF de acuerdo con esta invención bloqueará, inhibirá o neutralizará, parcial o totalmente, una o más actividades biológicas de un polipéptido BAFF, in vitro y/o in vivo. En una realización, un BAFF biológicamente activo potencia uno cualquiera o una combinación de los siguientes eventos in vitro y/o in vivo: una supervivencia aumentada de células B, un nivel aumentado de IgG y/o IgM, un número aumentado de células plasmáticas, y el procesamiento de NF- κ B2/100 a p52 NF- κ B en células B esplénicas (por ejemplo, Batten y col., *J. Exp. Med.*, 192:1453-1465 (2000); Moore y col., *Science* 285:260-263 (1999); Kayagaki y col., *Immunity* 17:515-524 (2002)).

Tal como se mencionó anteriormente, un antagonista de BAFF puede funcionar de una manera directa o indirecta para bloquear, inhibir o neutralizar, parcial o totalmente, la señalización de BAFF, in vitro o in vivo. Por ejemplo, el antagonista de BAFF puede unirse directamente a BAFF. Por ejemplo, los anticuerpos de BAFF que se unen dentro de una región de BAFF humano que comprende los residuos 162-275 y/o un residuo vecino de un residuo seleccionado del grupo consistente en 162, 163, 206, 211, 231, 233, 264 y 265 de BAFF humano de tal modo que el anticuerpo bloquee estéricamente la unión de BAFF a BR3, son contemplados, en donde tales números de residuo se refieren a SEQ ID NO:16. En otro ejemplo, un ligador directo es un polipéptido que comprende cualquier porción de un receptor de BAFF que une a BAFF, tal como un dominio extracelular de un receptor de BAFF, o fragmentos y variantes del mismo que se unen a BAFF nativo. En otro ejemplo, los antagonistas de BAFF incluyen los polipéptidos que tienen una

secuencia de un polipéptido que comprende la secuencia de la Fórmula I:

X_1 -C- X_3 -D- X_5 -L- X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} -C- X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17} (Fórmula I) (SEQ ID NO:18),

en la cual X_1 , X_3 , X_5 , X_7 , X_8 , X_9 , X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{14} , X_{15} y X_{17} son cualquier aminoácido excepto cisteína; y

en la cual X_{16} es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en L, F, I y V; y

en la cual el polipéptido no comprende una cisteína dentro de los siete residuos de aminoácido N-terminales a la cisteína C más N-terminal y C-terminales a la cisteína C más C-terminal de la Fórmula I.

En una realización, un polipéptido que comprende la secuencia de fórmula I tiene dos C unidas por enlace de disulfuro; X_5 L X_7 X_8 formando la conformación de una estructura de giro beta tipo 1 con el centro del giro entre L y X_7 ; y tiene un valor positivo para el ángulo diédrico phi de X_8 . En una realización, X_{10} es seleccionado del grupo consistente en W, F, V, L, I, Y, M y un aminoácido no polar. En otra realización, X_{10} es W. En otra realización, X_3 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en M, V, L, I, Y, F, W y un aminoácido no polar. En otra realización, X_5 es seleccionado del grupo consistente en V, L, P, S, I, A y R. En otra realización, X_7 es seleccionado del grupo consistente en V, T, I y L. En otra realización, X_8 es seleccionado del grupo consistente en R, K, G, N, H y un D-aminoácido. En otra realización, X_9 es seleccionado del grupo consistente en H, K, A, R y Q. En otra realización, X_{11} es I o V. En otra realización, X_{12} es seleccionado del grupo consistente en P, A, D, E y S. En otra

realización, X_{16} es L. En una realización específica, la secuencia de la Fórmula I es una secuencia seleccionada del grupo consistente en ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEQ ID NO:19), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEQ ID NO:20), ECFDLLVRRWVPCMLG (SEQ ID NO:21), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEQ ID NO:22), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEQ ID NO:23) y QCFDRLNAWVPCSVLK (SEQ ID NO:24). En una realización preferida, el antagonista de BAFF comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo consistente en SEQ ID NO:19, 20, 21, 22 y 23.

En aún otro ejemplo, los antagonistas de BAFF incluyen los polipéptidos que tienen una secuencia de un polipéptido que comprende la secuencia de la Fórmula II:

X_1 -C- X_3 -D- X_5 -L-V- X_8 - X_9 -W-V-P-C- X_{14} - X_{15} -L- X_{17} (Fórmula II) (SEQ ID NO:25),

en la cual X_1 , X_3 , X_5 , X_8 , X_9 , X_{14} , X_{15} y X_{17} son cualquier aminoácido, excepto cisteína; y

en la cual el polipéptido no comprende una cisteína dentro de los siete residuos de aminoácido N-terminales a la cisteína C más N-terminal y C-terminales a la cisteína C más C-terminal de la Fórmula II.

En una realización, un polipéptido que comprende la secuencia de la Fórmula II tiene un enlace de disulfuro entre las dos C y tiene la configuración de X_5 L X_7 X_8 formando una estructura de giro beta tipo I con el centro del giro entre L y X_7 ; y tiene un valor positivo para el ángulo diédrico phi de X_8 . En otra realización de la Fórmula II, X_3 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en M, A, V, L, I, Y, F, W y un aminoácido no polar. En otra realización de la fórmula II, X_5 es seleccionado del grupo consistente en V, L, P, S, I, A y

R. En otra realización de la fórmula II, X₈ es seleccionado del grupo consistente en R, K, G, N, H y D-aminoácido. En otra realización de la Fórmula II, X₉ es seleccionado del grupo consistente en H, K, A, R y Q.

En una realización adicional, el receptor de BAFF a partir del cual el dominio extracelular o fragmento de unión a BAFF o variante de unión a BAFF del mismo es derivado es TACI, BR3 o BCMA. Alternativamente, el antagonista de BAFF puede unir un dominio extracelular de un BR3 de secuencia nativa en su región de unión a BAFF para bloquear, inhibir o neutralizar, parcial o totalmente, la unión de BAFF a BR3 in vitro, in situ o in vivo. Por ejemplo, tal antagonista indirecto es un anticuerpo anti-BR3 que se une en una región de BR3 que comprende los residuos 23-38 de BR3 humano como se define más adelante (SEQ ID NO:26) o una región vecina de esos residuos de tal modo que la unión de BR3 humano a BAFF es estéricamente bloqueada.

En algunas realizaciones, un antagonista de BAFF de acuerdo con esta invención incluye anticuerpos de BAFF e inmunoadhesinas que comprenden un dominio extracelular de un receptor de BAFF, o fragmentos y variantes del mismo que unen BAFF nativo. En una realización adicional, el receptor de BAFF a partir del cual el dominio extracelular o fragmento de unión a BAFF o variante de unión a BAFF del mismo es derivado es TACI, BR3 o BCMA. En aún otra realización, la inmunoadhesina comprende una secuencia de aminoácidos de aquélla de la Fórmula I o la Fórmula II como se expuso anteriormente, incluyendo una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera del grupo consistente en SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 22, 23 y 24.

De acuerdo con una realización, el antagonista de BAFF se une a un polipéptido BAFF o un polipéptido BR3 con una afinidad de unión de 100 nM o menos. De acuerdo con otra realización, el antagonista de BAFF se une a un polipéptido BAFF o un polipéptido BR3 con una afinidad de unión de 10 nM o menos. De acuerdo con aún otra realización, el antagonista de BAFF se une a un polipéptido BAFF o un polipéptido BR3 con una afinidad de unión de 1 nM o menos.

Los términos "BR3", "polipéptido BR3" o "receptor BR3" cuando se usan en la presente abarcan "polipéptido BR3 de secuencia nativa" y "variantes de BR3" (los cuales son adicionalmente definidos en la presente). "BR3" es una designación proporcionada a aquellos polipéptidos que comprenden la siguiente secuencia de aminoácidos y homólogos de la misma, y variantes o fragmentos de la misma que unen BAFF nativo:

Secuencia de BR3 humano (SEQ ID NO:26):

1 MRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQ
61 ESGAGAGEAALPLPGLLFGAPALLGLALVLALVLVGLVSWRRRQRRLRGASSAEAPDGD
121 KDAPEPLDKVIILSPGISDATAPAWPPPGEDPGTTPPGHSPVPVPA TELGSTELVTTKTAG
181 PEQQ.

Los polipéptidos BR3 de la invención pueden ser aislados de una variedad de fuentes, tales como de tipos de tejido humano o de otra fuente, o preparados por métodos recombinantes y/o sintéticos. El término BR3 incluye los polipéptidos BR3 descritos en WO 2002/24909 y WO 2003/14294.

Un polipéptido BR3 de "secuencia nativa" o "BR3 nativo" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido BR3 correspondiente derivado de

la naturaleza. Tales polipéptidos BR3 de secuencia nativa pueden ser aislados de la naturaleza o pueden ser producidos por medios recombinantes y/o sintéticos. El término "polipéptido BR3 de secuencia nativa" abarca específicamente las formas truncadas, solubles o secretadas naturales (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), las formas variantes naturales (por ejemplo, formas alternativamente divididas) y variantes alélicas naturales del polipéptido. Los polipéptidos BR3 de la invención incluyen el polipéptido BR3 que comprende o consiste en la secuencia contigua de residuos de aminoácido 1 a 184 de un BR3 humano (SEQ ID NO:26).

Un "dominio extracelular" de BR3 o "ECD" se refiere a una forma del polipéptido BR3 que está esencialmente libre de los dominios citoplasmáticos y de transmembrana. Las formas ECD de BR3 incluyen un polipéptido que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo consistente en los aminoácidos 1-77, 2-62, 2-71, 1-61, 7-71, 23-38 y 2-63 de BR3 humano. La invención contempla unos antagonistas de BAFF que son polipéptidos que comprenden una cualquiera de las formas ECD antes mencionadas de BR3 humano y variantes y fragmentos de las mismas que unen un BAFF nativo.

Mini-BR3 es una región de núcleo de 26 residuos del dominio de unión a BAFF de BR3, es decir, la secuencia de aminoácidos: TPCVPAECFD LLVRHCVACG LLRTPR (SEQ ID NO:27)

"Variante de BR3" significa un polipéptido BR3 que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de un BR3 de longitud completa de secuencia nativa o ECD de BR3 y une un polipéptido BAFF de secuencia nativa. Opcionalmente, la

variante BR3 incluye un solo dominio rico en cisteína. Tales polipéptidos variantes de BR3 incluyen, por ejemplo, polipéptidos BR3 en los cuales uno o más residuos de aminoácido son añadidos, o eliminados, en la terminación N y/o C, así como dentro de uno o más dominios internos, de la secuencia de aminoácidos de longitud completa. Los fragmentos del ECD de BR3 que unen un polipéptido BAFF de secuencia nativa son también contemplados. De acuerdo con una realización, un polipéptido variante de BR3 tendrá por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 81% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 82% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 83% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 84% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 86% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 87% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 88% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 89% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 91% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 92% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 93% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 94% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 96% de

identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 97% de identidad de secuencia de aminoácidos, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia de aminoácidos o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido BR3 humano o un fragmento especificado del mismo (por ejemplo ECD). Los polipéptidos variantes de BR3 no abarcan la secuencia del polipéptido BR3 nativo. De acuerdo con otra realización, los polipéptidos variantes de BR3 tienen por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, por lo menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, por lo menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, por lo menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, por lo menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud o por lo menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud.

En una realización preferida, los antagonistas de BAFF en la presente son inmunoadhesinas que comprenden una porción de BR3, TACI o BCMA que une a BAFF, o variantes de las mismas que unen a BAFF. En otras realizaciones, el antagonista de BAFF es un anticuerpo de BAFF. Un "anticuerpo de BAFF" es un anticuerpo que une a BAFF, y preferiblemente une a BAFF dentro de una región del BAFF humano que comprende los residuos 162-275 de la secuencia de BAFF humano descrita en la presente bajo la definición de "BAFF" (SEQ ID NO:16). En otra realización, el antagonista de BAFF es un anticuerpo de BR3. Un "anticuerpo de BR3" es un anticuerpo que une a BR3, y es preferiblemente uno que une a BR3 dentro de una región del BR3 humano que comprende los residuos 23-38 de la secuencia de BR3 humano

descrita en la presente bajo la definición de "BR3" (SEQ ID NO:26). En general, las posiciones de aminoácidos del BAFF humano y el BR3 humano mencionadas en la presente están de acuerdo con la numeración de secuencia bajos BAFF humano y BR3 humano, SEQ ID NOS: 16 y 26, respectivamente, descritas en la presente bajo las definiciones de "BAFF" y "BR3".

Otros ejemplos de polipéptidos de unión a BAFF o anticuerpos de BAFF pueden ser encontrados en, por ejemplo, WO 2002/092620, WO 2003/014294, Gordon y col., *Biochemistry* 42(20):5977-5983 (2003), Kelley y col., *J. Biol. Chem.* 279 (16):16727-16735 (2004), WO 1998/18921, WO 2001/12812, WO 2000/68378 y WO 2000/40716.

Un "inserto de empaque" es usado para hacer referencia a las instrucciones usualmente incluidas en empaques comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, las contraindicaciones, otros productos terapéuticos a ser combinados con el producto envasado y/o advertencias con respecto al uso de tales productos terapéuticos, etc.

Un "medicamento" es un fármaco activo para tratar el daño en la articulación o sus síntomas o efectos secundarios.

II. Terapia

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar el daño en una articulación en un sujeto tal como un paciente, que comprende administrar al sujeto un antagonista, preferiblemente un anticuerpo, que se une a un marcador de superficie de célula B (de preferencia un anticuerpo CD20) y evaluar por rayos X radiográficos si el

sujeto ha mostrado una reducción en el daño en la articulación con el tratamiento.

Así, la invención contempla un método para tratar el daño en una articulación en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un antagonista que se une a un marcador de superficie de célula B y efectuar al sujeto, por lo menos aproximadamente un mes después de la administración, una prueba radiográfica que mide una reducción en el daño en la articulación en comparación con la línea de base antes de la administración, en donde la cantidad de antagonista administrado es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación, indicando que el sujeto ha sido tratado exitosamente para el daño en la articulación.

La invención también contempla un método para tratar el daño en una articulación en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo que se une a un marcador de superficie de célula B y efectuar al sujeto, por lo menos aproximadamente un mes después de la administración, una prueba radiográfica que mide una reducción en el daño en la articulación en comparación con la línea de base antes de la administración, en donde la cantidad de anticuerpo administrado es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación, indicando que el sujeto ha sido tratado exitosamente para el daño en la articulación.

La invención también contempla un método para tratar el daño en una articulación en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo CD20 y efectuar al sujeto, por lo menos aproximadamente un mes después de la administración, una prueba radiográfica que mide una reducción

en el daño en la articulación en comparación con la línea de base antes de la administración, en donde la cantidad de anticuerpo CD20 administrado es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación, indicando que el sujeto ha sido tratado exitosamente para el daño en la articulación.

En una realización preferida, la prueba radiográfica después de administrar el antagonista o anticuerpo, tal como un anticuerpo CD20, ocurre por lo menos aproximadamente dos meses, de preferencia por lo menos aproximadamente 10 semanas, de más preferencia por lo menos aproximadamente tres meses, de aún más preferencia por lo menos aproximadamente cuatro meses, de aún más preferencia por lo menos aproximadamente cinco meses, de aún más preferencia por lo menos aproximadamente 24 semanas, o por lo menos aproximadamente seis meses, y de mayor preferencia por lo menos aproximadamente 52 semanas después de administrar el antagonista o anticuerpo. En otra realización preferida, la prueba mide una calificación Sharp modificada total.

En otra realización preferida, el sujeto es tratado nuevamente, por cuanto el método comprende adicionalmente administrar a un sujeto un antagonista o anticuerpo, tal como un anticuerpo CD20, en una cantidad efectiva para lograr una reducción continua o mantenida en el daño en la articulación en comparación con el efecto de una administración previa del antagonista o anticuerpo tal como el anticuerpo CD20. Así, el sujeto puede recibir una segunda dosificación del antagonista o anticuerpo y es evaluado por prueba radiográfica por lo menos aproximadamente un mes (y preferiblemente más de aproximadamente dos meses, de preferencia aproximadamente 24

semanas o aproximadamente seis meses) después de tal segunda dosificación para determinar si la segunda dosificación es efectiva (es decir, si una cantidad efectiva del antagonista o anticuerpo es administrada) para mantener los efectos de la primera dosificación o mejorar la reducción en el daño en la articulación en comparación con el efecto de la primera dosificación. Este régimen de re-tratamiento puede ser repetido mientras que se desee o sea necesario para lograr o mantener la reducción en el daño en la articulación, lo cual indica un tratamiento exitoso del daño en la articulación.

En otra realización, el antagonista o anticuerpo, tal como un anticuerpo CD20, es adicionalmente (continúa siendo) administrado al sujeto incluso si no hay una mejoría clínica en el sujeto en el momento de la prueba radiográfica después de una administración previa, tal como la primera administración del antagonista o anticuerpo. En esta última realización, preferiblemente la mejoría clínica es determinada evaluando el número de articulaciones sensibles o hinchadas, el Índice de Severidad de Evaluación de Soriasis, una evaluación clínica general del sujeto, evaluación de la tasa de sedimentación de eritrocitos o evaluación de la cantidad de nivel de proteína C-reactiva.

Para los fines de la invención, la segunda exposición al antagonista o anticuerpo para re-tratamiento es la siguiente vez que el sujeto es tratado con el antagonista o, por ejemplo, el anticuerpo CD20 después de la exposición inicial al anticuerpo, no habiendo un tratamiento o exposición intermedio a antagonista o, por ejemplo, anticuerpo CD20 entre la exposición inicial y la segunda exposición. Tal re-tratamiento

puede ser programado o no programado, pero es preferiblemente una redosificación programada, particularmente para proteger del daño a los órganos tales como los riñones. Si un anticuerpo, especialmente un anticuerpo CD20, es empleado, preferiblemente la segunda exposición al anticuerpo es de aproximadamente 0,5 a 4 gramos, de preferencia aproximadamente 1,5 a 3,5 gramos, de más preferencia aproximadamente 1,5 a 2,5 gramos, la segunda exposición no siendo proporcionada hasta después de aproximadamente 20 a 35 semanas (preferiblemente aproximadamente 23 a 30, de preferencia aproximadamente 23 a 28 semanas) de la exposición inicial.

El método contempla administrar al sujeto una cantidad efectiva del antagonista o, por ejemplo, anticuerpo CD20 para proporcionar una tercera exposición al antagonista o anticuerpo (si es un anticuerpo, de preferencia el anticuerpo CD20) preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 4 gramos, de preferencia aproximadamente 1,5 a 3,5 gramos, de más preferencia aproximadamente 1,5 a 2,5 gramos), la tercera exposición no siendo proporcionada hasta después de aproximadamente 46 a 60 semanas (preferiblemente aproximadamente 46 a 55, de preferencia aproximadamente 46 a 52 semanas) de la exposición inicial. Preferiblemente, ninguna exposición adicional al antagonista o anticuerpo es proporcionada hasta por lo menos después de aproximadamente 70-75 semanas de la exposición inicial, y de preferencia ninguna exposición adicional al antagonista o anticuerpo es proporcionada hasta por lo menos después de aproximadamente 74 a 80 semanas de la exposición inicial.

Cuando se emplea un anticuerpo, una cualquiera o más de las exposiciones al anticuerpo en la presente pueden ser proporcionadas al sujeto como una sola dosis de anticuerpo, o como dosis separadas, por ejemplo, aproximadamente 1-4 dosis separadas del anticuerpo (por ejemplo, constituyendo unas dosis primera y segunda, o unas dosis primera, segunda y tercera, o unas dosis primera, segunda, tercera y cuarta, etc.). El número particular de dosis (ya sea una, dos o tres o más) empleado para cada exposición al anticuerpo depende, por ejemplo, del tipo de daño en la articulación tratado, el tipo de anticuerpo empleado, si se emplea un segundo medicamento como se indica más adelante y de qué tipo y en qué cantidad, y el método y la frecuencia de administración. Cuando unas dosis separadas son administradas, la última dosis (por ejemplo la segunda o tercera dosis) es preferiblemente administrada después de aproximadamente 1 a 20 días, de preferencia aproximadamente 6 a 16 días, y de mayor preferencia aproximadamente 14 a 16 días del momento en que la dosis previa fue administrada. Las dosis separadas son preferiblemente administradas dentro de un período total de entre aproximadamente 1 día y 4 semanas, de preferencia entre aproximadamente 1 y 20 días (por ejemplo, dentro de un período de 6-18 días). En tal aspecto, las dosis separadas son administradas aproximadamente semanalmente, la segunda dosis siendo administrada a aproximadamente una semana de la primera dosis y cualquier dosis tercera o subsiguiente siendo administrada aproximadamente una semana después de la segunda dosis. Cada dosis separada del anticuerpo es preferiblemente

de aproximadamente 0,5 a 1,5 gramos, de preferencia aproximadamente 0,75 a 1,3 gramos.

En una realización más preferida, se proporciona un método para tratar el daño en la articulación en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo que se une a un marcador de superficie de célula B (por ejemplo, un anticuerpo CD20) para proporcionar una exposición inicial al anticuerpo seguida por una segunda exposición al anticuerpo, en donde la segunda exposición no es proporcionada hasta después de aproximadamente 16 a 54 semanas de la exposición inicial y cada una de las exposiciones al anticuerpo es proporcionada al sujeto como una dosis única o como dos o tres dosis separadas de anticuerpo. Preferiblemente, en tal método, las exposiciones al anticuerpo son de aproximadamente 0,5 a 4 gramos cada una, y de mayor preferencia las cantidades proporcionadas anteriormente.

En una realización, se proporcionan al sujeto por lo menos aproximadamente tres exposiciones del anticuerpo, por ejemplo desde aproximadamente 3 hasta 60 exposiciones, y más particularmente aproximadamente 3 a 40 exposiciones, con mayor particularidad aproximadamente 3 a 20 exposiciones. Preferiblemente, tales exposiciones son administradas a intervalos de 24 semanas cada uno. En una realización, cada exposición al anticuerpo es proporcionada como una dosis única del anticuerpo. En una realización alternativa, cada exposición al anticuerpo es proporcionada como dosis separadas del anticuerpo. Sin embargo, no toda exposición al anticuerpo necesita ser proporcionada como una dosis única o como dosis separadas.

En una realización preferida, aproximadamente 2-3 gramos del anticuerpo CD20 son administrados como la exposición inicial. Si aproximadamente 3 gramos son administrados, entonces aproximadamente 1 gramo del anticuerpo CD20 es administrado semanalmente por aproximadamente tres semanas como la exposición inicial. Si aproximadamente 2 gramos del anticuerpo CD20 son administrados como la exposición inicial, entonces se administra aproximadamente 1 gramo del anticuerpo CD20 seguido en aproximadamente dos semanas por aproximadamente otro gramo del anticuerpo como la exposición inicial. En un aspecto preferido, la segunda exposición es a aproximadamente 24 semanas o seis meses después de la exposición inicial y es administrada en una cantidad de aproximadamente 2 gramos. En un aspecto preferido alternativo, la segunda exposición es después de aproximadamente 24 semanas o seis meses de la exposición inicial y es administrada como aproximadamente 1 gramo del anticuerpo seguido, en aproximadamente dos semanas, por aproximadamente otro gramo del anticuerpo.

En una realización preferida del método de exposiciones múltiples en la presente, el sujeto está en remisión después de la exposición inicial o cualquier exposición posterior al antagonista o anticuerpo. De preferencia, el método de exposiciones múltiples en la presente involucra una re-dosificación o un re-tratamiento programado de tal modo que el sujeto esté en remisión cuando se proporcione la segunda exposición y preferiblemente todas las exposiciones al antagonista o anticuerpo. Tal re-dosificación es programada para prevenir cualquier relapso, recurrencia o daño orgánico, y no para tratarlo terapéuticamente. De preferencia, el sujeto

está en remisión por al menos 24 semanas o seis meses, y de más preferencia por lo menos aproximadamente nueve meses, y de mayor preferencia por lo menos aproximadamente 52 semanas o un año desde la última exposición al antagonista o anticuerpo usada en el método de re-tratamiento.

En aún otra realización, el sujeto es tratado con el mismo antagonista o anticuerpo, tal como el anticuerpo CD20, por al menos dos exposiciones al antagonista o anticuerpo, y preferiblemente para cada exposición al antagonista o anticuerpo. Así, las exposiciones inicial y segunda al antagonista o anticuerpo son con el mismo antagonista o anticuerpo, es decir, el tratamiento para las primeras dos exposiciones, y preferiblemente todas las exposiciones, es con un tipo de antagonista o anticuerpo que se une a un marcador de superficie de célula B, tal como un anticuerpo CD20, por ejemplo todos con rituximab o todos con el mismo 2H7 humanizado.

En todos los métodos de la invención expuestos en la presente, el antagonista (tal como anticuerpo CD20 o marcador de superficie de célula B) puede ser no conjugado, tal como un anticuerpo desnudo, o puede ser conjugado con otra molécula para una efectividad adicional, tal como, por ejemplo, para mejorar la vida media. El anticuerpo CD20 preferido en la presente es un anticuerpo CD20 quimérico, humanizado o humano, de preferencia rituximab, un 2H7 humanizado (que comprende por ejemplo las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:2 y 8, o es 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:39 y 40, o que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:32 y 33, o que comprende un

dominio de cadena pesada variable con alteración N100A, o D56A y N100A, o D56A, N100Y y S100aR en SEQ ID NO:8 y un dominio de cadena liviana variable con alteración M32L, o S92A, o M32L y S92A en SEQ ID NO:2), anticuerpo A20 quimérico o humanizado (Immunomedics), anticuerpo CD20 humano HUMAX-CD20TM (Genmab), o proteínas de cadena única que se unen a CD20 (Trubion Pharm Inc.). Se prefiere rituximab o un 2H7 humanizado.

En una realización adicional de todos los métodos en la presente, el sujeto nunca ha sido tratado previamente con uno o más medicamentos, tal como con un inhibidor anti-TNF-alfa, por ejemplo un anticuerpo anti-TNF-alfa o de receptor anti-TNF-alfa, para tratar, por ejemplo, la artritis, o con uno o más agentes inmunosupresores para tratar el daño en la articulación o una causa subyacente tal como un trastorno autoinmune, y/o nunca ha sido tratado previamente con un antagonista (por ejemplo un anticuerpo) a un marcador de superficie de célula B (por ejemplo, nunca ha sido tratado previamente con un anticuerpo CD20). En tal realización, el sujeto nunca ha sido tratado previamente con un anticuerpo de integrina anti-alfa 4 o modulador de co-estimulación, un agente biológico, un DMARD diferente a MTX, excepto por azatioprina y/o leflunomida, una terapia de depleción celular, incluyendo agentes de investigación (por ejemplo CAMPATH, anti-CD4, anti-CD5, anti-CD3, anti-CD19, anti-CD11a, anti-CD22 o BLys/BAFF), una vacuna viva/atenuada dentro de los 28 días previos a la línea de base, o glucocorticoides articulares o parenterales dentro de las 4 semanas previas a la línea de base.

En otro aspecto adicional, el sujeto puede haber tenido un relapso en el daño en la articulación o sufrido daño orgánico

tal como daño del riñón antes de ser tratado en cualquiera de los métodos anteriores, incluyendo después de la exposición inicial o una exposición posterior al antagonista o anticuerpo. Sin embargo, preferiblemente, el sujeto no ha tenido un relapso en el daño en la articulación y de preferencia no ha tenido tal relapso antes de por lo menos el tratamiento inicial.

En otra realización, el antagonista (por ejemplo, el anticuerpo CD20) es el único medicamento administrado al sujeto para tratar el daño en la articulación. En otra realización, el antagonista (por ejemplo, el anticuerpo CD20) es uno de los medicamentos usados para tratar el daño en la articulación. En una realización adicional, el sujeto no tiene una malignidad, incluyendo tumores sólidos, malignidades hematológicas o carcinoma in situ (excepto por carcinoma de células basales o células escomas de la piel que han sido extirpadas y curadas). En otra realización adicional, el sujeto no tiene artritis reumatoide (RA). En otro aspecto, el sujeto no tiene una enfermedad autoinmune reumática diferente a RA, o complicación sistémica significativa secundaria a RA (incluyendo, pero no limitada a, vasculitis, fibrosis pulmonar o síndrome de Felty). En otra realización, el sujeto sí tiene síndrome de Sjögren secundario o vasculitis cutánea limitada secundaria. En otra realización, el sujeto no tiene clase IV funcional según lo definido por la Clasificación ACR de la Condición Funcional en RA. En una realización adicional, el sujeto no tiene una enfermedad inflamatoria de la articulación diferente a RA (incluyendo, pero no limitada a, gota, artritis reactiva, artritis por soriasis, espondiloartropatía seronegativa, enfermedad de Lyme), u otro trastorno autoinmune sistémico

(incluyendo, pero no limitado a, lupus sistémico eritematoso, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerodermia, miopatía inflamatoria, enfermedad del tejido conectivo mezclado, o cualquier síndrome de superposición). En otra realización, el sujeto no tiene artritis idiopática juvenil (JIA) o RA juvenil (JRA) y/o RA antes de los 16 años de edad. En otra realización, el sujeto no tiene una enfermedad cardíaca o pulmonar significativa y/o no controlada (incluyendo enfermedad pulmonar obstructiva), o una enfermedad concomitante significativa, incluyendo, pero no limitada a, trastornos del sistema nervioso, renales, hepáticos, endocrinos o gastrointestinales, ni una inmunodeficiencia primaria o secundaria (historia de la misma, o actualmente activa), incluyendo una historia conocida de infección por VIH. En otro aspecto, el sujeto no tiene un trastorno neurológico (congénito o adquirido), vascular o sistémico que pudiera afectar a cualquiera de las evaluaciones de eficacia, en particular dolor e hinchazón de la articulación (por ejemplo enfermedad de Parkinson, parálisis cerebral, neuropatía diabética). En otra realización adicional, el sujeto no tiene esclerosis múltiple. En aún otra realización adicional, el sujeto no tiene lupus o síndrome de Sjögren. En aún otra realización, el sujeto no tiene una enfermedad autoinmune. En aún otro aspecto de la invención, el daño en la articulación no está asociado con una enfermedad autoinmune o con una enfermedad autoinmune diferente a la artritis, o con un riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune o una enfermedad autoinmune diferente a la artritis. Para los fines de estas últimas afirmaciones, una "enfermedad autoinmune" en la presente es una enfermedad o un trastorno que

surge de, y está dirigido contra, los propios tejidos u órganos de un individuo o un co-segregado o manifestación del mismo o condición resultante del mismo. Sin estar limitados por alguna teoría en particular, las células B demuestran un efecto patogénico en las enfermedades autoinmunes humanas a través de una multitud de trayectorias de mecanismos, incluyendo producción de auto-anticuerpos, formación de complejos inmunes, activación de células dendríticas y T, síntesis de citocinas, liberación de quimiocinas directas, y provisión de un nido para la neo-linfogénesis ectópica. Cada una de estas trayectorias participa en grados diferentes en la patología de las enfermedades autoinmunes.

En una realización preferida, el daño en la articulación es causado por artritis, aflojamiento aséptico de la articulación de implantes ortopédicos, ausencia de unión de una fractura, espondiloartropatías, soriasis o enfermedad de Crohn. De preferencia, el daño en la articulación es causado por artritis, la cual es, de más preferencia, artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante o artritis por soriasis.

En otras realizaciones adicionales, si el antagonista es un anticuerpo, el anticuerpo es administrado de manera intravenosa o subcutánea.

En unos aspectos preferidos adicionales, si el antagonista es un anticuerpo, el anticuerpo es administrado en una dosis de aproximadamente 0,4 a 4 gramos, de preferencia aproximadamente 1,5 a 3,5 gramos, de más preferencia aproximadamente 1,5 a 2,5 gramos. En otro aspecto, el anticuerpo es preferiblemente administrado en una dosis de aproximadamente 0,4 a 1,3 gramos a

una frecuencia de una a cuatro dosis dentro de un período de aproximadamente un mes, de preferencia aproximadamente 500 mg a 1,2 gramos, de más preferencia aproximadamente 500 mg o aproximadamente 750 mg hasta aproximadamente 1,1 gramos, y de mayor preferencia el anticuerpo es administrado en dos a tres dosis. De aún mayor preferencia, el anticuerpo es administrado dentro de un período de aproximadamente 2 a 3 semanas.

En otro aspecto preferido, el sujeto es de factor reumatoide negativo. En otro aspecto, el sujeto es de factor reumatoide positivo.

En otro aspecto preferido del método antes descrito, el sujeto recibió metotrexato antes de la línea de base o inicio del tratamiento. De preferencia, el metotrexato fue administrado a una dosis de aproximadamente 10-25 mg/semana. También, de preferencia, el metotrexato fue administrado por al menos aproximadamente 12 semanas antes de la línea de base, y de más preferencia el metotrexato fue administrado a una dosis estable por las últimas cuatro semanas antes de la línea de base. En otras realizaciones, el metotrexato fue administrado de manera peroral o parenteral.

En realizaciones particularmente preferidas del método identificado anteriormente, el daño en la articulación es causado por artritis reumatoide y el sujeto ha exhibido una respuesta inadecuada a uno o más inhibidores anti-factor de necrosis tumoral (TNF), y/o se administra metotrexato al sujeto junto con el antagonista, por ejemplo el anticuerpo CD20, y/o el antagonista es un anticuerpo CD20 que es administrado a una dosis de aproximadamente 1000 mg x 2 en los días 1 y 15 de manera intravenosa al inicio del tratamiento.

En otras realizaciones adicionales, la invención proporciona un método para monitorear el tratamiento del daño en una articulación en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un antagonista a un marcador de superficie de célula B (tal como un anticuerpo al mismo, incluyendo un anticuerpo CD20) y medir por radiografía, después de por lo menos aproximadamente un mes de la administración, si el daño en la articulación ha sido reducido sobre la línea de base antes de la administración, en donde una disminución versus la línea de base en el sujeto después del tratamiento indica que el antagonista o anticuerpo, tal como el anticuerpo CD20, está teniendo un efecto sobre el daño en la articulación. Preferiblemente, el grado de reducción versus la línea de base es medido una segunda vez después de la administración del antagonista o anticuerpo, tal como el anticuerpo CD20. También, preferiblemente, la medición es efectuada después de por lo menos aproximadamente 24 semanas de la administración.

También se incluye en la presente un método para monitorizar el tratamiento del daño en una articulación en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un antagonista a un marcador de superficie de célula B (tal como un anticuerpo al mismo, incluyendo un anticuerpo CD20) y medir por radiografía, después de por lo menos aproximadamente 52 semanas de la administración, si el daño en la articulación ha sido reducido sobre la línea de base antes de la administración, en donde una disminución versus la línea de base en el sujeto después del tratamiento indica que el antagonista o anticuerpo, tal como el anticuerpo CD20, está teniendo un efecto sobre el daño en la articulación.

Preferiblemente, el grado de reducción versus la línea de base es medido una segunda vez después de la administración del antagonista o anticuerpo, tal como el anticuerpo CD20.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un método para determinar si se continúa administrando un antagonista a un marcador de superficie de célula B (tal como un anticuerpo al mismo, incluyendo un anticuerpo CD20) a un sujeto con daño en una articulación, que comprende medir por radiografía la reducción en el daño en la articulación en el sujeto después de la administración del antagonista, tal como un anticuerpo CD20, una primera vez, medir por radiografía la reducción en el daño en la articulación en el sujeto después de la administración del antagonista, tal como un anticuerpo CD20, una segunda vez, comparar las calificaciones radiográficas en el sujeto en la primera vez y en la segunda vez, y si la calificación en la segunda vez es inferior a la primera vez, continuar la administración del antagonista o anticuerpo, tal como el anticuerpo CD20.

En otra realización adicional, se incluye un paso en el método de tratamiento para probar la respuesta del sujeto al tratamiento después del paso de administración para determinar que el nivel de respuesta sea efectivo para tratar el daño en la articulación. Por ejemplo, un paso es incluido para probar la calificación radiográfica después de la administración y compararla con una calificación radiográfica de línea de base obtenida antes de la administración para determinar si el tratamiento es efectivo midiendo si ha cambiado, y en cuánto. Esta prueba puede ser repetida en varios intervalos de tiempo programados o no programados después de la administración para

determinar el mantenimiento de cualquier remisión parcial o completa. Alternativamente, los métodos en la presente comprenden un paso de prueba del sujeto, antes de la administración, para ver si uno o más biomarcadores o síntomas están presentes para un daño en una articulación, como se expuso anteriormente. En otro método, un paso puede ser incluido para verificar la historia clínica del sujeto, como se detalló anteriormente, por ejemplo para descartar infecciones o malignidades como causas, por ejemplo causas primarias, de la condición del sujeto, antes de administrar el anticuerpo o antagonista al sujeto. Preferiblemente, el daño en la articulación es primario (es decir, la enfermedad principal), y no es secundario, tal como secundario a infección o malignidad, ya sean tumores sólidos o líquidos.

En una realización de todos los métodos en la presente, ningún otro medicamento, aparte del antagonista tal como el anticuerpo CD20, es administrado al sujeto para tratar el daño en la articulación.

En cualquiera de los métodos en la presente, preferiblemente se puede administrar al sujeto, junto con el antagonista o anticuerpo que se une a un marcador de superficie de célula B, una cantidad efectiva de un segundo medicamento (en donde el antagonista o anticuerpo que se une a un marcador de superficie de célula B (por ejemplo el anticuerpo CD20) es un primer medicamento). El segundo medicamento puede ser uno o más medicamentos, e incluyen, por ejemplo, un agente inmunosupresor, un antagonista de citocina tal como un anticuerpo de citocina, factor del crecimiento, hormona, integrina, antagonista o anticuerpo de integrina, o cualquier

combinación de los mismos. El tipo de tal segundo medicamento depende de varios factores, incluyendo el tipo de daño en la articulación, la severidad del daño en la articulación, la condición y edad del sujeto, el tipo y la dosis del primer medicamento empleado, etc.

Unos ejemplos de tales medicamentos adicionales incluyen un medicamento de la clase de los interferones tal como interferón-alfa (por ejemplo, de Amarillo Biosciences, Inc.), IFN-beta-1a (REBIF[®] y AVONEX[®]) o IFN-beta-1b (BETASERON[®]), un oligopéptido tal como acetato de glatiramer (COPAXONE[®]), un ligando CD40-CD40 bloqueador de agente, un agente inmunosupresor (tal como mitoxantrona (NOVANTRONE[®]), metotrexato, ciclofosfamida, clorambucil, leflunomida y azatioprina), inmunoglobulina intravenosa (gamma globulina), terapia de depleción de linfocitos (por ejemplo, mitoxantrona, ciclofosfamida, anticuerpos CAMPATH[™], anti-CD4, cladribina, un constructo de polipéptido con por lo menos dos dominios que comprenden un antígeno autorreactivo desinmunizado o su fragmento que es específicamente reconocido por los receptores Ig de las células B autorreactivas (WO 2003/68822), irradiación corporal total, transplante de médula ósea), antagonista o anticuerpo de integrina (por ejemplo un anticuerpo LFA-1 tal como efalizumab/RAPTIVA[®] disponible en el comercio de Genentech, o un anticuerpo de integrina alfa 4 tal como natalizumab/ANTEGREN[®] disponible de Biogen, u otros como se indicó anteriormente), medicamentos que tratan los síntomas secundarios o relacionados con el daño en la articulación tal como aquéllos indicados en la presente, esteroide tal como corticosteroide (por ejemplo prednisolona, metilprednisolona

tal como SOLU-MEDROLTM succinato de sodio de metilprednisolona para inyección, prednisona tal como prednisona a baja dosis, dexametasona, o glucocorticoide, por ejemplo por inyección a la articulación, incluyendo terapia de corticosteroide sistémica), terapia de inmunosupresión sin depleción de linfocitos (por ejemplo MMF o ciclosporina), medicamento de disminución del colesterol de la clase de las "estatinas" (que incluye cerivastatina (BAYCOLTM), fluvastatina (LESCOLTM), atorvastatina (LIPITORTM), lovastatina (MEVACORTM), pravastatina (PRAVACHOLTM) y simvastatin (ZOCORTM)), estradiol, testosterona (opcionalmente a dosificaciones elevadas; Stuve y col., *Neurology* 8:290-301 (2002)), andrógeno, terapia hormonal de reemplazo, un inhibidor de TNF tal como un anticuerpo a TNF-alfa, DMARD, NSAID, plasmaferesis o intercambio plasmático, trimetoprim-sulfametoxazol (BACTRIMTM, SEPTRATM), micofenolato mofetil, bloqueadores H2 o inhibidores de bomba de protones (durante el uso de terapia inmunosupresora potencialmente ulcerogénica), levotiroxina, ciclosporina A (por ejemplo SANDIMMUNE®), análogo de somatastatina, un DMARD o NSAID, antagonista de citocina tal como anticuerpo, antimetabolito, agente inmunosupresor, cirugía de rehabilitación, radioyodo, tiroidectomía, antagonista de BAFF tal como anticuerpos de BAFF o BR3 o inmunoadhesinas, receptor anti-CD40 o ligando anti-CD40 (CD154), antagonista/anticuerpo de receptor anti-IL-6, otro antagonista o anticuerpo de superficie de célula B tal como un 2H7 humanizado u otro anticuerpo CD20 humanizado o humano con rituximab; bloqueadores de IL-1, tales como rHUIL-1Ra (Amgen-Synergen) e inhibidor I-1B del ácido tiaprofénico (Hoechst); y modificadores co-estimulantes, tales como ORENCIA[®] (abatacept)

(Bristol-Myers Squibb); enlimomab (anticuerpo monoclonal anti-ICAM-1); CDO-855 (anticuerpo humano, que se une específicamente a una región del complejo MHC Clase II, Celltech); CH-3298 (Chiroscience); acetaminofeno (Merck); GW353430 (anticuerpo monoclonal anti-CD23, Glaxo Wellcome); GR 252025 (inhibidor de COX2, Glaxo Wellcome); 4162W94 (anticuerpo humanizado anti-CD4; Glaxo Wellcome); azatioprina (DMARD, Glaxo Wellcome); penicilamina y fenoprofeno (Eli Lilly); etc.

Tales medicamentos preferidos son un antibiótico, anti-integrina, gammaglobulina, un agente de control del dolor, un antagonista de integrina, anti-CD4, cladribina, trimetoprim-sulfametoxazol, un bloqueador H2, un inhibidor de bomba de protones, ciclosporina, medicamento de disminución del colesterol de la clase de las estatinas, estradiol, testosterona, andrógeno, terapia hormonal de reemplazo, un inhibidor de TNF tal como un inhibidor de TNF-alfa, DMARD, NSAID (para tratar, por ejemplo, síntomas músculo-esqueléticos), levotiroxina, ciclosporina A, análogo de somatostatina, antagonista de citocina (incluyendo antagonista de receptor de citocina), antimetabolito, antagonista de BAFF tal como un anticuerpo de BAFF o anticuerpo de BR3, especialmente un anticuerpo de BAFF, agente inmunosupresor tal como metotrexato o un corticosteroide, un bisfosfonato, una hormona y otro anticuerpo de marcador de superficie de célula B, tal como una combinación de rituximab y un 2H7 humanizado u otro anticuerpo CD20 humanizado.

Tales medicamentos más preferidos son un antibiótico, un agente inmunosupresor tal como metotrexato o un corticosteroide, un DMARD, un agente de control del dolor, un

antagonista de integrina, un NSAID, un antagonista de citocina, un bisfosfonato o una hormona, o una combinación de los mismos.

En una realización particularmente preferida, el segundo medicamento es un DMARD, el cual es preferiblemente seleccionado del grupo consistente en auranofina, cloroquina, D-penicilamina, oro inyectable, oro oral, hidroxicloroquina, sulfasalazina, miocrisina y metotrexato.

En otra realización de este tipo, el segundo medicamento es un NSAID, el cual es preferiblemente seleccionado del grupo consistente en: pentasa, mesalazina, asacol, fosfato de codeína, benorilato, fenbufeno, naprosina, diclofenac, etodolac e indometacina, aspirina e ibuprofeno.

En otra realización de este tipo, el segundo medicamento es un agente de control del dolor, el cual es preferiblemente seleccionado del grupo consistente en: paracetamol y dextropropoxifeno.

En una realización adicional de este tipo, el segundo medicamento es un agente inmunosupresor, el cual es preferiblemente seleccionado del grupo consistente en etanercept, infliximab, adalimumab, leflunomida, anakinra, azatioprina, metotrexato y ciclofosfamida.

En otras realizaciones preferidas, el segundo medicamento es seleccionado del grupo consistente en OPG, etanercept, infliximab, etanercept, adalimumab, kinaret, raptiva, osteoprotegerina (OPG), RANKFc, anti-RANKL, pamidronato, alendronato, actonel, zolendronato, clodronato, metotrexato, azulfidina, hidroxicloroquina, doxiciclina, leflunomida, sulfasalazina (SSZ), prednisolona, antagonista de receptor de interleucina-1, prednisona y metilprednisolona.

En otras realizaciones preferidas, el segundo medicamento es seleccionado del grupo consistente en infliximab, una combinación de infliximab/metotrexato (MTX), etanercept, un corticosteroide, ciclosporina A, azatioprina, auranofina, hidroxicloroquina (HCQ), combinación de prednisolona, MTX y SSZ, combinaciones de MTX, SSZ y HCQ, la combinación de ciclofosfamida, azatioprina y HCQ, y la combinación de adalimumab con MTX. Si el segundo medicamento es un corticosteroide, preferiblemente es prednisona, prednisolona, metilprednisolona, hidrocortisona o dexametasona. También, preferiblemente, el corticosteroide es administrado en cantidades menores que aquéllas usadas si el anticuerpo CD20 no es administrado a un sujeto tratado con un corticosteroide. De mayor preferencia, el segundo medicamento es metotrexato.

Todos estos segundos medicamentos pueden ser usados en combinación unos con otros o por sí mismos con el primer medicamento, de modo que la expresión "segundo medicamento", según se usa en la presente, no significa que es el único medicamento aparte del primer medicamento, respectivamente. Así, el segundo medicamento no necesita ser un medicamento, sino que puede constituir o comprender más de un medicamento de este tipo.

Estos segundos medicamentos como se exponen en la presente son generalmente usados en las mismas dosificaciones y con las rutas de administración como se usaron anteriormente en la presente o aproximadamente desde 1 hasta 99% de las dosificaciones empleadas hasta la fecha. Si tales segundos medicamentos son usados, son preferiblemente usados en cantidades menores que si el primer medicamento no estuviera

presente, especialmente en dosificaciones subsiguientes más allá de la dosificación inicial con el primer medicamento, de modo a eliminar o reducir los efectos secundarios causados por los mismos.

Para los métodos de re-tratamiento descritos en la presente, cuando un segundo medicamento es administrado en una cantidad efectiva con una exposición al antagonista o anticuerpo, puede ser administrado con cualquier exposición, por ejemplo solamente con una exposición o con más de una exposición. En una realización, el segundo medicamento es administrado con la exposición inicial. En otra realización, el segundo medicamento es administrado con las exposiciones inicial y segunda. En una realización adicional, el segundo medicamento es administrado con todas las exposiciones. Se prefiere que, después de la exposición inicial, tal como de esteroide, la cantidad de tal segundo medicamento sea reducida o eliminada de modo a reducir la exposición del sujeto a un agente con efectos secundarios tales como prednisona, prednisolona, metilprednisolona y ciclofosfamida.

La administración combinada de un segundo medicamento incluye la co-administración (administración concurrente), usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en donde preferiblemente hay cierto período de tiempo mientras que ambos agentes activos o medicamentos (o todos ellos) ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

El anticuerpo o antagonista en la presente es administrado por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, tópica, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar,

intranasal y/o intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa (i.v.), intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La administración intratecal es también contemplada (véase, por ejemplo, EE.UU. 2002/0009444, Grillo-López, *Una administración intratecal relevante de un anticuerpo CD20*). Además, el anticuerpo o antagonista puede ser convenientemente administrado por infusión de pulsos, por ejemplo con dosis declinantes del anticuerpo o antagonista. Preferiblemente, la dosificación es proporcionada de manera intravenosa o subcutánea, y de preferencia por una o más infusiones intravenosas.

Si se proporcionan múltiples exposiciones del anticuerpo, cada exposición puede ser proporcionada usando el mismo medio de administración o uno diferente. En una realización, cada exposición es por administración intravenosa. En otra realización, cada exposición es proporcionada por administración subcutánea. En aún otra realización, las exposiciones son proporcionadas por administración intravenosa y subcutánea.

En una realización, el anticuerpo CD20 es administrado como una infusión intravenosa lenta en vez de un pulso o bolo intravenoso. Por ejemplo, un esteroide tal como prednisolona o metilprednisolona (por ejemplo aproximadamente 80-120 mg i.v., más específicamente aproximadamente 100 mg i.v.) es administrado aproximadamente 30 minutos antes de cualquier infusión del anticuerpo CD20. El anticuerpo CD20 es, por ejemplo, introducido por infusión a través de una línea dedicada.

Para la dosis inicial de una exposición de dosis múltiples al anticuerpo CD20, o para la dosis única si la exposición involucra solamente una dosis, tal infusión es preferiblemente comenzada a una tasa de aproximadamente 50 mg/hora. Ésta puede ser intensificada, por ejemplo a una tasa de incrementos de aproximadamente 50 mg/hora aproximadamente cada 30 minutos hasta un máximo de aproximadamente 400 mg/hora. Sin embargo, si el sujeto está experimentando una reacción relacionada con la infusión, la tasa de infusión es preferiblemente reducida, por ejemplo, hasta la mitad de la tasa actual, por ejemplo desde 100 mg/hora hasta 50 mg/hora. Preferiblemente, la infusión de tal dosis de anticuerpo CD20 (por ejemplo una dosis total de aproximadamente 1000 mg) es completada en aproximadamente 255 minutos (4 horas y 15 minutos). Opcionalmente, los sujetos reciben un tratamiento profiláctico de acetaminofén/paracetamol (por ejemplo aproximadamente 1 g) y difenhidramina HCl (por ejemplo aproximadamente 50 mg o una dosis equivalente de un agente similar) por la boca aproximadamente 30 a 60 minutos antes del comienzo de una infusión.

Si se proporciona más de una infusión (dosis) del anticuerpo CD20 para lograr la exposición total, las infusiones segunda o subsiguientes de anticuerpo CD20 en esta realización de infusiones son preferiblemente comenzadas a una tasa superior a la infusión inicial, por ejemplo a aproximadamente 100 mg/hora. Esta tasa puede ser intensificada, por ejemplo a una tasa de incrementos de aproximadamente 100 mg/hora aproximadamente cada 30 minutos hasta un máximo de aproximadamente 400 mg/hora. Los sujetos que experimentan una

reacción relacionada con la infusión tienen preferiblemente la tasa de infusión reducida a la mitad de esa tasa, por ejemplo desde 100 mg/hora hasta 50 mg/hora. Preferiblemente, la infusión de tal dosis segunda o subsiguiente de anticuerpo CD20 (por ejemplo una dosis total de aproximadamente 1000 mg) es completada en aproximadamente 195 minutos (3 horas y 15 minutos).

En otra realización, se proporciona un método para tratar el daño en una articulación en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un antagonista a un marcador de superficie de célula B, tal como un anticuerpo al mismo, por ejemplo un anticuerpo CD20, y efectuar al sujeto, por lo menos aproximadamente 52 semanas después de la administración, una prueba radiográfica que mide una reducción en el daño en la articulación en comparación con una línea de base antes de la administración, en donde la cantidad de antagonista o anticuerpo, tal como anticuerpo CD20, administrada es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación, indicando que el sujeto ha sido tratado exitosamente.

En este método, preferiblemente la prueba mide una calificación Sharp modificada total. En otra realización preferida, el antagonista es un anticuerpo CD20. De preferencia, el anticuerpo CD20 es rituximab o es un 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:2 y 8, o es 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:39 y 40, o es 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:32 y 33, o es 2H7 humanizado que comprende un dominio de cadena pesada variable con alteración N100A, o D56A

y N100A, o D56A, N100Y y S100aR en SEQ ID NO:8 y un dominio de cadena liviana variable con alteración M32L, o S92A, o M32L y S92A en SEQ ID NO:2.

En otra realización preferida, el daño en la articulación es causado por artritis, preferiblemente RA, y de preferencia RA temprana activa. En otra realización preferida, el sujeto no ha sido tratado previamente con un agente inmunosupresor antes de la administración de una primera dosis de antagonista o anticuerpo, tal como el anticuerpo CD20, en el método de tratamiento. En una realización preferida, el antagonista o anticuerpo es administrado en una dosis de aproximadamente 0,4 a 4 gramos, y de preferencia el antagonista o anticuerpo es administrado en una dosis de aproximadamente 0,4 a 1,3 gramos a una frecuencia de una a cuatro dosis dentro de un período de aproximadamente un mes. De más preferencia, la dosis es aproximadamente 500 mg a 1,2 gramos, y en otras realizaciones es aproximadamente 750 mg a 1,1 gramos. En tales aspectos, el antagonista o anticuerpo es preferiblemente administrado en dos a tres dosis, y/o es administrado dentro de un período de aproximadamente 2 a 3 semanas.

En otro aspecto, tal método comprende adicionalmente re-tratar al sujeto proporcionando al sujeto una administración adicional del antagonista, tal como el anticuerpo CD20, en una cantidad efectiva para lograr una reducción continua o mantenida en el daño en la articulación en comparación con el efecto de una administración previa del antagonista o anticuerpo, tal como el anticuerpo CD20. En un aspecto de esta realización, el antagonista o anticuerpo, tal como el anticuerpo CD20, es administrado adicionalmente al sujeto

incluso si no hay mejoría clínica en el sujeto en el momento de la prueba radiográfica después de una administración previa. El re-tratamiento puede ser comenzado por lo menos aproximadamente 24 semanas después de la primera administración del antagonista tal como el anticuerpo CD20, y uno o más re-tratamientos adicionales son opcionalmente comenzados. En otra realización, el re-tratamiento adicional es comenzado por lo menos aproximadamente 24 semanas después de la segunda administración del antagonista tal como el anticuerpo CD20. En un aspecto preferido adicional, el daño en la articulación ha sido reducido después del re-tratamiento en comparación con la extensión del daño en la articulación después de la primera evaluación radiográfica.

Preferiblemente, en este método, con respecto a la evaluación aproximadamente a las 52 semanas, un segundo medicamento es administrado en una cantidad efectiva, en donde el antagonista o anticuerpo, tal como el anticuerpo CD20, es un primer medicamento. En un aspecto, el segundo medicamento es más de un medicamento. En otro aspecto, el segundo medicamento es un antibiótico, un agente inmunosupresor, un medicamento anti-reumático modificador de la enfermedad (DMARD), un agente de control del dolor, un antagonista de integrina, un medicamento anti-inflamatorio no esteroide (NSAID), un antagonista de citocina, un bisfosfonato o una hormona, o una combinación de los mismos, de mayor preferencia metotrexato. El sujeto puede ser de factor reumático negativo o positivo. También, preferiblemente, el antagonista tal como el anticuerpo CD20 es administrado de manera intravenosa o subcutánea, de mayor preferencia intravenosa.

Sigue una discusión de unos métodos para producir, modificar y formular tales anticuerpos.

III. Producción de Anticuerpos

Los métodos y artículos de elaboración de la presente invención usan, o incorporan, un anticuerpo que se une a un marcador de superficie de célula B, especialmente uno que se une a CD20. Por consiguiente, unos métodos para generar tales anticuerpos serán descritos aquí.

El antígeno CD20 a ser usado para la producción de, o el despistaje de, uno o más anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble de CD20 o una porción del mismo, que contiene el epítoto deseado. Alternativamente, o adicionalmente, unas células que expresan CD20 en su superficie celular pueden ser usadas para la generación, o el despistaje, de uno o más anticuerpos. Otras formas de CD20 útiles para generar anticuerpos serán evidentes para aquéllos versados en el arte.

Sigue una descripción con respecto a unos ejemplos de técnicas para la producción de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención.

(i) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales son preferiblemente desarrollados en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente a una proteína que es inmunogénica en la especie a ser inmunizada, por ejemplo hemocianina limpet clave, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de grano de soya usando un agente bifuncional o de derivación, por ejemplo éster de maleimidobenzoyl sulfosuccinimida (conjugación a

través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales son inmunizados contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución de manera intradérmica en múltiples sitios. Un mes después los animales son reforzados con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a catorce días después los animales son sangrados y el suero es ensayado para determinar el título de anticuerpo. Los animales son reforzados hasta la nivelación del título. Preferiblemente, el animal es reforzado con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de enlazamiento transversal diferente. Los conjugados pueden ser también elaborados en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. También, unos agentes de agregación tales como alumbre son convenientemente usados para mejorar la respuesta inmune.

(ii) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales son obtenidos a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o unen el mismo epítoto excepto por variantes posibles que surgen durante la producción del anticuerpo monoclonal, tales variantes estando generalmente presentes en

cantidades menores. Así, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como no siendo una mezcla de anticuerpos distintos o policlonales.

Por ejemplo los anticuerpos monoclonales pueden ser elaborados usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o pueden ser elaborados por métodos de ADN recombinante (Patente de EE.UU. N° 4.816.567).

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, es inmunizado como se describió anteriormente para producir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados in vitro. Los linfocitos son entonces fusionados con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas son sembradas y desarrolladas en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), dichas sustancias impidiendo el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquéllas que se fusionan eficientemente, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células seleccionadas de producción de anticuerpos, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murino, tales como aquéllas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Centro de Distribución de Células del Instituto Salk, San Diego, California, EE.UU., y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland, EE.UU. Unas líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también han sido descritas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Un medio de cultivo en el cual las células de hibridoma están creciendo es ensayado para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma es determinado por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión in vitro, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima (ELISA).

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

Después de que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o

actividad deseada, los clones pueden ser subclonados limitando los procedimientos de dilución y desarrollados por métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Unos medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden ser desarrolladas in vivo como tumores ascites en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones son convenientemente separados del medio de cultivo, fluido ascites o suero por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina tales como, por ejemplo, proteína A-SEPHAROSE™, cromatografía por hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica a los anticuerpos monoclonales es fácilmente aislado y secuenciado usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican a las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede ser colocado en vectores de expresión, que son entonces transfectados a células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células ováricas de hámster chino (CHO por sus siglas en inglés) o células de mieloma que de lo contrario no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Unos artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias del ADN que codifica al anticuerpo

incluyen Skerra y col., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden ser aislados de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente usando bibliotecas de fagos. Unas publicaciones subsiguientes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por entremezclado de cadenas (Marks y col., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación in vivo como una estrategia para construir bibliotecas muy grandes de fagos (Waterhouse y col., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Así, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridomas de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede ser modificado, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación para los dominios constantes de cadena pesada y liviana humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de EE.UU. N° 4.816.567; Morrison y col., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o uniendo de manera covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido diferente a inmunoglobulina.

Típicamente, tales polipéptidos diferentes a inmunoglobulina son sustituidos para los dominios constantes de un anticuerpo, o son sustituidos para los dominios variables de

un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

Además, los anticuerpos que comprenden una región Fc variante con alta afinidad para FcγR son útiles para tratar enfermedades en las cuales se desea una eficacia mejorada de la función de las células efectoras, tales como las enfermedades autoinmunes, como se expone, por ejemplo, en EE.UU. 2005/0037000 y WO 2004/63351 (Macrogenics, Inc. Stavenhagen y col.).

(iii) Anticuerpos humanizados

Unos métodos para humanizar anticuerpos no humanos han sido descritos en el arte. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos al mismo desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos son a menudo mencionados como residuos "importados", los cuales son típicamente tomados de un dominio variable de "importación". La humanización puede ser esencialmente realizada siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de regiones hipervariables en las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de EE.UU. N° 4.816.567) en los cuales sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia

modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Unos modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente a la disposición y aquéllos versados en el arte están familiarizados con los mismos. Se tienen disponibles unos programas de computadora que ilustran y muestran unas estructuras de conformación tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unir su antígeno. De esta manera, los residuos de FR pueden ser seleccionados y combinados desde las secuencias de receptor e importación de modo que la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad aumentada para uno o más antígenos objetivo, sea lograda. En general, los residuos de regiones hipervariables están directamente y más sustancialmente involucrados en el influenciado de la unión a antígeno.

(iv) Anticuerpos humanos

Como una alternativa a la humanización, unos anticuerpos humanos pueden ser generados. Por ejemplo, actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, en la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación por homocigosis del gen de la región de unión de cadena pesada (J_H) de anticuerpo en ratones mutantes de línea germinal y quiméricos resultan en la inhibición completa de la

producción de anticuerpo endógeno. La transferencia del arreglo genético de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos durante el reto por 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. Nos. 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

Alternativamente, la tecnología de representación de fagos (McCafferty y col., *Nature* 348:552-553 (1990)) puede ser usada para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro, a partir de repertorios genéricos de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpo son clonados en estructura en un gen de proteína de capa mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y mostrados como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de hélice simple del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también resultan en la selección del gen que codifica al anticuerpo que exhibe esas propiedades. Así, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La representación del fago puede ser realizada en una variedad de formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson y col., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Varias fuentes de segmentos de gen V pueden ser usadas para la representación del fago. Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) aislaron un arreglo diverso de anticuerpos anti-

oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados puede ser construido y los anticuerpos a un arreglo diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos) pueden ser aislados 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. Nos. 5.565.332 y 5.573.905.

Los anticuerpos humanos también pueden ser generados por células B activadas in vitro (véanse las Patentes de EE.UU. Nos. 5.567.610 y 5.229.275).

(v) *Fragmentos de anticuerpos*

Varias técnicas han sido desarrolladas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos fueron derivados por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) and Brennan y col., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ser ahora producidos directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden ser aislados de las bibliotecas de fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. Alternativamente, unos fragmentos Fab'-SH pueden ser directamente recuperados de *E. coli* y acoplados químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden ser aislados directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la

producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el practicante experimentado. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fc de una cadena (scFv). Véase WO 93/16185; Patente de EE.UU. N° 5.571.894; y Patente de EE.UU. N° 5.587.458. El fragmento de anticuerpo puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo como se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.641.870. Tal fragmento de anticuerpo lineal puede ser monoespecífico o biespecífico.

(vi) *Anticuerpos biespecíficos*

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para por lo menos dos epítopes diferentes. Unos ejemplos de anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopes diferentes del antígeno CD20. Otros anticuerpos de ese tipo pueden unir a CD20 y unir adicionalmente a un segundo marcador de superficie de célula B. Alternativamente, un ramal de unión anti-CD20 puede ser combinado con un ramal que se une a una molécula desencadenante sobre un leucocito, tal como una molécula de receptor de células T (por ejemplo CD2 o CD3), o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) de modo a enfocar los mecanismos celulares de defensa a la célula B. Los anticuerpos biespecíficos también pueden ser usados para localizar ciertos agentes a la célula B. Estos anticuerpos poseen un ramal de unión a CD20 que une el agente (por ejemplo, metotrexato). Los anticuerpos biespecíficos pueden ser preparados como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

Los métodos para elaborar anticuerpos biespecíficos son conocidos en el arte. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa está basada en la co-expresión de dos pares de cadena liviana-cadena pesada de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein y col., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido al surtido aleatorio de cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulina, estos hibridomas (quadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, la cual es usualmente efectuada mediante pasos de cromatografía de afinidad, es más bien engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Unos procedimientos similares son descritos en WO 93/08829 y en Traunecker y col., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación antígeno-anticuerpo) son fusionados a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones esenciales CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de cadena liviana, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena liviana de inmunoglobulina, son insertados en vectores de expresión separados, y son co-transfectados a un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una mayor flexibilidad en

el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las cuales unas relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales resulta en altos rendimientos o cuando las relaciones no son particularmente significativas.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un ramal, y un par de cadena pesada-cadena liviana de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de adhesión) en el otro ramal. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado desde las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena liviana de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque es descrito en WO 94/04690. Para unos detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la Patente de EE.UU. N° 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede ser diseñada para maximizar el porcentaje de heterodímeros que son recuperados del cultivo celular

recombinante. La interfaz preferida comprende por lo menos parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo son reemplazadas con cadenas laterales más grandes (por ejemplo tirosina o triptofano). Unas "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a dichas una o más cadenas laterales más grandes son creadas sobre la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes con unas más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros subproductos indeseables tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos enlazados transversalmente o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede ser acoplado a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para apuntar células sistémicas inmunes a células indeseables (Patente de EE.UU. N° 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden ser elaborados usando cualquier método de enlazamiento transversal conveniente. Unos agentes de enlazamiento transversal adecuados son muy conocidos en el arte, y son descritos en la Patente de EE.UU. N° 4.676.980, junto con varias técnicas de enlazamiento transversal.

Unas técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también han sido descritas en la literatura. Por ejemplo, unos anticuerpos biespecíficos

pueden ser preparados usando enlazamiento químico. Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el cual unos anticuerpos intactos son divididos proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos son reducidos en la presencia del agente de formación de complejo con tiol, arsenita de sodio para estabilizar los ditiolos vecinales e impedir la formación intermolecular de disulfuro. Los fragmentos Fab' generados son entonces convertidos en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Unos de los derivados de Fab' -TNB es entonces reconvertido en el Fab' -tiol por reducción con mercaptoetilamina y es mezclado con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden ser usados como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Varias técnicas para elaborar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente desde el cultivo celular recombinante también han sido descritas. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos han sido producidos usando zípers de leucina. Kostelny y col., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos zíper de leucina de las proteínas Fos y Jun fueron enlazados a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión genética. Los homodímeros de anticuerpo fueron reducidos en la región de bisagra para formar monómeros y entonces re-oxidados para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede ser utilizado para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo

alternativo para elaborar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena liviana (V_L) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el pareo entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento son forzados a parearse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. Otra estrategia para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de una cadena (sFv) también ha sido reportada. Véase Gruber y col., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Unos anticuerpos con más de dos valencias son contemplados. Por ejemplo, unos anticuerpos triespecíficos pueden ser preparados. Tutt y col., *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

IV. Conjugados y Otras Modificaciones del Anticuerpo

Unas modificaciones del anticuerpo son contempladas en la presente. Así, en una realización, el anticuerpo puede ser conjugado a otra molécula, por ejemplo, para aumentar la vida media o estabilidad o mejorar de otro modo la farmacocinética del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser enlazado a uno de una variedad de polímeros no proteínáceos, por ejemplo polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Unos fragmentos de anticuerpos, tales como Fab', enlazados a una o más moléculas de PEG, son una realización especialmente preferida de la invención.

Los anticuerpos descritos en la presente pueden ser también formulados como liposomas. Los liposomas que contienen el

anticuerpo son preparados por métodos conocidos en el arte, tal como aquéllos descritos en Epstein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); Patentes de EE.UU. Nos. 4.485.045 y 4.544.545; y WO 97/38731 publicada el 23 de octubre de 1997. Unos liposomas con tiempo de circulación mejorado son descritos en la Patente de EE.UU. N° 5.013.556.

Unos liposomas particularmente útiles pueden ser generados por el método de evaporación en fase inversa con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas son extrusados a través de filtros de tamaño de poro definido para producir unos liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' de un anticuerpo de la presente invención pueden ser conjugados a los liposomas como se describe en Martin y col., *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) por medio de una reacción de intercambio de disulfuros.

Una o más modificaciones de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos de proteína o péptido descritos en la presente son contempladas. Por ejemplo, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo son preparadas introduciendo unos cambios de nucleótidos apropiados al ácido nucleico del anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones desde, y/o inserciones a y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución es efectuada para llegar

al constructo final, a condición de que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos de post-traducción del anticuerpo, por ejemplo cambiando el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Un método útil para identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son lugares preferidos para mutagénesis es llamado "mutagénesis de examen de alanina" según lo descrito por Cunningham y Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989). Aquí, un residuo o grupo de residuos objetivos son identificados (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y reemplazados por un aminoácido neutro o cargado negativamente (de mayor preferencia alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con antígeno. Estos lugares de aminoácido que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones son entonces refinados introduciendo unas variantes adicionales u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Así, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos es predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita ser predeterminada. Por ejemplo, para analizar el desempeño de una mutación en un sitio dado, una mutagénesis aleatoria o de examen de ala es conducida en el codón o región objetivo y las variantes de anticuerpo expresadas son sometidas a despistaje para detectar la actividad deseada.

Unas inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino-terminales y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de

residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Unos ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido o polímero. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión a la terminación N o C del anticuerpo de una enzima, o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución de anticuerpos incluyen las regiones hipervariables, pero las alteraciones de FR son también contempladas. Unas sustituciones conservadoras son mostradas en la tabla a continuación bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones resultan en un cambio en la actividad biológica, entonces unos cambios más sustanciales, denominados "ejemplos de sustituciones" en la tabla a continuación, como se describe adicionalmente más adelante con referencia a las clases de aminoácidos, pueden ser introducidos y los productos son sometidos a despistaje.

Residuo Original	Ejemplos de Sustituciones	Sustituciones Preferidas
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)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Unas modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo son efectuadas seleccionando unas sustituciones que difieren significativamente en su efecto para mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la

molécula en el sitio objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos puede ser agrupados de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda edición, pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

Alternativamente, los residuos naturales pueden ser divididos en grupos en base a las propiedades comunes de sus cadenas laterales:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Unas sustituciones no conservadoras ocasionarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no involucrado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede ser sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula e impedir un enlazamiento transversal aberrante. Inversamente, unos enlaces

de cisteína pueden ser añadidos al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución involucra sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo de origen. Generalmente, dichas una o más variantes resultantes seleccionadas para su desarrollo adicional tendrán unas propiedades biológicas mejoradas con relación al anticuerpo de origen a partir del cual son generadas. Una forma conveniente para generar tales variantes de sustitución es la maduración por afinidad usando representación de fagos. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) son mutados para generar todas las sustituciones amino posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas son representadas en una forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosas como fusiones al producto de gen III de M13 empacado dentro de cada partícula. Las variantes representadas en fagos son entonces sometidas a despistaje para determinar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se describe en la presente. Con el fin de identificar los sitios de región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar una mutagénesis de examen de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión de antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre anticuerpo y antígeno. Tales residuos de contacto y residuos

vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas explicadas en la presente. Una vez que tales variantes son generadas, el panel de variantes es sometido a despistaje como se describe en la presente y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes pueden ser seleccionados para su desarrollo ulterior.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Tal alteración incluye eliminar una o más porciones de carbohidrato encontradas en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de polipéptidos es típicamente N-enlazada u O-enlazada. N-enlazada se refiere a la unión de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación O-enlazada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo es convenientemente efectuada alterando la secuencia de aminoácidos de tal modo que contenga una o más de las secuencias de tripéptido antes descritas (para los sitios de

glicosilación N-enlazados). La alteración también puede ser efectuada mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación O-enlazados).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a la misma puede ser alterado. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo son descritos en la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también EE.UU. 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina de bisección (GlcNAc) en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo son mencionados en WO 2003/011878, Jean-Mairet y col. y la Patente de EE.UU. N° 6.602.684, Umana y col. Los anticuerpos con por lo menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo son reportados en WO 1997/30087, Patel y col. Véase, también, WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) con respecto a los anticuerpos con carbohidrato alterado unido a la región Fc de los mismos. Véase también EE.UU. 2005/0123546 (Umana y col.) sobre moléculas de unión a antígeno con glicosilación modificada.

la variante de glicosilación preferida en la presente comprende una región Fc, en la cual una estructura de carbohidrato unida a la región Fc carece de fucosa. Tales variantes tienen una función de ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende adicionalmente una o más sustituciones de aminoácidos en la misma que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de

la región Fc (numeración Eu de residuos). Unos ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "defucosilados" o "deficientes de fucosa" incluyen: EE.UU. 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; EE.UU. 2003/0115614; EE.UU. 2002/0164328; EE.UU. 2004/0093621; EE.UU. 2004/0132140; EE.UU. 2004/0110704; EE.UU. 2004/0110282; EE.UU. 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki y col., *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki y col., *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Unos ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka y col., *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams y col., especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares noqueadoras, tales como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO noqueadoras (Yamane-Ohnuki y col., *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo son preparadas por una variedad de métodos conocidos en el arte. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a, aislamiento desde una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que ocurren naturalmente) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigidas a sitios), mutagénesis PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada previamente o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser conveniente modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, de modo a mejorar

la ADCC y/o la CDC del anticuerpo. Esto puede ser logrado introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc de un anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, uno o más residuos de cisteína pueden ser introducidos a la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o ADCC y exterminación celular mediada por complemento aumentada. Véase Caron y col., *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) y Shopes, *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos también pueden ser preparados usando enlazadores transversales heterobifuncionales como se describe en Wolff y col., *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y de ese modo puede tener capacidades de ADCC y lisis de complemento mejoradas. Véase Stevenson y col., *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

WO 00/42072 (Presta, L.) describe unos anticuerpos con función de ADCC mejorada en la presencia de células efectoras humanas, en donde los anticuerpos comprenden sustituciones de aminoácidos en la región Fc de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo de ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc. Preferiblemente la región Fc alterada es una región Fc de IgG1 humana que comprende o consiste en sustituciones en una, dos o tres de estas posiciones.

Unos anticuerpos con unión a Clq y/o CDC alteradas son descritos en WO 99/51642, Patente de EE.UU. N° 6.194.551 B1, Patente de EE.UU. N° 6.242.195 B1, Patente de EE.UU. N°

6.528.624 B1 y Patente de EE.UU. N° 6.538.124 (Idusogie y col.). Los anticuerpos comprenden una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de la región Fc de los mismos.

Para aumentar la vida media en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítotope de unión a receptor de salvamento al anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.739.277, por ejemplo. Según se usa en la presente, la frase "epítotope de unión a receptor de salvamento" se refiere a un epítotope de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de aumentar la vida media en suero in vivo de la molécula de IgG. Unos anticuerpos con sustituciones en una región Fc de los mismos y vidas medias en suero aumentadas son también descritos en WO 00/42072 (Presta, L.).

Unos anticuerpos diseñados con tres o más (preferiblemente cuatro) sitios funcionales de unión a antígeno son también contemplados (Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2002/0004587 A1, Miller y col.).

V. Formulaciones Farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención son preparadas para almacenaje mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no

tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; preservativos (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes de quelación tales como EDTA; azúcares tales como sucrosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones de formación de sal tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo complejos Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Unos ejemplos de formulaciones de anticuerpos anti-CD20 son descritos en WO98/56418. Esta publicación describe una formulación líquida de dosis múltiples que comprende 40 mg/ml de rituximab, 25 mM de acetato, 150 mM de trehalosa, alcohol bencílico al 0,9%, polisorbato 20 al 0,02% a pH 5,0 que tiene una vida mínima en anaquel de dos años de almacenaje a 2-8°C. Otra formulación anti-CD20 de interés comprende 10 mg/ml de rituximab en 9,0 mg/ml de cloruro de sodio, 7,35 mg/ml de

dihidrato de citrato de sodio, 0,7 mg/ml de polisorbato 80 y agua estéril para inyección, pH 6,5.

Unas formulaciones liofilizadas adaptadas para administración subcutánea son descritas en la Patente de EE.UU. N° 6.267.958 (Andya y col.). Tales formulaciones liofilizadas pueden ser reconstituidas con un diluyente adecuado hasta una concentración elevada de proteína y la formulación reconstituida puede ser administrada de manera subcutánea al mamífero a ser tratado en la presente.

Unas formas cristalizadas del anticuerpo son también contempladas. Véase, por ejemplo, EE.UU. 2002/0136719A1 (Shenoy y col.).

La formulación en la presente también puede contener más de un compuesto activo (un segundo medicamento como se indicó anteriormente) si es necesario, preferiblemente aquéllos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. El tipo y las cantidades efectivas de tales medicamentos dependen, por ejemplo, de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación y los parámetros clínicos de los sujetos. Tales medicamentos preferidos fueron indicados anteriormente.

Los ingredientes activos pueden estar también atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en un sistema de entrega de medicamento coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales

técnicas son descritas en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Unas preparaciones de liberación prolongada pueden ser preparadas. Unos ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, dichas matrices teniendo la forma de artículos perfilados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Unos ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de EE.UU. N° 3.773.919), Copolímeros de ácido L-glutámico y y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestos por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

La formulación a ser usada para administración in vivo debe ser estéril. Esto es fácilmente efectuado por filtración a través de membranas de filtración estériles.

VI. Artículos de Elaboración

En otra realización de la invención, se proporcionan unos artículos de elaboración que contienen materiales útiles para el tratamiento del daño en la articulación descrito anteriormente. La invención, en particular, proporciona un artículo de elaboración que comprende: (a) un recipiente que comprende un antagonista tal como un anticuerpo que se une a un marcador de superficie de célula B (por ejemplo un anticuerpo CD20) (preferiblemente el recipiente comprende el anticuerpo y

un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable dentro del recipiente); y (b) un inserto de empaque con instrucciones para tratar el daño en una articulación en un sujeto, en donde las instrucciones indican que se administra al sujeto el antagonista o anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo CD20) y es entonces sometido, por lo menos aproximadamente un mes después de la administración, a una prueba radiográfica que mide una reducción en el daño en la articulación en comparación con una línea de base antes de la administración, en donde la cantidad de antagonista o anticuerpo, tal como el anticuerpo CD20, administrada es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación, indicando que el sujeto ha sido tratado exitosamente.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el artículo de elaboración en la presente comprende adicionalmente un recipiente que comprende un segundo medicamento, en donde el antagonista o anticuerpo es un primer medicamento, y en donde el artículo comprende adicionalmente unas instrucciones en el inserto de empaque para tratar al sujeto con el segundo medicamento, de una manera efectiva. El segundo medicamento puede ser cualquiera de aquéllos expuestos anteriormente, incluyendo un antibiótico, un agente inmunosupresor, un medicamento anti-reumático modificador de la enfermedad (DMARD), un agente de control del dolor, un antagonista de integrina, un medicamento anti-inflamatorio no esteroide (NSAID), un antagonista de citocina, bisfosfonato o una hormona, o una combinación de los mismos, de preferencia un DMARD, NSAID, agente de control del dolor o agente

inmunosupresor. De mayor preferencia, el segundo medicamento es metotrexato.

En este aspecto, el inserto de empaque está sobre el recipiente o asociado con el mismo. Unos recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, etc. Los recipientes pueden ser formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es efectiva para tratar el daño en la articulación y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco que tiene un tapón que puede ser perforado con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es el antagonista o anticuerpo. La etiqueta o inserto de empaque indica que la composición es usada para tratar el daño en una articulación en un sujeto elegible para el tratamiento con una guía específica con respecto a las cantidades e intervalos de dosificación de antagonista o anticuerpo y cualquier otro medicamento que está siendo proporcionado. El artículo de elaboración puede comprender adicionalmente un recipiente adicional que comprende una solución amortiguadora diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI por sus siglas en inglés), salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y/o solución de dextrosa. El artículo de elaboración puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otras soluciones amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

En realizaciones más específicas, un artículo de elaboración comprende: (a) un recipiente que comprende un antagonista tal como un anticuerpo que se une a un marcador de superficie de célula B (por ejemplo un anticuerpo CD20) (preferiblemente el recipiente comprende el anticuerpo y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable dentro del recipiente); y (b) un inserto de empaque con instrucciones para tratar el daño en una articulación en un sujeto, en donde las instrucciones indican que se administra al sujeto el antagonista o anticuerpo (por ejemplo el anticuerpo CD20) y es entonces sometido, por lo menos aproximadamente 52 semanas después de la administración, a una prueba radiográfica que mide una reducción en el daño en la articulación en comparación con una línea de base antes de la administración, en donde la cantidad de anticuerpo CD20 administrada es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación, indicando que el sujeto ha sido tratado exitosamente. En una realización preferida, el artículo comprende un recipiente que comprende un segundo medicamento, en donde el antagonista o anticuerpo (tal como el anticuerpo CD20) es un primer medicamento, comprendiendo adicionalmente unas instrucciones en el inserto de empaque para tratar el sujeto con el segundo medicamento en una cantidad efectiva. Preferiblemente, este segundo medicamento es metotrexato.

Unos detalles adicionales de la invención son ilustrados por los siguientes Ejemplos no limitativos. Las divulgaciones de todos los documentos citados en la especificación son expresamente incorporadas en la presente por referencia.

EJEMPLO 1:

Eficacia y seguridad del rituximab en pacientes con una respuesta inadecuada o falta de tolerancia a una terapia anti-TNF previa

Éste es un ensayo clínico en centros múltiples con grupos paralelos, doble ciego, distribuido aleatoriamente de Fase II, llamado: Evaluación Aleatoria de la Eficacia a Largo Plazo del Rituximab en RA (REFLEX). El diseño del estudio es mostrado en la Fig. 1.

Los objetivos de este estudio fueron:

- Determinar la eficacia y seguridad del rituximab cuando es usado en combinación con metotrexato (MTX) en 517 pacientes con artritis reumatoide activa, quienes tienen una respuesta inadecuada a una o más terapias anti-TNF.
- Explorar la farmacocinética y la farmacodinámica del rituximab en esta población de pacientes (por ejemplo, extensión de duración de la depleción de células B y efectos sobre las inmunoglobulinas y el actor reumatoide).

Los resultados de este estudio fueron:

- Punto final primario
 - La proporción de pacientes con una respuesta ACR20 en la Semana 24.
- Puntos finales secundarios
 - Proporción de pacientes con respuestas ACR50 y ACR70 en la Semana 24.
 - Cambio en DAS28 desde la línea de base hasta la Semana 24.
 - Respuesta EULAR en la Semana 24.
 - Cambios desde la línea de base en el conjunto esencial de ACR.

- Cambios desde la línea de base en SF-36.
- Cambio en la calificación radiográfica total de Sharp modificada por Genant en la semana 56.
- Cambio en la calificación radiográfica de Sharp modificada por Genant en la semana 24 (exploratorio);
- Cambio en la calificación de erosión, y la calificación de estrechamiento del espacio de la articulación.

Los criterios de inclusión clave de este estudio fueron:

- Experimentaron una respuesta inadecuada al tratamiento previo o actual con etanercept, infliximab o adalimumab debido a toxicidad o eficacia inadecuada
 - Etanercept por ≥ 3 meses a 25 mg dos veces por semana
 - Infliximab, por lo menos 4 infusiones de ≥ 3 mg/kg
 - Adalimumab por ≥ 3 meses a 40 mg cada dos semanas
- Deben haber recibido MTX a una dosis de 10-25 mg/semana (peroral (p.o.) o parenteral) por al menos 12 semanas, las últimas 4 semanas antes del despistaje a una dosis estable.
- Todos los otros DMARD/modificadores de respuesta biológica retirados por lo menos 4 semanas antes de la distribución aleatoria (8 semanas para infliximab, leflunomida y adalimumab)
- Equivalente de prednisona ≤ 10 mg/día
- Conteo de articulaciones hinchadas (SJC por sus siglas en inglés) ≥ 8 (conteo de 66 articulaciones) y conteo de articulaciones sensibles (TJC por sus siglas en inglés) ≥ 8 (conteo de 68 articulaciones)
- CRP $\geq 1,5$ mg/dl (15 mg/l) o ESR ≥ 28 mm/h
- Evidencia radiográfica de por lo menos una articulación con una erosión definida atribuible a artritis reumatoide.

El tratamiento del estudio fue:

· Grupo A:

· Rituximab, dos infusiones i.v. de 1000 mg en los días 1 y 15

· Grupo B:

· Placebo, infusiones i.v. en los días 1 y 15

· Ambos grupos

· 100 mg i.v. de metilprednisolona antes de cada infusión de rituximab/placebo

· 60 mg/d de prednisona en los días 2-7 y 30 mg/d en los días 8-14.

Resultados a los 6 meses:

Poblaciones de Pacientes:

<u>N° de pacientes</u>	<u>Placebo</u>	<u>Rituximab</u>
Inscritos	209	308
ITT	201	298
Roturas de Frascos	4	3
Sitio Auditado	1	4
Tratado antes de la Dist.3		3
Aleatoria		
ITT por Región	201	298
EE.UU.	116 (58%)	172 (58%)
No EE.UU.	85 (42%)	126 (42%)
ITT por RF	201	298
RF+ve	160 (80%)	234 (79%)
RF-ve	41 (20%)	64 (21%)
Por Protocolo	161	259
Exclusiones	48 (24%)	49 (16%)
Seguridad	209	308

- ITT
 - Distribuido aleatoriamente
 - Recibió parte de la infusión
 - Analizado como distribuido aleatoriamente
- Por Protocolo
 - Como antes pero adherido al protocolo
- Seguridad
 - Distribuido aleatoriamente
 - Recibió parte de la infusión
 - Analizado tal como fue recibido

Demografía de los pacientes:

	<u>Placebo</u> (n=201)	<u>Rituximab</u> 2 x 1000 mg (n=298)
Sexo		
Femenino	82%	81%
Masculino	18%	19%
Edad (Promedio, Años)	53	52
Dosis de metotrexato (mg/semana)	15	15
DMARD previos (promedio)	2,5	2,6
Número de terapias anti-TNF previas	1,5	1,5
Pacientes que recibieron corticosteroides concomitantes*	78%	74%
Pacientes que recibieron NSAID o COX2*	75%	67%

Características de la Enfermedad de los Pacientes en la Línea de Base

	<u>Placebo</u>	<u>Rituximab</u>
	(n=201)	2 x 1000 mg (n=298)
Duración de la enfermedad (años)	11,7	12,2
SJC (promedio)	23	23
TJC (promedio)	33	34
RF Positivo	80%	79%
RF (promedio, IU/l)	320	328
CRP (promedio, mg/dl)	3,8	3,8
ESR (promedio, mm/h)	48	48
DAS28	6,8	6,9

Disposición de los pacientes

	<u>Placebo</u>	<u>Rituximab</u>
		2 x 1000 mg
Distribuidos aleatoriamente	209	308
Retirados	97 (46%)	54 (18%)
Eventos adversos	1 (<1%)	8 (3%)
Muertes	-	-
Respuesta insuficiente	83 (40%)	36 (12%)
Tratamiento rechazado	5 (2%)	5 (2%)
Otros	8 (4%)	5 (2%)
24 semanas completadas	112 (54%)	254 (82%)

Los resultados de eficacia del estudio son mostrados en las Figuras 1-12.

Los resultados radiográficos del estudio son mostrados en las Figuras 13-17.

El cambio promedio en los parámetros establecidos esenciales de ACR es mostrado en la Figura 18.

El análisis de seguridad del estudio es mostrado en las Figuras 19-31.

Las conclusiones del estudio REFLEX fueron:

- El rituximab fue asociado con un aumento significativo en la tasa de respuesta ACR20 sobre el placebo (punto final primario).
- Todos los puntos finales secundarios y exploratorios (DAS, EULAR, conjunto esencial de ACR) soportaron el análisis primario.
- Los resultados radiográficos indican que el ramal de tratamiento mostró una calificación total Sharp-Genant menor durante las 24 semanas versus el ramal de placebo (Fig. 13), una calificación de erosión Sharp-Genant menor durante las 24 semanas versus el ramal de placebo (Fig. 14), una calificación de JSN Sharp-Genant menor durante las 24 semanas versus el ramal de placebo (Fig. 15), una proporción mucho mayor de pacientes sin cambio en la calificación de erosión a las 24 semanas del tratamiento versus el ramal de placebo (Fig. 16), con un resumen de los puntos finales radiográficos en la semana 24 para los ramales de placebo y tratamiento proporcionado en la Fig. 17.
- El rituximab fue generalmente bien tolerado.
 - Eventos relacionados con la infusión.
 - Tasa de todas las infecciones comparable al placebo.
 - Ligero aumento en tasa/incidencia de infecciones serias.

- Ningún impacto significativo sobre las inmunoglobulinas.
- Bajo HACA.

Resultados a las 56 semanas:

	N° de pacientes (%) *	
	Placebo (n=186)	Rituximab (n=277)
Completaron 56 semanas	141 (76)	202 (73)
Se retiraron	46 (25)	75 (27)
Se retiraron y recibieron tratamiento con inhibidor de TNF	12 (6,5)	29 (10,5)

* Pacienets con datos radiográficos disponibles a las 56 semanas.

La Fig. 41 ilustra adicionalmente la disposición de pacientes del ensayo clínico REFLEX a las 56 semanas, incluyendo tratamientos en curso de subgrupos de pacientes seleccionados de los ramales de tratamiento y placebo del ensayo clínico REFLEX Fase III.

Tal como se muestra en la Fig. 42, a la semana 56 el cambio promedio en la calificación de Sharp modificada por Genant total (Genant, *Am. J. Med.*, 30: 35-47 (1983)), en el estrechamiento del espacio entre la articulación (JSN) y en la calificación de erosión mostraron todos una mejoría estadísticamente significativa sobre el placebo.

La eficacia del tratamiento con rituximab es adicionalmente ilustrada por el cambio promedio en la calificación Sharp-Genant total con el tiempo. Tal como se muestra en la Figura

43, la mejoría ha continuado desde la semana 24 hasta la semana 56.

La Figura 44 muestra la distribución acumulativa del cambio en la calificación Sharp-Genant total.

La Figura 45 muestra los resultados de los análisis de sensibilidad, expresados por el cambio en la calificación Sharp-Genant total. El ramal de tratamiento con rituximab + MTX ha sido consistentemente superior al ramal de tratamiento con placebo + MTX.

La Figura 46 muestra el porcentaje de pacientes que no mostraron cambios radiográficos en el punto de observación en la semana 56 en la condición de la articulación, según lo medido por la calificación de erosión y la calificación Sharp modificada por Genant, respectivamente.

En conclusión, los resultados de este ensayo clínico muestran que el rituximab inhibe significativamente la progresión radiográfica en pacientes con artritis reumatoide (RA) con una respuesta inadecuada o intolerancia a uno o más inhibidores de TNF. Además, este estudio proporciona la primera indicación de que una terapia que apunta a las células B puede inhibir la progresión radiográfica.

Ejemplo 2

Rituximab en RA: Programa de Fase III

Un resultado importante a ser evaluado en RA incluye la inhibición de la progresión de daño estructural en la articulación y la mejoría en la función física. Este resultado es particularmente importante para pacientes que han sido diagnosticados recientemente con RA, ya que el impacto temprano sobre las mismas tiene un beneficio a largo plazo

potencialmente superior. Genovese y col., Arthritis Rheum. 46: 1443-1450 (2002). Una población de pacientes con RA temprana sería por lo tanto una población apropiada a ser estudiada para determinar estos resultados importantes.

Con respecto a un tratamiento de control adecuado para estos pacientes, la terapia estándar dorada actual para RA temprana es MTX. En consecuencia, la selección de una población de pacientes ingenuos de MTX y la comparación de rituximab más MTX con MTX solo proporciona una comparación de este nuevo enfoque de tratamiento contra la norma dorada actual para estos pacientes.

Este estudio es un estudio en centros múltiples de grupos paralelos, doble ciego, controlado en Fase II, de distribución aleatoria, para evaluar la seguridad y la eficacia del rituximab en combinación con MTX comparado con MTX solo, en pacientes ingenuos de MTX con RA activa.

Objetivos primarios:

1. Determinar la eficacia del rituximab en la prevención de la progresión en el daño estructural en la articulación y evaluar la seguridad del rituximab en pacientes con RA activa que iniciaron un tratamiento con MTX.
2. Evaluar la eficacia del rituximab para mejorar la función física del paciente y los signos y síntomas de RA.
3. Investigar mediante un enfoque de análisis de la población la farmacocinética (PK) del rituximab en la población objetivo de pacientes con RA y la influencia de co-variables sobre los parámetros de PK.
4. Explorar la eficacia y la seguridad a largo plazo de cursos adicionales de rituximab.

Primer curso - Diseño del estudio:

Grupo A: rituximab 500 mg i.v. x 2 más MTX (7,5 mg intensificados a 20 mg p.o.)

Grupo B: rituximab 1000 mg i.v. x 2 más MTX (7,5 mg intensificados a 20 mg p.o.)

Grupo C: placebo de rituximab i.v. x 2 más MTX (7,5 mg intensificados a 20 mg p.o.)

Para los pacientes del Grupo C, desde la semana 104, un re-tratamiento con cursos de rituximab 500 mg i.v. x 2 más MTX estaban disponibles para pacientes elegibles.

Se aplican las siguientes normas para re-tratamiento, en línea con los regímenes anteriores:

Segundo curso

Un segundo curso de rituximab más MTX o placebo más MTX será administrado lo más pronto que sea factiblemente posible cuando se logre lo siguiente:

1. Ha transcurrido un mínimo de 24 semanas desde la primera infusión del último curso de mediación en estudio.
2. DAS28-ESR > 2,6
3. Los criterios de elegibilidad para conteo absoluto de neutrófilos (no inferior a $1,5 \times 10^3 \mu\text{l}$), IgG (no inferior a 5,0 mg/ml) e IgM (no inferior a 0,40 mg/ml) fueron satisfechos en el último análisis de muestras de sangre.

Además, el paciente debe satisfacer los criterios de exclusión de elegibilidad 8, 10 y 11 como se describen más adelante:

1. Enfermedad cardíaca o pulmonar significativa (incluyendo enfermedad pulmonar obstructiva).

2. Inmunodeficiencia primaria o secundaria (historia de la misma, o actualmente activa), incluyendo historia conocida de infección por VIH.

3. Infección activa conocida de cualquier tipo (excluyendo infección por hongos de la matriz de la uña), o cualquier episodio mayor de infección que requirió hospitalización o tratamiento con anti-infecciosos i.v. dentro de las 4 semanas de la infusión o compleción de anti-infecciosos orales dentro de las 2 semanas antes de la infusión.

Los pacientes que no satisfacen los criterios para un segundo curso de rituximab/placebo en la semana 24 serán seguidos cada 4 a 8 semanas y recibirán subsiguientemente el segundo curso en el momento en que se hagan elegibles en base a los criterios anteriores.

Cursos adicionales:

A partir de la semana 48 los pacientes pueden hacerse elegibles para recibir un tercer curso de rituximab/placebo. El tercer curso y los cursos adicionales pueden ser solamente administrados a pacientes que han satisfecho los criterios anteriores para el segundo curso y en quienes el investigador considera que ha habido una respuesta clínica relevante después del primer o el segundo curso de rituximab. Los pacientes que nunca tuvieron una respuesta clínica deben ser retirados a un seguimiento de seguridad (SFU por sus siglas en inglés).

Los pacientes que se considera que han tenido una respuesta clínica, pero no satisfacen actualmente los criterios para cursos adicionales de rituximab serán seguidos cada 4 semanas desde la semana 48 hasta la semana 56 y entonces cada 8 semanas y recibirán subsiguientemente unos cursos adicionales en el

momento en que se hagan elegibles en base a los criterios anteriores.

Todos los pacientes recibirán pre-medicación con 100 mg i.v. de metilprednisolona antes de cada infusión. Todos los pacientes recibirán también una dosis estable de folato (por lo menos 5 mg/semana) proporcionado como una sola dosis o como una dosis semanal dividida.

Todos los pacientes deben continuar recibiendo cualquier corticosteroide de acompañamiento (por lo menos 10 mg/día de prednisona o equivalente) o medicamentos anti-inflamatorios no esteroides (NSAID) orales a una dosis estable. La distribución aleatoria será estratificada por región (EE.UU. o Resto del Mundo (ROW por sus siglas en inglés)) y factor reumatoide (positivo o negativo) para asegurar una asignación balanceada de pacientes a través de la región y condición RF entre ramales de tratamiento.

Los pacientes asistirán a la clínica una vez cada 4 semanas durante las primeras 24 semanas y cada 8 semanas posteriormente (excepto por las semanas 48-56 en las cuales las visitas serán cada 4 semanas) para evaluaciones de eficacia, seguridad, inmunología y calidad de vida. Las evaluaciones radiográficas serán conducidas en el despistaje, la semana 24 y la semana 52. Las evaluaciones radiográficas también serán conducidas en los años 2 y 3 después de la primera dosis de medicación en estudio.

La evaluación del punto final primario (cambio en la calificación Sharp modificada total) ocurrirá a las 52 semanas. Los puntos finales secundarios y exploratorios incluirán puntos

finales radiográficos adicionales y signos y síntomas, función física y puntos finales de remisión.

En cualquier momento después de la evaluación radiográfica en la semana 52, los pacientes que no tienen una mejoría del 20% en los conteos de articulaciones sensibles y articulaciones hinchadas pueden recibir terapia de rescate con una dosis aumentada de MTX o un DMARD no biológico.

Todos los pacientes que se retiran del estudio en cualquier punto o completan el período de tratamiento total deben retornar para evaluaciones de SFU en las semanas 4, 12, 24, 36 y 48 después del retiro o la compleción. Esto sigue de manera efectiva al paciente por un año después de que el paciente se retira del estudio o lo completa. Si el conteo de células B periféricas (CD19) del paciente no ha retornado a su nivel de línea de base o al intervalo normal, el que sea más bajo, después de un año, las visitas de seguimiento de seguridad deben continuar siendo realizadas a intervalos de 12 semanas hasta que ocurra repleción de células B.

Para todos los eventos adversos infecciosos serios reportados unos conteos de CBC, diferenciales, plaquetas, Ig cuantitativa y CD19 deben ser determinados dentro de una semana después de que el evento adversos infeccioso se hizo serio.

Los pacientes que se retiran a SFU deben ser fuertemente alentados a retornar para todas las evaluaciones radiográficas programadas (en las semanas 24, 52, 104 y 152) independientemente de su punto de retiro del estudio. Las radiografías para estos pacientes deben ser tomadas en línea con el programa original de evaluaciones, con relación al día original de distribución aleatoria.

Aproximadamente 852 pacientes serán reclutados para este estudio y serán aleatoriamente distribuidos equitativamente en tres grupos de tratamiento. Los pacientes serán estratificados por región (EE.UU. o ROW) y condición de RF (RF positivo por lo menos 20 IU/ml o RF negativo inferior a 20 IU/ml). La proporción general de pacientes de RF negativo será limitada a 20% del tamaño de muestra total. El reclutamiento será competitivo, no más de 70% y no menos de 30% siendo inscritos en cada región. No habrá reemplazo de pacientes si el tratamiento de un paciente es discontinuado por cualquier razón.

Población objetivo:

La población objetivo para este estudio es de pacientes con RA activa temprana, que son ingenuos a MTX.

Criterios de inclusión:

Los pacientes deben satisfacer los siguientes criterios para ser elegibles para su entrada al estudio:

1. Capaces y dispuestos a proporcionar un consentimiento informado por escrito y de cumplir con los requerimientos del protocolo del estudio.
2. Pacientes con RA diagnosticada por al menos 8 semanas, pero no más de 4 años, de acuerdo con los criterios del ACR revisados en 1987 para la clasificación de la RA.
3. Pacientes ingenuos a, y considerados como siendo candidatos para, el tratamiento con MTX.
4. Conteo de articulaciones hinchadas (SJC) de por lo menos 8 (conteo de 66 articulaciones) y conteo de articulaciones sensibles (TJC) de por lo menos 8 (conteo de 68 articulaciones) en el despistaje y en la línea de base.

5. CRP en el despistaje de por lo menos 1,2 mg/dl (12 mg/l).
6. Edad de 18-80 años.
7. Un glucocorticoide, por lo menos 10 mg/día de prednisolona o equivalente es permitido si está estable por al menos cuatro semanas antes de la línea de base.
8. El uso de NSAID es permitido si está estable por al menos dos semanas antes de la línea de base.
9. Para pacientes de potencial reproductivo (masculinos y femeninos), uso de un medio confiable de contracepción (por ejemplo anticonceptivo hormonal, parche, dispositivo intrauterino, barrera física) durante toda la participación en el estudio.
10. Debe estar dispuesto a recibir folato oral.
11. Para pacientes de RF negativo solamente, evidencia radiográfica de por lo menos una articulación con erosión definida atribuible a RA.
12. Pacientes que deben recibir, o que están actualmente recibiendo, tratamiento como pacientes no hospitalizados.

Criterios de exclusión:

1. Enfermedad autoinmune reumática diferente a RA, o complicación sistémica significativa secundaria a RA (incluyendo pero no limitada a vasculitis, fibrosis pulmonar o síndrome de Felty). Se permite síndrome de Sjögren secundario o vasculitis cutánea limitada secundaria con RA.
2. Clase IV funcional según lo definido por la Clasificación del ACR de la Condición Funcional en RA.
3. Historia, o condición actual, de enfermedad inflamatoria de la articulación diferente a RA (incluyendo, pero no limitada a, gota, artritis reactiva, artritis por soriasis,

espondiloartropatía seronegativa, enfermedad de Lyme), u otro trastorno autoinmune sistémico (incluyendo, pero no limitado a, lupus sistémico eritematoso, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerodermia, miopatía inflamatoria, enfermedad del tejido conectivo mezclado o cualquier síndrome de superposición).

4. Diagnóstico de artritis idiopática juvenil (JIA) o RA juvenil (JRA) y/o RA antes de los 16 años.

Exclusiones relacionadas con la salud general:

5. Cualquier procedimiento quirúrgico, incluyendo cirugía/sinovectomía de hueso/articulación (incluyendo fusión o reemplazo de articulación) dentro de las 12 semanas previas a la línea de base o planificadas durante el estudio.

6. Ausencia de acceso venoso periférico.

7. Embarazo o lactancia.

8. Enfermedad cardíaca o pulmonar significativa y/o no controlada (incluyendo enfermedad pulmonar obstructiva).

9. Evidencia de enfermedad concomitante significativa, incluyendo, pero no limitada a, trastornos del sistema nervioso, renales, hepáticos, endocrinos o gastrointestinales que, en la opinión del investigador, impedirían la participación del paciente.

10. Inmunodeficiencia primaria o secundaria (historia de la misma, o actualmente activa), incluyendo historia conocida de infección por VIH.

11. Infección activa conocida de cualquier tipo (excluyendo infecciones por hongos de las matrices de las uñas), o cualquier episodio mayor de infección que requiere hospitalización o tratamiento con anti-infecciosos i.v. dentro

de las 4 semanas de la línea de base o compleción de anti-infecciosos orales dentro de las 2 semanas antes de la línea de base.

12. Historia de infección del espacio/tejido profundo (por ejemplo fasciitis, absceso, osteomielitis) dentro de las 32 semanas antes de la línea de base.

13. Historia de infección recurrente o crónica seria (para el despistaje de una infección de tórax una radiografía de tórax será realizada en el despistaje si no fue realizada dentro de las 12 semanas previas al despistaje).

14. Historia de cáncer, incluyendo tumores sólidos, malignidades hematológicas y carcinoma in situ (excepto carcinoma de células basales y células escamosas de la piel que han sido extirpadas y curadas).

15. Cualquier trastorno neurológico (congénito o adquirido), vascular o sistémico que podría afectar cualquiera de las evaluaciones de eficacia, en particular, dolor e hinchazón de una articulación (por ejemplo enfermedad de Parkinson, parálisis cerebral, neuropatía diabética).

16. Abuso de alcohol o drogas actualmente activo o historia de abuso de alcohol o drogas dentro de las 24 semanas previas a la línea de base.

Exclusiones relacionadas con las medicaciones:

17. Historia de una reacción alérgica o anafiláctica severa a un agente biológico o hipersensibilidad conocida a cualquier componente de rituximab o a proteínas murinas.

18. Tratamiento previo con cualquier agente biológico aprobado o en investigación para RA.

19. Tratamiento previo con un anticuerpo anti-integrina alfa 4 o un modulador de co-estimulación.
 20. Tratamiento concurrente con cualquier agente biológico o DMARD diferente a MTX. El tratamiento debe ser discontinuado 14 días antes de la línea de base, excepto por los siguientes: azatioprina por al menos 28 días; leflunomida por al menos 8 semanas (o por lo menos 14 días después de 11 días de lavado estándar con carbón activado o colestiramina).
 21. Tratamiento previo con cualquier terapia de depleción celular, incluyendo agentes de investigación (por ejemplo CAMPATH, anti-CD4, anti-CD5, anti-CD3, anti-CD19, anti-CD11a, anti-CD22, BLys/BAFF y anti-CD20).
 22. Tratamiento con cualquier agente de investigación dentro de los 28 días de la línea de base o cinco vidas medias del medicamento en investigación (lo que sea más largo).
 23. Recepción de una vacuna viva/atenuada dentro de los 28 días previos a la línea de base (se recomienda que un registro de vacunación del paciente y la necesidad de inmunización antes de recibir rituximab/placebo sean cuidadosamente investigados).
 24. Glucocorticoides intra-articulares o parenterales dentro de las 4 semanas previas a la línea de base.
 25. Intolerancia o contraindicaciones a glucocorticoides i.v.
- Exclusiones relacionadas con los hallazgos de laboratorio:*
26. Gonadotropina coriónica humana (hCG) positiva en suero medida antes de la primera infusión de rituximab.
 27. Pruebas positivas para antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), anticuerpo de núcleo de hepatitis B (HBsAb) y serología de hepatitis C.
 28. Hemoglobina inferior a 8,0 g/dl.

29. Concentraciones de IgG y/o IgM en suero inferiores a 5,0 y 0,40 mg/ml, respectivamente.

30. Conteo absoluto de neutrófilos (ANC) inferior a $1,5 \times 10^3 / \mu\text{l}$.

31. AST o ALT mayor a 2,5 veces el límite superior de lo normal.

El final del tratamiento es definido como el punto de tiempo de 3 años, después de lo cual habrá un período adicional de por lo menos un año de SFU.

Rituximab (500 mg o 1000 mg) más MTX o placebo más MTX serán administrados por infusión i.v. en los días 1 y 15. Los pacientes pueden ser elegibles para re-tratamiento (dos dosis espaciadas 14 días) con una frecuencia máxima de un re-tratamiento cada 24 semanas. Los pacientes originalmente distribuidos aleatoriamente para recibir rituximab más MTX recibirán re-tratamiento a la misma dosis durante todo el estudio. Desde la semana 104 los pacientes originalmente distribuidos aleatoriamente a placebo más MTX pueden ser elegibles para recibir rituximab (500 mg) más MTX. La premedicación con 100 mg de metilprednisolona i.v. debe ser administrada antes de cada infusión.

Unas tabletas de metotrexato (7,5 mg/semana intensificados a 20 mg/semana) serán administradas oralmente a todos los grupos.

Se recomienda que todos los pacientes sean pre-medicados con paracetamol/acetaminofén (1 g p.o.) y difenhidramina HCl (100 mg i.v. o antihistamina equivalente oral) 30 a 60 minutos antes del comienzo de una infusión para reducir el potencial de reacciones a la infusión.

Los pacientes recibirán folato o equivalente (por lo menos 5 mg/semana) proporcionado como una dosis única o como una dosis semanal dividida.

Los pacientes pueden continuar recibiendo cualquier glucocorticoide de acompañamiento (por lo menos 10 mg/día de prednisona o equivalente). Unos analgésicos pueden ser usados para el dolor si se requiere.

El punto final primario es el cambio desde el despistaje en la calificación Sharp modificada total en la semana 52 usando la población destinada a ser tratada (ITT por sus siglas en inglés) modificada.

Los puntos finales secundarios radiográficos son:

1. Un cambio en la calificación Sharp total modificada en las Semanas 24 y 104
2. Un cambio en la calificación de erosión Sharp modificada en la Semana 52
3. Un cambio en la calificación de estrechamiento de espacio de articulación modificada en la Semana 52
4. La proporción de pacientes sin progresión radiográfica en la Semana 52 (definida como cambio en la calificación Sharp modificada total inferior o igual a 0). Además, la proporción de pacientes sin progresión radiográfica en las Semanas 24 y 104 será analizada.

Los puntos finales exploratorios radiográficos son:

1. Un cambio en las calificaciones Sharp modificadas será presentado contra el tiempo.
2. La proporción de pacientes sin progresión radiográfica en las Semanas 24, 52 y 104 será adicionalmente presentada en las siguientes sub-categorías:

a. Proporción de pacientes sin cambio en la calificación de erosión Sharp modificada desde el despistaje.

b. Proporción de pacientes sin cambio en la calificación de estrechamiento de espacio de articulación modificada desde el despistaje.

c. Proporción de pacientes sin articulaciones recién erosionadas.

Las evaluaciones radiográficas serán efectuadas como sigue: unas radiografías separadas de cada mano posterior-anterior (PA) y cada pie posterior-anterior (PA) serán tomadas de acuerdo con el programa de evaluaciones. En la visita de despistaje la legibilidad y la calidad de las radiografías (como se puede encontrar en un manual de procedimiento para exámenes radiográficos de las manos, las muñecas y los pies) deben ser confirmadas antes de que el paciente abandone el lugar. Las radiografías para pacientes de RF negativo en la visita de despistaje serán verificadas para determinar la evidencia radiográfica de por lo menos una articulación con una erosión definida atribuible a RA por el sitio de lectura central. Todas las radiografías serán evaluadas usando el método de acuerdo con Sharp, modificado por Genant, *Am. J. Med.*, 30: 35-47 (1983). La evaluación primaria será el cambio desde el despistaje en la calificación Sharp modificada total en la semana 52. La calificación Sharp modificada total combina una calificación de erosión y una calificación de estrechamiento de espacio de articulación de manos y pies. La calificación de erosión total máxima en las manos es 100 y en los pies 42, la calificación máxima para estrechamiento de espacio de articulación en las manos es 100 y en los pies 48.

La calificación Sharp modificada total máxima que puede ser lograda es 290. El cambio en calificación en la semana 52 es calculado como:

Cambio = calificación en la semana 52 menos calificación en el despistaje.

Se tomarán radiografías de las manos y los pies para calcular una calificación Sharp modificada total. Antes de comenzar el ensayo todos los departamentos de radiología participarán en sesiones de entrenamiento para normalizar las radiografías. Esto incluirá normalización para procedimientos de validación para equipos, películas, casetes, colocación de manos/pies y procedimientos para obtener radiografías consistentes.

Se espera que el cambio en la calificación Sharp modificada total sea asimétrico y por ello no distribuido normalmente. Por lo tanto, el cambio en la calificación Sharp modificada total en la semana 52 será probado entre grupos de tratamiento usando una prueba estadística no paramétrica de estratificación por región y condición de RF. Sin embargo, si se muestra que los datos están aproximadamente distribuidos normalmente, los datos serán analizados usando un modelo de análisis de varianza (ANOVA) con región, condición de RF y grupos de tratamiento como términos exploratorios en el modelo.

El principio de cierre será usado para ajustar múltiples comparaciones en el punto final primario. La primera comparación será entre cada uno de los tres ramales de tratamiento usando una prueba estadística Kruskal-Wallis..

Los tres ramales de tratamiento serán considerados diferentes si hay suficiente evidencia estadística para rechazar la siguiente hipótesis nula:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

es decir, sin evidencia de que haya cualquier diferencia en el cambio en la calificación Sharp modificada total en cualquiera de los ramales de tratamiento,

y aceptar la hipótesis alternativa:

$$H_1: \mu_1 \text{ no es igual a } \mu_2, \text{ o } \mu_1 \text{ no es igual a } \mu_3, \text{ o } \mu_2 \text{ no es igual a } \mu_3$$

es decir, hay una diferencia en el cambio en la calificación Sharp modificada total en por lo menos una de las comparaciones de tratamiento en pares.

Si el resultado de prueba es estadísticamente significativo en un nivel $\alpha = 0,05$, se concluye que hay una diferencia en el cambio desde la línea de base en la calificación Sharp modificada total en la semana 52, entre los ramales de tratamiento.

Subsiguientemente, cada uno de los grupos de rituximab es comparado con el grupo de placebo, en el nivel $\alpha = 0,05$, como se describe más adelante. Las comparaciones primarias serán consideradas como el grupo de dosis de rituximab individual versus el grupo de placebo, usando la prueba estadística de Van Elteren.

Cada uno de los ramales tratados con rituximab será considerado superior al placebo si hay suficiente evidencia estadística para rechazar la siguiente hipótesis nula:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

es decir, sin evidencia de que el cambio en la calificación Sharp modificada total en el ramal de rituximab sea superior al ramal de placebo, y aceptar la hipótesis alternativa:

$H_1: \mu_1$ no es igual a μ_2

es decir, el cambio en la calificación Sharp modificada total en el ramal de rituximab es superior al ramal de placebo.

Si el resultado de prueba es estadísticamente significativo en un nivel $V = 0,05$, se concluirá que el ramal de rituximab demostró un cambio superior desde la línea de base en la calificación Sharp modificada total en la semana 52 cuando se compara con el ramal de placebo.

Se hará un esfuerzo por asegurar, siempre que sea posible, que los pacientes regresen para sus visitas radiográficas, incluso si se retiran del medicamento en estudio. Los datos faltantes en la semana 52 serán imputados usando los siguientes métodos:

Si faltan los datos radiográficos de la semana 52, entonces los datos radiográficos de la semana 24 serán usados para extrapolar linealmente el resultado de la semana 52 de ese paciente. Aquellos pacientes que se retiren prematuramente del estudio antes de la semana 52 serán incluidos como parte del análisis de datos radiográficos de la semana 52. Cualquier paciente que no tenga datos radiográficos posteriores al despistaje será excluido de la población ITT modificada y por lo tanto del análisis de punto final primario.

La influencia de los desequilibrios potenciales en las asignaciones de tratamiento dentro de sitio particulares será investigada. Unos análisis de sensibilidad serán realizados

para evaluar el impacto de sitios fuertemente desequilibrados en el análisis primario.

En cuanto a los puntos finales secundarios radiográficos, el cambio en la calificación Sharp modificada total en las semanas 24 y 104 será analizado de la misma manera que se especificó para el punto final primario. El cambio en la calificación de erosión Sharp modificada en la semana 52 será analizado de la misma manera que se especificó para el punto final primario. Además, el cambio en la calificación de erosión Sharp modificada en las semanas 24 y 104 será analizado. El cambio en la calificación de estrechamiento de espacio de articulación modificada en la semana 52 será analizado de la misma manera que se especificó para el punto final primario. Además, el cambio en la calificación de estrechamiento de espacio de articulación modificada en las semanas 24 y 104 será analizado. La proporción de pacientes sin progresión radiográfica en la semana 52 (definida como un cambio en la calificación Sharp modificada total inferior o igual a 0) será evaluada como sigue: La diferencia en las proporciones será ensayada usando una prueba estadística de Cochran-Mantel Haenszel (CMH) estratificando por región y condición de RF. Además, la proporción de pacientes sin progresión radiográfica en las semanas 24 y 104 será analizada.

En cuanto a los puntos finales exploratorios radiográficos, el cambio en las calificaciones Sharp modificadas totales será presentado contra el tiempo. La proporción de pacientes sin progresión radiográfica en las semanas 24, 52 y 104 será adicionalmente presentada en las siguientes sub-categorías:

- Proporción de pacientes sin cambio en la calificación de erosión Sharp modificada desde el despistaje
- Proporción de pacientes sin cambio en la calificación de estrechamiento de espacio de articulación modificada desde el despistaje
- Proporción de pacientes sin articulaciones recién erosionadas.

Los detalles de las articulaciones para evaluación radiográfica y escalas de graduación (Genant, *Am. J. Med.*, 30: 35-47 (1983)) son como sigue:

Escalas de Graduación:

1. Estrechamiento de Espacio de Articulación (JSN)

Grado 0 - Normal

Grado 0,5 - JSN sutil o hallazgos equívocos.

Grado 1,0 - JSN suave (focal o menor).

Grado 1,5 - JSN suave a moderado.

Grado 2,0 - JSN moderado.

Grado 2,5 - JSN moderado a severo.

Grado 3,0 - JSN severo.

Grado 3,5 - JSN severo cercano a anquilosis.

Grado 4,0 - Anquilosis definida.

2. Erosiones (interrupción discreta de la superficie cortical)

Grado 0 - Normal

Grado 0,5 - Pérdida sutil de continuidad cortical o hallazgos equívocos de erosión ósea.

Grado 1,0 - Suave. Erosiones definidas pero pequeñas de uno o ambos huesos de la articulación, usualmente en las áreas

desnudas que involucran menos de 25% de las superficies de la articulación.

Grado 1,5 - Suave a moderada. Erosiones pequeñas-medianas que involucran menos de 25% de la superficie articular de uno o ambos huesos de la articulación.

Grado 2,0 - Moderada. Erosiones medianas-grandes que involucran 26-50% de la superficie articular de ambos huesos de la articulación.

Grado 2,5 - Moderada a severa. Erosiones de 51-75% de las superficies articulares.

Grado 3,0 - Severa. Erosiones de 76-90% de las superficies articulares.

Grado 3,5 - Muy severa. Erosiones de 100% de las superficies articulares (destrucción total de las superficies articulares).

Evaluación de la Articulación:

1. Estrechamiento de Espacio de Articulación en la mano (13 articulaciones por mano)

a. Todas las articulaciones interfalangianas próximas (PIP) en los dígitos II-V.

b. La articulación interfalangiana en el dígito I.

c. Todas las articulaciones metacarpofalangianas (MCP).

d. Las articulaciones carpometacarpales (CMC) de los dígitos III-V como una sola unidad.

e. El espacio pericapitado (escafoide-capitado y lunado-capitado combinado).

f. La articulación radiocarpal.

2. Calificaciones de Erosión en la mano (15 articulaciones por mano)

a. Todas las articulaciones interfalangianas próximas (PIP) en los dígitos II-V.

b. La articulación interfalangiana en el dígito I.

c. Todas las articulaciones metacarpofalangianas (MCP).

d. Las articulaciones carpometacarpales (CMC) del dígito I.

e. El hueso escafoides.

f. El radio distal.

g. La ulnar distal.

Las calificaciones serán sumadas por separado ($14 \times 3,5$ máximo por articulación $\times 2 = 98$ para las erosiones y 13×4 máximo por articulación $\times 2$ para JSN). Cada suma será normalizada a una escala de 0 - 100. Ambas calificaciones serán sumadas para obtener una calificación total (escala 0 - 200).

3. Estrechamiento de Espacio de Articulación y Erosiones (6 articulaciones por pie)

a. Todas las articulaciones metatarsofalangianas (MTP).

b. Todas las articulaciones interfalangianas en el dígito I.

Las calificaciones serán sumadas por separado ($6 \times 3,5$ máximo por articulación $\times 2 = 42$ para las erosiones y 6×4 máximo por articulación $\times 2 = 48$ para JSN. Ambas calificaciones serán sumadas para obtener una calificación total con una escala 0 - 90.

Las radiografías originales serán enviadas al sitio de lectura central, en donde su calidad será controlada. Si la radiografía inicial fuera de calidad inaceptable, el centro será aconsejado en cuando a las correcciones que son necesarias e instruido para obtener una segunda radiografía.

Todos los pacientes distribuidos aleatoriamente en el estudio que han recibido por lo menos parte de una dosis de rituximab (incluyendo aquéllos que se han retirado a un seguimiento de seguridad) tendrán radiografías de manos/muñecas y pies tomadas en las semanas 24, 52, 104 y 152. Se alentará fuertemente a los pacientes para que regresen para todas las evaluaciones radiográficas independientemente de su punto de retiro del estudio. Las radiografías de estos pacientes deben ser tomadas en línea con el programa original de evaluaciones, con relación al día original de distribución aleatoria.

Unos puntos finales secundarios y exploratorios adicionales serán para signos y síntomas, función física, remisión y resultados reportados por los pacientes.

El cambio en la calificación Sharp modificada total en la semana 52 será probado entre grupos de tratamiento usando una prueba estadística no paramétrica estratificando por región y condición de RF. Sin embargo, si se muestra que los datos están aproximadamente distribuidos normalmente, los datos serán analizados usando un modelo de análisis de varianza (ANOVA) con región, condición de RF y grupos de tratamiento como términos exploratorios en el modelo.

Es claramente conveniente mantener los pacientes en una condición de baja actividad de la enfermedad limitando los ataques de enfermedad y limitando potencialmente la progresión del daño estructural. En el estudio DANCER mencionado anteriormente (Emery y col., *EULAR, supra*, y Van Vollenhoven y col., *EULAR, supra*), en la semana 24, aproximadamente 90% de los pacientes tratados con rituximab no había logrado remisión EULAR (DAS28). En el estudio que es el tema de este Ejemplo,

tales pacientes serían elegibles para recibir su primer re-tratamiento de rituximab en la semana 24. El re-tratamiento obligatorio basado en DAS28-ESR proporciona una información objetivo con respecto a un paradigma de re-tratamiento basado en la actividad de la enfermedad. El período mínimo de 24 semanas entre cursos es recomendado en base a la farmacocinética y la farmacodinámica del rituximab. Sin estar limitados por alguna teoría en particular, la farmacocinética y la farmacodinámica del rituximab parecen demostrar que, en este momento (semana 24), los niveles de medicamento están por debajo del nivel de detección y hay evidencia de retorno de células CD19+ periféricas. Esto es paralelo a un aumento aparente en la actividad de la enfermedad después de este punto en el tiempo, y por lo tanto representa un punto razonable a partir del cual unos cursos adicionales podrían ser proporcionados.

Se espera que el rituximab (o un anticuerpo 2H7 humanizado que sustituye al rituximab) en combinación con MTX será eficaz para satisfacer el punto final primario en la prevención de la progresión en el daño estructural en la articulación como se expone en este Ejemplo. También se espera que el régimen de este estudio satisfará uno o más de los puntos finales radiográficos secundarios. Así, se espera que la administración de una primera dosis de rituximab o 2H7 humanizado (a 500 mg x 2 o 100 mg x 2) con metotrexato reducirá el daño en la articulación desde la línea de base (antes de la primera administración de anticuerpo CD20), según lo medido por la calificación Sharp total modificada, por lo menos aproximadamente un mes desde la línea de base o el inicio del

tratamiento, preferiblemente por lo menos aproximadamente 24 semanas desde la línea de base, de preferencia por lo menos aproximadamente 52 semanas desde la línea de base, y en puntos de tiempo adicionales hasta 104 semanas desde la línea de base. También se espera que los pacientes pueden ser re-tratados de manera eficaz a las 24 semanas o 52 semanas desde la línea de base para mantener su prevención de progresión del daño en la articulación.

Se predice y se espera que la administración de rituximab o un 2H7 humanizado al sujeto en el protocolo de re-dosificación programada expuesto anteriormente será efectiva para prevenir la progresión del daño estructural en la articulación en la semana 52 o posteriormente. Se espera que estos resultados serán significativamente mejores que aquéllos del control.

También se espera que, en aproximadamente la semana 48-54, otra dosis de 1 g o 2 g del anticuerpo CD20 (por ejemplo rituximab o un 2H7 humanizado) proporcionada toda de una vez o distribuida en aproximadamente 14-16 días en cantidades de 0,5 o 1 gramo sería efectiva para tratar el daño en la articulación para el segundo año entero, con o sin uno o más segundos medicamentos tales como agentes inmunosupresores. Así, el anticuerpo CD20 sería administrado inicialmente dentro de aproximadamente el período de tiempo de 2 semanas, seguido por otro tratamiento a aproximadamente 4-8 meses, seguido por otro tratamiento a aproximadamente un año desde el tratamiento inicial (medido desde el momento en que una cualquiera de las dosis fue administrada), seguido por un tratamiento a aproximadamente dos años desde el tratamiento inicial, con éxito esperado, en dosificaciones de aproximadamente medio

gramo o un gramo x 2-4 para cada tratamiento, administradas conjuntamente, aproximadamente semanalmente, o aproximadamente cada dos semanas durante aproximadamente dos a cuatro semanas. Se espera que los resultados de este tratamiento serían mucho mejores que aquéllos del control con placebo. Se espera que este protocolo de re-tratamiento será exitosamente usado por varios años con pocos o ningún efecto adverso.

También se contempla que el rituximab u otro anticuerpo CD20 satisfará el punto final primario como una monoterapia usando el mismo régimen a la misma dosis o una dosis superior sin un segundo medicamento tal como MTX, y que el re-tratamiento usando el mismo régimen a la misma dosis o una dosis superior sería exitoso como una monoterapia.

Ejemplo 3

Estudio de la Eficacia del Re-tratamiento con Rituximab en Pacientes con Artritis Reumatoide

Este ejemplo describe un estudio en centros múltiples controlado por placebo, doble ciego, distribuido aleatoriamente de fase III, del re-tratamiento con rituximab en sujetos con RA que reciben metotrexato de acompañamiento.

El objetivo primario de este estudio es evaluar la eficacia del re-tratamiento con rituximab en sujetos con RA activa que están recibiendo MTX y que han tenido una respuesta inadecuada a los inhibidores de TNF.

Los objetivos secundarios de este estudio son los siguientes:

- Evaluar la seguridad el re-tratamiento con rituximab en sujetos con RA activa que están recibiendo MTX y que han tenido una respuesta inadecuada a los inhibidores de TNF.

• Evaluar la seguridad del rituximab en sujetos con RA activa que están recibiendo MTX y que han tenido una respuesta inadecuada a los inhibidores de TNF.

Éste es un estudio en centros múltiples controlado por placebo, doble ciego, distribuido aleatoriamente, de Fase III que evalúa la eficacia del re-tratamiento con rituximab en sujetos con RA activa que están recibiendo MTX. El estudio consiste en cuatro partes: despistaje, período de tratamiento (rituximab con etiqueta abierta para el primer curso y, para los sujetos elegibles, re-tratamiento distribuido aleatoriamente, doble ciego), seguimiento de seguridad (SFU) y seguimiento de células B. Los sujetos deben haber tenido una respuesta inadecuada al tratamiento con uno o más inhibidores de TNF debido a toxicidad o eficacia inadecuada. Aproximadamente 555 sujetos entrarán al período de tratamiento en aproximadamente 150 sitios investigados en los Estados Unidos. Se inscribirán sujetos con RF positivo y RF negativo y serán asignados equitativamente entre ramales de tratamiento, la proporción total de sujetos con RF negativo estando limitada a 20% del tamaño total de la muestra.

Antes del Día 1, los sujetos serán descontinuados de todos los DMARD excepto por el MTX (para leflunomida, adalimumab e infliximab por $\geq$ 8 semanas y etanercept por $\geq$ 4 semanas). Todos los sujetos continuarán recibiendo MTX 10-25 mg/semana, a una dosis estable por la duración del estudio. La visita de despistaje ocurrirá hasta 56 días antes de recibir la primera dosis de tratamiento de estudio dependiendo de los requerimientos de suspensión.

Todos los sujetos que satisfacen los criterios de elegibilidad y están inscritos en el ensayo recibirán rituximab para el primer curso de tratamiento. Un curso de rituximab es definido como dos dosis intravenosas (i.v.) de 1000 mg administradas con 14 días de separación, con pre-medicación con metilprednisolona a 100 mg i.v. antes de cada dosis de rituximab. Todos los sujetos también recibirán una dosis estable de folato (≥ 5 mg/semana). Todos los sujetos deben continuar recibiendo cualquier corticosteroide de acompañamiento (≤ 10 mg/día de prednisona o equivalente) o medicamentos anti-inflamatorios no esteroides (NSAID) a una dosis estable.

La primera dosis de rituximab debe ser administrada dentro de las 24 horas siguientes a las evaluaciones de línea de base. Sin embargo, si es necesario, hasta 72 horas serán permitidas entre las evaluaciones de línea de base y la primera dosis del medicamento en estudio.

Durante las Semanas 24-40, los sujetos que tienen una enfermedad activa en base a una calificación de actividad de la enfermedad en 28 articulaciones (DAS 28-tasa de sedimentación de eritrocitos [ESR]) de $\geq 2,6$ serán considerados elegibles para el re-tratamiento y serán distribuidos aleatoriamente en una relación 2:1 para recibir re-tratamiento con un curso adicional de rituximab (Grupo A) o placebo (Grupo B). Los sujetos que no satisfacen los criterios para un segundo curso de rituximab durante las Semanas 24-40 continuarán en seguimiento por seguridad y eficacia. Los sujetos que satisfacen los criterios para el re-tratamiento durante las Semanas 24-40 y rechazan el tratamiento, por cualquier razón,

serán retirados del período de tratamiento y entrarán al período de SFU.

Se realizarán unas evaluaciones estándar de artritis y de seguridad. Las mediciones farmacodinámicas incluirán células B C19⁺, inmunoglobulinas y auto-anticuerpos. Las calificaciones DAS 28-ESR serán calculadas por el investigador en visitas programadas de manera regular (Prevoo y col., *Arthritis Rheum.* 38: 44-48 (1995); DAS.score.nl 2005 DAS-score.nl 2005: hogar de DAS. Departamento de Reumatología, Centro Médico Universitario Nijmegen, Países Bajos [citado el 1° de septiembre de 2005]. Disponible de: <http://www.das-score.nl/www.das-score.nl/index.html>).

El período de tratamiento es de 72 semanas (Día 1 a Semana 72). Todos los sujetos que se retiraron del período de tratamiento en cualquier momento o que recibieron tratamiento con rituximab/placebo entre las Semanas 24-40 y completaron el período de tratamiento deben retornar para evaluaciones de SFU en las Semanas 4, 12, 24, 36 y 48 de SFU después del retiro o la compleción. Todos los sujetos serán seguidos por al menos 48 semanas después de su última dosis de rituximab. Todos los sujetos que reciben solamente un curso de tratamiento con rituximab (es decir, aquéllos que no califican para re-tratamiento durante el estudio) y completan el período de tratamiento no regresarán para SFU.

Los sujetos cuyo conteo de células B periféricas no se han recuperado para el final del período de tratamiento o el período de SFU continuarán en seguimiento para evaluaciones de laboratorio y la ocurrencia de eventos adversos serios cada 12 semanas hasta la recuperación de las células B. La

recuperación de las células B es definida como conteos de células B periféricas que han retornado a los valores de línea de base o el límite inferior de lo normal (LLN), lo que sea menor.

En o luego de las 16 semanas después del re-tratamiento, los sujetos que no hayan logrado un 20% de mejoría en los conteos de articulaciones sensibles (TJC) y los conteos de articulaciones hinchadas (SJC) en comparación con la línea de base pueden iniciar un tratamiento de rescate con un DMARD no biológico, cuya elección está a la discreción de su médico tratante.

En un estudio de re-tratamiento de rituximab en RA, los sujetos lograron unas respuestas del Colegio Americano de Reumatología (ACR)20, 50 y 70 sostenidas (Pavelka y col., "Eficacia y seguridad después de unos cursos repetidos de rituximab en pacientes con artritis reumatoide activa." Resumen presentado en EULAR 2005). Sin embargo, debido a que este estudio es un estudio de etiqueta abierta, no hay datos controlados que evalúen la eficacia y la seguridad del re-tratamiento con rituximab en RA. El presente estudio es diseñado para evaluar la eficacia del re-tratamiento en un ensayo controlado por placebo con un solo curso adicional de rituximab en sujetos con RA activa. Los sujetos con enfermedad activa, según lo caracterizado por una DAS 28-ESR $\geq$ 2,6, serán tratados con un segundo curso de medicamento en estudio (rituximab o placebo) durante las Semanas 24-40.

El propósito del re-tratamiento con rituximab es prevenir los ataques, promover un control sostenido de la enfermedad e impedir potencialmente la progresión de la enfermedad. El

criterio de DAS 28-ESR $\geq 2,6$ para el re-tratamiento asegurará que los sujetos con actividad de enfermedad clínicamente significativa sean re-tratados. La DAS 28-ESR será calculada usando el número de articulaciones hinchadas y sensibles, la ESR y la Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad por el Paciente (en una escala analógica visual [VAS] de 100 mm).

El punto final primario de este estudio es la proporción de sujetos re-tratados con una ACR20 en la Semana 48 relativa a la línea de base (Día 1), no relativa al tiempo de tratamiento. La línea de base (Día 1), no el tiempo de tratamiento, fue escogida con el fin de evaluar el beneficio total del re-tratamiento con rituximab en sujetos con RA moderada a severa. Sin estar limitados por alguna teoría en particular, se tiene la hipótesis de que el re-tratamiento con RTX resulta en el mantenimiento del efecto hasta una ligera mejoría en la Semana 48 con relación a la Semana 24, en comparación con un deterioro en los sujetos tratados con placebo. Aunque puede haber un claro beneficio de tratamiento en los sujetos re-tratados, las respuestas de ACR20 en la Semana 48 con relación a una línea de base en la Semana 24 para ambos grupos pueden no ser significativas. Así, este estudio no es diseñado para evaluar la mejoría con relación al tiempo de re-tratamiento.

En base a los datos en la Semana 24 en el estudio de Fase III (REFLEX, WA17042/US2646s/IDEC102-20), aproximadamente 91% de los sujetos tratados con rituximab habrían satisfecho el criterio de re-tratamiento (DAS 28-ESR $\geq 2,6$) en la Semana 24 de este protocolo. El re-tratamiento obligatorio basado en DAS 28-ESR proporcionará una información de eficacia objetiva usando un paradigma de re-tratamiento basado en la actividad de

la enfermedad. El período mínimo de 24 semanas está basado en la farmacocinética y la farmacodinámica del rituximab. Esto está en paralelo con un aumento aparente en la actividad de la enfermedad después de este punto en el tiempo y, por lo tanto, representa un tiempo razonable para re-tratar.

La medición primaria de resultado es la proporción de sujetos re-tratados con una respuesta de ACR20 en la Semana 48 con relación a la línea de base (Día 1).

Las mediciones secundarias de resultados son las siguientes:

- Proporción de sujetos re-tratados con una respuesta de ACR50 y ACR70 en la Semana 48 con relación a la línea de base (Día 1).
- Cambio en DAS 28-ESR en la Semana 48 en comparación con la línea de base (Día 1) para los sujetos re-tratados.
- Proporción de sujetos re-tratados que lograron una respuesta de la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR) (buena o moderada) en la Semana 48 con relación a la línea de base (Día 1).
- Cambio en el conjunto esencial de ACR en la Semana 48 en comparación con la línea de base (Día 1) para sujetos re-tratados (SJC, TJC, Cuestionario de Evaluación de Salud [HAQ], evaluaciones globales por el paciente y el médico, evaluación de dolor del paciente, proteína C-reactiva [CRP] y ESR).
- ACR-N en la Semana 48 en sujetos re-tratados.
- Cambio en la subescala SF-36 y calificaciones de resumen desde la línea de base (Día 1) a la semana 48 en sujetos re-tratados.

- Cambio en la Evaluación Funcional de Terapia de Enfermedad Crónica-Fatiga (FACIT-F) desde la línea de base (Día 1) hasta la Semana 48 en sujetos re-tratados.
- Proporción de respuesta ACR20, ACR50 y ACR70 en la Semana 48 en todos los sujetos.

Las mediciones exploratorias de resultados son:

- Proporción de todos los sujetos que lograron una respuesta ACR20, ACR50 y ACR70 en la Semana 72 en comparación con la línea de base.
- Proporción de sujetos con remisión de DAS 28-ESR (DAS 28-ESR $< 2,6$) en la Semana 48.
- Proporción de sujetos con enfermedad de baja DAS 28-ESR (DAS 28-ESR $\leq 3,2$) en la Semana 48.
- Proporción de sujetos con remisión de DAS 28-ESR (DAS 28-ESR $< 2,6$) en la Semana 72.
- Proporción de sujetos con enfermedad de baja DAS 28-ESR (DAS 28-ESR $\leq 3,2$) en la Semana 72.

Los sujetos elegibles que tienen RA activa de RF positivo (≥ 20 IU/ml) o RF negativo, están recibiendo MTX y han tenido una respuesta inadecuada previa o actual a uno o más inhibidores de TNF serán sometidos a despistaje para su participación en el estudio. Los sujetos con RF negativo estarán limitados al 20% de la población inscrita total.

Los sujetos deben satisfacer los siguientes criterios para ser elegibles para su entrada al estudio:

- Forma de consentimiento informada firmada.
- Capacidad y disposición para cumplir con los requerimientos del protocolo de estudio.
- Edad de 18-80 años.

• Diagnóstico de RA por al menos 6 meses, de acuerdo con los criterios del ACR de 1987 revisados para la clasificación de RA (Hochberg y col., *Arthritis Rheum.* 35: 498-502 (1992)):

Clase I

Capacidad funcional completa con capacidad de llevar a cabo todas las tareas usuales sin impedimentos.

Clase II

Capacidad funcional adecuada para conducir actividades normales a pesar del impedimento de incomodidad o movilidad limitada de una o más articulaciones.

Clase III

Capacidad funcional adecuada para realizar solamente unas pocas o ninguna de las tareas de la ocupación usual o el cuidado de sí mismo.

Clase IV

Ampliamente o totalmente incapacitado, con el sujeto postrado en cama o confinado a una silla de ruedas, permitiendo poco o ningún cuidado de sí mismo.

• Recibiendo tratamiento para RA como paciente no hospitalizado.

• Actividad de RA activa moderada a severa documentada en el despistaje, como sigue:

TJC $\geq$ 8 (conteo de 68 articulaciones), y

SJC $\geq$ 8 (conteo de 66 articulaciones), y

CRP anormal $\geq$ 0,6 mg/dl, o ESR $\geq$ 28 mm/hora

Respuesta inadecuada documentada a un tratamiento previo o actual con uno o más de los siguientes: etanercept, infliximab y/o adalimumab debido a toxicidad o eficacia inadecuada

La eficacia inadecuada consiste en el tratamiento con etanercept por ≥ 3 meses a unas dosis de 25 mg dos veces por semana o 50 mg semanales, por lo menos cuatro infusiones de ≥ 3 mg/kg de infliximab, o 40 mg de adalimumab cada dos semanas por ≥ 3 meses

- Uso de MTX 10-25 mg/semana por ≥ 12 semanas antes del Día 1, a una dosis estable por ≥ 4 semanas
- Disposición para recibir ácido fólico oral.
- Si está tomando un corticosteroide de acompañamiento (≤ 10 mg/día de prednisona o equivalente), el uso del corticosteroide debe ser a una dosis estable durante las 4 semanas antes del Día 1.
- El uso de un NSAID es permitido si la dosis es estable por ≥ 2 semanas antes del Día 1.
- Para hombres y mujeres de potencial reproductivo, disposición de usar un medio confiable de contracepción (por ejemplo, anticonceptivo hormonal, dispositivo intrauterino, barrera física) por ≥ 30 días antes del Día 1 y por la duración del estudio y la duración en que las células B CD19+ del sujeto estén reducidas, lo que sea más largo.

Los sujetos que satisfacen cualquiera de los siguientes criterios serán excluidos de la entrada al estudio:

a. Generales

- Enfermedad autoinmune reumática diferente a RA o complicación sistémica significativa secundaria a RA (por ejemplo vasculitis, fibrosis pulmonar o síndrome de Felty).

Se permite el síndrome de Sjögren secundario con RA.

- Historia, o condición actual, de enfermedad inflamatoria de la articulación diferente a RA (por ejemplo gota, artritis

reactiva, artritis por soriasis, espondiloartropatía seronegativa, enfermedad de Lyme), u otro trastorno autoinmune sistémico (por ejemplo lupus sistémico eritematoso, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerodermia, miopatía inflamatoria, o síndrome de superposición).

· Clase IV funcional, según lo definido por la Clasificación del ACR de la Condición Funcional en Artritis Reumatoide.

· Cualquier procedimiento quirúrgico, incluyendo cirugía/sinovectomía de hueso/articulación (incluyendo fusión o reemplazo de articulación), dentro de las 12 semanas previas al Día 1 o planificadas dentro de las 48 semanas posteriores al Día 1.

· Hipersensibilidad conocida a cualquier componente de un anticuerpo monoclonal humanizado o murino.

· Recepción de una vacunación viva dentro de las 4 semanas previas al Día 1.

· Enfermedad cardíaca o pulmonar significativa, incluyendo enfermedad pulmonar obstructiva.

· Evidencia de enfermedad concomitante no controlada significativa, tal como, pero no limitada a, trastornos del sistema nervioso, renales, hepáticos, endocrinos o gastrointestinales.

· Infección bacteriana, viral, fúngica, micobacteriana activa conocida u otra infección (incluyendo tuberculosis o enfermedad micobacteriana atípica pero excluyendo las infecciones por hongos de las matrices de las uñas) o cualquier episodio mayor de infección que requirió hospitalización o tratamiento con antibióticos i.v dentro de las 4 semanas del Día 1 o antibióticos orales dentro de las 2 semanas del Día 1.

- Historia de infección recurrente o crónica seria (para el despistaje de una infección de tórax, una radiografía de tórax será realizada en el despistaje si no ha sido realizada 12 semanas antes del despistaje).
- Historia de inmunodeficiencia primaria o secundaria, o actualmente activa, incluyendo infección por VIH.
- Historia de cáncer, incluyendo tumores sólidos y malignidades hematológicas (excepto carcinoma de células basales o células escamosas de la piel que ha sido extirpado y curado).
- Historia de citopenias significativas u otros trastornos de la médula ósea.
- Historia de abuso de alcohol, drogas o químicos dentro de las 24 semanas previas al Día 1.
- Embarazo o lactancia.
- Neuropatías y neurovasculopatías que pudieran interferir con la evaluación del dolor.
- Acceso venoso periférico pobre.
- Intolerancia o contraindicaciones a los corticosteroides orales o i.v.

b. Criterios de exclusión de laboratorio

- Hemoglobina < 8,0 g/dl
- Conteo absoluto de neutrófilos < $1,5 \times 10^3/\mu\text{l}$
- IgM < 0,40 mg/ml
- IgG < 5,0 mg/ml
- Aspartato aminotransferasa (AST) o alanina aminotransferasa (ALT) > 2,5 x el límite superior de lo normal
- Antígeno de superficie de hepatitis B positivo o serología de anticuerpo de hepatitis C

- Para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido una ligadura de trompas), una prueba de embarazo en suero positiva en el despistaje
- Medicaciones previas o concomitantes excluidas
- Uso actual de cualquier DMARD diferente a MTX
- Tratamiento concurrente con cualquier agente biológico

El tratamiento debe ser descontinuado por lo menos 4 semanas antes del Día 1, excepto por los siguientes: leflunomida por ≥ 8 semanas (o ≥ 14 semanas después de 11 días del lavado estándar con colestiramina), infliximab ≥ 8 semanas y adalimumab ≥ 8 semanas.

- Tratamiento con cualquier agente de investigación dentro de las 4 semanas antes del Día 1 o cinco vidas medias del medicamento de investigación (lo que sea más largo)
- Cualquier tratamiento previo con rituximab u otras terapias de depleción celular, incluyendo CAMPATH, anti-CD4, anti-CD5, anti-CD3, anti-CD19, anti-CD11a, anti-CD22, BLys/BAFF y otros agentes anti-CD20
- Tratamiento previo con un agente anti-integrina alfa 4, incluyendo natalizumab
- Tratamiento previo dentro de los 6 meses del despistaje con gammaglobulina i.v. o la Columna Prosorba®

Al completar todas las evaluaciones de despistaje y la verificación de que el sujeto ha satisfecho todos los criterios de inclusión y exclusión, el personal en el sitio se pondrá en contacto el sistema interactivo de respuesta de voz (IVRS por sus siglas en inglés) para obtener el número del sujeto y confirmar la inscripción del sujeto para el manejo del inventario de medicamento del estudio. Todos los sujetos

inscritos recibirán rituximab como su curso de tratamiento inicial.

Durante las Semanas 24-40, los sujetos que son elegibles para el re-tratamiento serán distribuidos aleatoriamente en una relación 2:1 al Grupo A (re-tratamiento con rituximab) o Grupo B (placebo; véase la Tabla 1). Si un sujeto satisface los criterios de elegibilidad para el re-tratamiento durante las Semanas 24-40, el personal del sitio contactará el IVRS para iniciar la distribución aleatoria del sujeto y obtener el número de kit de medicamento en estudio.

Un proveedor de IVRS independiente conducirá la distribución aleatoria y retendrá los códigos de asignación al tratamiento. La distribución aleatoria será estratificada por centro de estudio, condición de RF en la línea de base (RF positivo, RF negativo) y las mejorías en la Semana 24 en los conteos de articulaciones sensibles e hinchadas ($\geq 20\%$ de mejoría o $< 20\%$ de mejoría). En el momento del descegado, los códigos de asignación de tratamiento y los códigos de tratamiento de kit serán solicitados al proveedor de IVRS. La documentación de la transferencia y los datos incluidos en la transferencia serán mantenidos en archivo.

Tabla 1

Grupos de Tratamiento en el Estudio

Grupo A	Rituximab:	1000 mg i.v. en los Días 1 y 15 para el primer curso
		1000 mg i.v. en los Días 1 y 15 para el curso de re-tratamiento para sujetos elegibles (DAS 28-ESR $\geq$ 2,6 y satisfacen los criterios de re-tratamiento en la presente) durante las semanas 24-40
	Corticosteroide:	100 mg i.v. de metilprednisolona antes de cada infusión
	MTX:	10-25 mg/semana
	Folato:	$\geq$ 5 mg/semana
Grupo B	Rituximab:	1000 mg i.v. en los Días 1 y 15 para el primer curso
		placebo i.v. en los Días 1 y 15 para el curso de re-tratamiento para sujetos elegibles (DAS 28-ESR $\geq$ 2,6 y satisfacen los criterios de re-tratamiento en la presente) durante las semanas 24-40
	Corticosteroide:	100 mg i.v. de metilprednisolona antes de cada infusión
	MTX:	10-25 mg/semana
	Folato:	$\geq$ 5 mg/semana

Durante el re-tratamiento, la asignación de grupos de tratamiento será ocultada al personal en el sitio y Genentech. Para impedir un descubrimiento potencial debido a eficacia observada o cambios de laboratorio durante el re-tratamiento, se usará un enfoque de asesores dobles para evaluar la eficacia y la seguridad.

Los conteos de células B CD19 periféricas serán ocultados al personal en el sitio y Genentech hasta el momento del cierre de la base de datos para el punto final primario en la Semana

48 para todos los sujetos inscritos en el ensayo. Por lo tanto, se asumirá que todos los sujetos que han completado el período de tratamiento y el SFU antes del cierre de la base de datos estarán periféricamente reducidos y permanecerán en seguimiento de células B.

El Asesor de Eficacia (o persona designada) debe ser un reumatólogo o asesor de artritis experimentado. El Asesor de Eficacia no debe ser el Investigador Principal. El Asesor de Eficacia solamente tendrá acceso a los datos de eficacia y será responsable de completar los conteos de articulaciones y la Evaluación Global por el Médico de la actividad de la enfermedad (VAS) solamente. Para asegurar una evaluación consistente de las articulaciones durante todo el ensayo, los sujetos individuales deben ser evaluados por el mismo asesor de las articulaciones para todas las visitas del estudio. Durante una visita del estudio, todos los resultados reportados del sujeto deben ser completados antes de todas las otras evaluaciones.

El Asesor de Seguridad (o persona designada) debe ser un reumatólogo y tendrá acceso a los datos de seguridad y eficacia. El Asesor de Seguridad puede ser el Investigador Principal. El Asesor de Seguridad tendrá acceso a documentos de origen, resultados de laboratorio y Formas de Informe de Casos (CRF por sus siglas en inglés) y será responsable del cálculo de DAS 28-ESR y de tomar decisiones de tratamiento en base a la respuesta clínica y los parámetros de laboratorio de un sujeto. El Asesor de Seguridad no completará evaluaciones de eficacia o registrará los resultados de evaluaciones de eficacia en nombre del Asesor de Eficacia.

El rituximab a ser usado en este estudio es un concentrado líquido estéril, claro, incoloro, libre de preservativos, para administración i.v. El rituximab es suministrado a una concentración de 10 mg/ml en frascos de un solo uso de 500 mg (50 ml). El producto es formulado para administración i.v. en 9,0 mg/ml de cloruro de sodio, 7,35 mg/ml de dihidrato de citrato de sodio, 0,7 mg/ml de polisorbato 80 y agua estéril para inyección. El pH es ajustado a 6,5.

Todos los sujetos inscritos recibirán un curso de rituximab (1000 mg de rituximab por infusión i.v. en los Días 1 y 15) como su tratamiento inicial. Durante las Semanas 24-40, los sujetos elegibles para re-tratamiento serán distribuidos aleatoriamente al Grupo A para recibir un curso adicional (dos dosis) de rituximab 1000 mg i.v. separadas 14 días o al Grupo B para recibir un curso (dos dosis) de placebo 1000 mg i.v. separadas 14 días.

Una pre-medicación con 1000 mg de acetaminofén oral y 50 mg de difenhidramina oral es recomendada para todos los sujetos, y se requieren 100 mg i.v. de metilprednisolona a ser completados dentro de los 30-60 minutos antes de cada infusión de rituximab/placebo.

Todos los sujetos continuarán recibiendo MTX a una dosis estable de 10-25 mg/semana y recibirán una dosis estable de folato ($\geq$ 5 mg/semana) proporcionada como una dosis única o como una dosis semanal dividida.

Las infusiones de rituximab/placebo deben ser administradas a los sujetos bajo la estrecha supervisión del investigador o persona designada en un hospital o clínica en donde unas instalaciones de resucitación completas están inmediatamente a

la disposición. Aunque el rituximab puede ser administrado en base a pacientes no hospitalizados, los sujetos pueden ser hospitalizados para su observación a discreción del investigador. El rituximab/placebo debe ser administrado como una infusión i.v. lenta. No se administra como un pulso o bolo i.v. Al final de cada infusión, la línea i.v. debe permanecer en su lugar por lo menos por 1 hora para permitir la administración de medicamentos i.v. si es necesario. Si no ocurre un evento adverso durante este tiempo, la línea i.v. puede ser sacada.

Usando una técnica aséptica apropiada, se retira la cantidad necesaria de rituximab/placebo y se diluye hasta una concentración final de 4 mg/ml en una bolsa de infusión que contiene cloruro de sodio al 0,9%, USP o Dextrosa al 5% en agua, USP. Se invierte suavemente la bolsa para mezclar la solución. Los frascos de rituximab son biológica y químicamente estables a 2°C-8°C (36°F-46°F). Los frascos no deben ser usados después de la fecha de expiración. El rituximab debe ser protegido de la exposición a la luz de sol directa.

Una vez reconstituidas en bolsas i.v., las soluciones de rituximab pueden ser almacenadas a 2°C-8°C (36°F-46°F) por 24 horas. Se ha mostrado que las soluciones de rituximab para infusión son estables por 24 horas adicionales a temperatura ambiente (23°C o 73°F). Sin embargo, ya que las soluciones de rituximab no contienen un preservativo, las soluciones diluidas deben ser refrigeradas (2°C-8°C). No se han observado incompatibilidades entre el rituximab y las bolsas de cloruro de polivinilo o polietileno.

En cuanto al re-tratamiento, se calculará DAS 28-ESR usando el conteo de articulaciones y la Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el Paciente de la visita actual y la ESR de la visita actual o la previa solamente si la ESR de la visita actual no está disponible. Los sujetos que satisfacen los siguientes criterios en cualquier visita durante las Semanas 24-40 son elegibles para recibir re-tratamiento con medicamento en estudio (rituximab o placebo):

- DAS 28-ESR $\geq 2,6$
- Prueba de embarazo en orina negativa para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido ligadura de trompas).

Además, los sujetos que califican para el re-tratamiento por DAS 28-ESR $\geq 2,6$ durante las Semanas 24-40 también deben satisfacer los siguientes criterios con el fin de ser re-tratados en base a los resultados de la visita previa si los resultados actuales no están disponibles:

- Hemoglobina $\geq 8,0$ g/dl
- Conteo absoluto de neutrófilos $\geq 1,5 \times 10^3/\mu\text{l}$
- IgM $\geq 0,40$ mg/ml
- IgG $\geq 5,0$ mg/ml
- Ausencia de enfermedad cardíaca o pulmonar significativa (incluyendo enfermedad pulmonar obstructiva)
- Ausencia de inmunodeficiencia primaria o secundaria, incluyendo historia conocida de infección por VIH.
- Ausencia de evidencia de enfermedad concomitante no controlada significativa, tal como, pero no limitada a, trastornos del sistema nervioso, renales, hepáticos, endocrinos o gastrointestinales.

Ausencia de infección activa conocida de cualquier tipo (excluyendo las infecciones por hongos de las matrices de las uñas) o cualquier episodio mayor de infección que requirió hospitalización o tratamiento con antibióticos i.v dentro de las 4 semanas de la infusión o antibióticos orales dentro de las 2 semanas anteriores a la infusión.

La modificación de la dosis de rituximab no es permitida durante este estudio. En caso de una reacción relacionada con la infusión, la tasa de infusión puede ser ajustada. Si un sujeto experimenta una reacción relacionada con la infusión que requiere una interrupción de la infusión y el investigador determina que la infusión no debe ser reanudada, el sujeto debe ser retirado del período de tratamiento del estudio e inscrito en el SFU.

Todos los sujetos recibirán 10-25 mg/semana de MTX concomitante, según lo prescrito por su médico tratante. Los sujetos deben haber sido tratados con MTX durante ≥ 12 semanas antes de entrar al estudio y deben permanecer bajo una dosis estable de MTX por ≥ 4 semanas antes del Día 1 y durante el estudio, a menos que una modificación sea necesaria por la toxicidad.

Ciertos eventos adversos que son comúnmente asociados con el tratamiento con MTX pueden ocurrir. Con el fin de minimizar la toxicidad del MTX, todos los sujetos tratados con MTX también recibirán una dosis estable de ácido fólico (≥ 5 mg/semana) proporcionada como una sola dosis semanal o como dosis diarias divididas. El régimen de dosificación está a la discreción del investigador.

El tratamiento diario con ≤ 10 mg de prednisona o equivalente es permitido si la dosis es estable por ≥ 4 semanas antes del Día 1. La dosis debe permanecer estable durante todo el estudio, a menos que una modificación sea requerida por toxicidad.

El uso de un NSAID es permitido si la dosis es estable por ≥ 2 semanas antes del Día 1. La dosis debe permanecer estable durante todo el estudio, a menos que una modificación sea requerida por toxicidad.

Además, un tratamiento diario con ≤ 325 mg de ácido acetilsalicílico es permitido para profilaxis cardiovascular.

Unos analgésicos adicionales pueden ser usados para el dolor si se requiere. Sin embargo, los sujetos no deben tomar analgésicos dentro de las 12 horas previas a una visita en la cual unas evaluaciones de eficacia serán realizadas. Unos ajustes al régimen de analgésicos pueden ser efectuados, pero el cambio debe ser documentado en las CRF apropiadas.

Las inyecciones intra-articulares de corticosteroide no son aprobadas, particularmente durante las primeras 48 semanas; sin embargo, pueden ser usadas de manera limitada para manejar la actividad de RA de un sujeto durante el estudio. No más de una articulación por período de 24 semanas debe ser inyectada, y la misma articulación no debe ser inyectada más de una vez en cualquier período de 48 semanas. Ninguna inyección única debe exceder 40 mg de triamcinolona (o equivalente), y la dosis total de corticosteroide no debe exceder 80 mg de triamcinolona (o equivalente) durante cualquier período de 48 semanas.

Durante el estudio, los sujetos pueden continuar recibiendo un corticosteroide de acompañamiento con una dosis de ≤ 10

mg/día de prednisona (o equivalente). En el caso de un ataque de enfermedad o condición diferente de RA, tal como asma, que requiere tratamiento con corticosteroides orales, una dosis apropiada debe ser administrada por un máximo de 2 semanas y debe ser disminuida gradualmente hasta el nivel previo lo más rápidamente que sea médicamente posible.

El aumento de la dosis de corticosteroides será considerado como un empeoramiento de la condición de un sujeto con respecto a la línea de base y debe ser registrado como un evento adverso en la CRF.

Los corticosteroides i.v. o intramusculares no son permitidos en el estudio, aparte de aquéllos especificados en los tratamiento protocolares.

Los sujetos deben permanecer bajo una dosis estable de MTX por ≥ 4 semanas antes del Día 1 y durante el estudio, a menos que una modificación sea necesaria por toxicidad.

En o después de las 16 semanas después del re-tratamiento, los sujetos que no han logrado una mejoría del 20% en los TJC y SJC en comparación con la línea de base pueden iniciar un tratamiento de rescate con un DMARD no biológico, cuya elección está a la discreción de su médico tratante. Los sujetos que reciben rescate no serán retirados del estudio.

Unas muestras de laboratorio deben ser tomadas antes de las infusiones de metilprednisolona i.v. y rituximab/placebo.

Los datos reportados por el sujeto (es decir, Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad por el Paciente, Evaluación del Dolor por el Paciente) sólo pueden ser registrados por la enfermera/el investigador del estudio a nombre del sujeto si el sujeto tiene dificultad para escribir

durante la visita o es incapaz de leer. Esto debe ser documentado claramente en las notas del sujeto.

Para impedir un descubrimiento potencial, un enfoque de dos asesores (Asesor de Eficacia y Asesor de Seguridad) será usado para evaluar la eficacia y la seguridad. Es esencial que las evaluaciones completadas por el sujeto y el Asesor de Eficacia sean efectuadas antes de aquéllas por el Asesor de Seguridad.

La evaluación total por el sujeto de la actividad de su enfermedad durante las últimas 24 horas debe ser descrita usando la VAS horizontal de 100 mm, en donde el extremo a mano izquierda de la línea representa ausencia de actividad de la enfermedad (libre de síntomas y sin síntomas de artritis) y el extremo a mano derecha representa máxima actividad de la enfermedad (máxima actividad de la enfermedad de artritis).

La evaluación por el sujeto de su nivel de dolor durante las últimas 24 horas debe ser descrita usando la VAS horizontal de 100 mm en donde el extremo a mano izquierda de la línea representa ausencia de dolor y el extremo a mano derecha representa dolor intolerable.

El índice de incapacidad HAQ de Stanford es un cuestionario reportado por el sujeto, específico para RA. Consiste en 20 preguntas que se refieren a ocho conjuntos de componentes: vestirse/arreglarse, levantarse, comer, caminar, higiene, alcance; agarre y actividades. El cuestionario será calificado en base a instrucciones del Centro Médico de la Universidad de Stanford (Fries y col., *Arthritis Rheum.* 23: 137-145 (1980)).

La evaluación FACIT-F será usada para evaluar la fatiga. Es un cuestionario de 13 puntos en el cual se pide a los sujetos que califiquen cada pregunta en una escala de 0 a 4.

La evaluación fue desarrollada originalmente para enfermedades crónicas y está actualmente validada para sujetos con RA (Cella y col., *J. Rheumatology* 32(5): 811-819 (2205)).

SF-36 es un instrumento de calidad de vida relacionada con la salud genérica que ha sido ampliamente probado por sus propiedades psicosométricas y es ampliamente usado en estudios clínicos y epidemiológicos (Ware y col., "Cómo calificar la versión dos de la encuesta de salud SF-36". Lincoln, RI: Qualitymetric Incorporated, 2000). SF-36 (Versión 2) es proporcionado por Medical Outcomes Trust (Boston, MA, EE.UU.).

Una evaluación de 66 articulaciones para determinar hinchazón y 68 articulaciones para determinar sensibilidad debe ser realizada por un reumatólogo o asesor de articulaciones experimentado. Las articulaciones serán evaluadas y clasificadas como hinchadas o no hinchadas y sensibles o no sensibles en base a la presión y la manipulación de la articulación en el examen físico. Las articulaciones con artrodesis o prótesis de articulación total no deben ser evaluadas; sin embargo, todas las otras articulaciones deben ser evaluadas. Las articulaciones a ser evaluadas para determinar hinchazón y sensibilidad son proporcionadas a continuación:

Articulación temporomandibular

Articulación esternoclavicular

Articulación acromioclavicular

Hombros ^a

Codos*

Muñecas*

Interfalangiana en el dígito 1 ^a

Articulaciones interfalangianas distales en los dígitos 2-5

Articulaciones interfalangianas próximas en los dígitos 2-5 ^a

Articulaciones metacarpofalangianas en los dígitos 1-5 ^a

Caderas (sensibilidad solamente)

Rodillas ^a

Tobillos

Metatarsos

Articulaciones interfalangianas en los dedos 1-5 del pie

Articulaciones metatarsofalangianas en los dedos 1-5 del pie

^a Incluye las 28 articulaciones usadas para calcular la Calificación de Actividad de la Enfermedad (DAS)28.

Las articulaciones que han experimentado un procedimiento deben ser evaluadas como sigue:

• Cirugía: Cualquier articulación que ha sido reemplazada o fusionada en cualquier momento antes del estudio o durante el mismo debe ser documentada como no evaluable (NE) por la duración del estudio.

Cualquier articulación que ha experimentado sinovectomía (incluyendo sinovectomía química y radiológica) debe ser documentada como no efectuada (ND) por 24 semanas después de la sinovectomía. Después de ese tiempo la articulación puede ser evaluada nuevamente.

• Inyección intra-articular: Cualquier articulación que ha recibido una inyección intra-articular de un corticosteroide debe ser documentada como ND por las siguientes 12 semanas. Después de este tiempo, la articulación puede ser evaluada nuevamente.

• Artrocentesis: Cualquier articulación que experimenta aspiración del fluido sinovial no será evaluada en la siguiente

visita programada y será clasificada como ND. Después de este tiempo, la articulación puede ser evaluada nuevamente.

La evaluación por el médico de la actividad de la enfermedad de un sujeto durante las últimas 24 horas debe ser descrita usando la VAS horizontal de 100 mm en la cual el extremo a mano izquierda de la línea representa ausencia de actividad de la enfermedad (libre de síntomas y sin síntomas de artritis) y el extremo a mano derecha representa máxima actividad de la enfermedad. Esto debe ser completado por el Asesor de Eficacia quien puede ser o no ser un médico.

La CRP será analizada en un laboratorio central. La ESR será determinada usando el método Westergren en el laboratorio local.

Una DAS 28-ESR $\geq 2,6$ ha sido seleccionada como un umbral para el re-tratamiento en este ensayo. Los sujetos con una DAS 28-ESR $\geq 2,6$ durante las Semanas 24-40 pueden ser elegibles para recibir un segundo curso de medicamento en estudio (rituximab o placebo).

Un examen físico general (incluyendo los sistemas cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal y neurológico) debe ser realizado en los momentos indicados en el Programa de Evaluaciones. Cualquier anomalía persistente debe ser indicada cada vez que el examen sea realizado. El diagnóstico de nuevas anomalías debe ser registrado como un evento adverso si es apropiado.

Los signos vitales (tasa cardiaca, presión sanguínea sistólica y diastólica, y temperatura) serán tomados en los momentos indicados en el Programa de Evaluaciones. Las

evaluaciones deben ser efectuadas después de que el sujeto ha estado en una posición semi-supina por lo menos por 5 minutos.

Doce electrocardiogramas de derivación (ECG) deben ser realizados en los momentos indicados en el Programa de Evaluaciones.

Unas radiografías de tórax posterior-anterior y lateral deben ser obtenidas en el despistaje y revisadas por el investigador o persona designada. En el despistaje, si unas radiografías de tórax han sido efectuadas dentro de las últimas 12 semanas que no muestran anomalías clínicamente significativas y no hay signos o síntomas que sugieren enfermedad pulmonar que excluiría al sujeto del ensayo, entonces la radiografía de tórax no necesita ser repetida.

Unos análisis de hematología, serología, química, orina, prueba de embarazo en suero, citometría de flujo, inmunología y CRP serán realizados por un laboratorio central; los análisis farmacocinético y de HACA serán realizados por Genentech; y la prueba de embarazo en orina y las evaluaciones de ESR serán realizadas localmente en los sitios de estudio. Unos manuales de instrucciones y kits de suministro, incluyendo suministros de farmacocinética y HACA, serán proporcionados para todas las evaluaciones de laboratorio. Las evaluaciones de laboratorio incluirán las siguientes:

- Hematología/CBC: Hemoglobina, hematocritos, glóbulos rojos (RBC por sus siglas en inglés), glóbulos blancos (WBC por sus siglas en inglés) con diferencial, y conteos de plaquetas.
- Serología: Antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) y anticuerpo del virus de hepatitis C (HCV).

- Químicas de suero: AST/SGOT, ALT/SGPT, fosfatasa alcalina, proteína total, albúmina, bilirrubina total, nitrógeno úrico en sangre (BUN por sus siglas en inglés), ácido úrico, creatinina, glucosa aleatoria, potasio, sodio, cloruro, calcio y fósforo.
- Análisis de orina: Sangre, proteína y glucosa (examen microscópico, si es anormal y aplicable).
- Prueba de embarazo: Todas las mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido ligadura de trompas) serán sometidas a una prueba de embarazo en suero en el despistaje. Además, unas pruebas regulares de embarazo en orina serán administradas en todas las otras visitas. Si una prueba de embarazo en orina es positiva, debe ser confirmada por una prueba de embarazo en suero.
- Niveles de complemento C3 y C4 en suero.
- Evaluaciones inmunológicas: Inmunoglobulinas cuantitativas (Ig total, IgG, IgA e IgM), RF (total y concentraciones de isotipos), y anticuerpo anti-péptido citrulinado cíclico (CCP) (IgG).
- Análisis de clasificadores celulares activados fluorescentes (FACS por sus siglas en inglés) expandidos: Las poblaciones celulares evaluadas incluirán monocitos (CD14 y CD16); células NK (CD56); subconjuntos de células T (CD3, CD4, CD8, CD45RO Y CD45RA); y subconjuntos de células B (CD19, CD27, CD38 e IgD). Los marcadores de activación también pueden ser evaluados (CD25, CD69, CD40L y CD80).
- Análisis de FACS e células B: células B absolutas (CD19) solamente.
- El análisis para respuesta HACA será realizado usando un ELISA para todos los sujetos inscritos.

• Ensayos farmacocinéticos: Unas muestras de suero serán obtenidas para el ensayo farmacocinético en las visitas indicadas en el Programa de Evaluaciones (SOA por sus siglas en inglés) y también en los mismos puntos en el tiempo que HACA. Las concentraciones de rituximab en suero son requeridas para interpretar de manera precisa los resultados de HACA.

• Muestras de biomarcadores opcionales:

Para sujetos que lo consienten por separado, unas muestras de investigación opcionales (sangre completa, suero) serán recogidas durante el curso del estudio para evaluaciones exploratorias de biomarcadores. Las muestras de sangre completa, recogidas usando tubos de ARN PAXgene™, serán usadas para perfilado de expresión genética. Las evaluaciones de muestras de suero de marcadores relacionados con RA o rituximab pueden incluir, pero no están limitadas a, mediciones de citocina/quimiocina y cuantificación de marcadores de cambio de hueso y cartílago. Todas las muestras serán recogidas en los mismos puntos en el tiempo para una comparabilidad óptima de los datos.

Se anticipa que la información de este análisis promoverá y facilitará el cuidado individualizado de la salud por medio de un mejor entendimiento del modo de acción, la eficacia relacionada y la seguridad del rituximab, mecanismos de predicción para una buena respuesta, y posiblemente determinantes de la progresión de la enfermedad de RA (y otras enfermedades autoinmunes). Estas muestras serán almacenadas por hasta 15 años después del cierre de la base de datos.

Todos los sujetos deben proporcionar un consentimiento informado por escrito antes de que cualquier procedimiento o evaluación específico del estudio sea realizado, incluyendo cambios en el régimen de tratamiento actual de un sujeto. Las evaluaciones de despistaje pueden ser realizadas durante un período de 56 días previo a la primera infusión de rituximab en el Día 1. Las evaluaciones reportadas por el sujeto deben ser realizadas antes de las otras evaluaciones clínicas.

Si un sujeto falla un criterio de exclusión de laboratorio en el despistaje, el investigador puede repetir la prueba hasta dos veces dentro del período de despistaje. Si el sujeto falla el criterio de laboratorio una tercera vez, será considerada como una falla de selección. Una muestra de sangre o prueba de laboratorio no será considerada como probada nuevamente si la muestra fue tomada nuevamente debido a problemas de manejo de la muestra, rotura o integridad de la muestra. Un sujeto que falla el despistaje puede ser sometido nuevamente a despistaje.

Un sujeto puede ser sometido nuevamente a despistaje si no satisfizo todos los criterios de elegibilidad dentro de los 56 días desde la visita de despistaje original. Un sujeto que experimenta despistaje nuevamente debe repetir el proceso de despistaje entero y ser consentir nuevamente a cualquier procedimiento específico del estudio. Los sujetos pueden ser sometidos nuevamente a despistaje sólo una vez.

0. Visita de Despistaje (Día - 56)

- Consentimiento informado por escrito
- Revisión de criterios de inclusión y exclusión
- Contactar la IVRS para obtener la asignación de número de despistaje del sujeto

- Datos demográficos (por ejemplo sexo, edad, raza/grupo étnico)
- Historia médica completa (incluyendo historia de vacunaciones)
- Medicaciones concomitantes tomadas dentro de las 12 semanas antes del despistaje, incluyendo vacunas, todos los DMARD previos, y agentes biológicos
- Signos vitales (tasa cardiaca, presión sanguínea y temperatura)
- Examen físico completo, incluyendo mediciones de altura y peso
- Evaluación de articulaciones
- ECG de 12 derivaciones
- Rayos X de tórax

Si unos rayos X de tórax fueron realizados dentro de las 12 semanas antes del despistaje y no mostraron anomalía clínica significativa, unos rayos X de tórax no son requeridos en el despistaje.

- Evaluaciones del laboratorio central

Hematología/CBC

Antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpo de hepatitis C

Prueba de embarazo en suero para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido ligadura de trompas)

Químicas de suero

Análisis de orina

CRP

IgG e IgM

RF total

- ESR (laboratorio local; método Westergren)

Todas las evaluaciones durante el período de tratamiento deben ser realizadas dentro de la ventana de tiempo especificada para cada visita. Las evaluaciones y los procedimientos programados en los días en los cuales se administra rituximab deben ser realizados antes de la infusión de rituximab, a menos que se indique lo contrario. Para este estudio, el Día 1 es el día de la infusión inicial de rituximab. La visita del Día 1 debe ser realizada en un día que permita que las visitas subsiguientes (por ejemplo la visita del Día 15) ocurran sin demora. Las evaluaciones reportadas por el sujeto deben ser realizadas antes de las otras evaluaciones clínicas. Para sujetos elegibles para re-tratamiento, la visita en la cual el sujeto satisface los criterios de elegibilidad para el re-tratamiento es considerada como la visita de calificación.

a. Día 1

Todas las evaluaciones serán realizadas 30 minutos antes de la infusión a menos que se especifique lo contrario.

- Revisión de criterios de inclusión y exclusión
- Contactar al IVRS para el número de inscripción del sujeto y el inventario de medicamento en estudio
- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el paciente
- Evaluación del Dolor (VAS) por el paciente
- HAQ
- FACIT-F
- SF-36

- Signos vitales (tasa cardiaca, presión sanguínea y temperatura): pre-infusión, durante la infusión (cada 15 minutos por 1 hora, y entonces cada 30 minutos hasta el final de la infusión) y post-infusión (cada 30 minutos por 1 hora post-infusión)
- Examen físico, incluyendo medición del peso corporal
- Evaluación de articulaciones
- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el médico
- Prueba de embarazo en orina para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido una ligadura de trompas)
- Evaluaciones del laboratorio central
 - Hematología/CBC (dentro de los 30 minutos pre- y post-infusión)
 - Químicas de suero
 - Análisis de orina
 - FACS expandidos (dentro de los 30 minutos pre- y post-infusión)
 - Células B CD19 (dentro de los 30 minutos pre- y post-infusión)
 - CRP
 - Inmunoglobulinas
 - RF
 - Anticuerpo anti-CCP
 - C3, C4
 - Muestra farmacocinética (dentro de los 30 minutos pre- y post-infusión)
 - Muestra de HACA

- ESR (laboratorio local; método Westergren)
- Muestras de biomarcadores de investigación opcionales (muestras de sangre completa y suero)
- Administración de metilprednisolona
- Administración de rituximab
- Eventos adversos
- Medicaciones concomitantes

b. Día 15 (+ 1 día)

Todas las evaluaciones serán realizadas 30 minutos antes de la infusión a menos que se especifique lo contrario.

- Prueba de embarazo en orina para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido una ligadura de trompas)
- Signos vitales (tasa cardíaca, presión sanguínea y temperatura): pre-infusión, durante la infusión (cada 15 minutos por 1 hora, y entonces cada 30 minutos hasta el final de la infusión) y post-infusión (cada 30 minutos por 1 hora post-infusión)
- Evaluaciones del laboratorio central
 - Hematología/CBC (dentro de los 30 minutos pre- y post-infusión de rituximab)
 - Químicas de suero
 - Análisis de orina
 - C3, C4
 - Muestra farmacocinética (30 minutos pre- y post-infusión)
- Administración de metilprednisolona
- Administración de rituximab
- Eventos adversos
- Medicaciones concomitantes

c. *Semanas 4, 12 y 20 (Días 28, 84 y 140, respectivamente; $\pm$ 3 días)*

- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el paciente
- Evaluación del Dolor (VAS) por el paciente
- HAQ
- FACIT-F (Semana 12 solamente)
- Evaluación de articulaciones
- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el médico
- Prueba de embarazo en orina para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido una ligadura de trompas)
- Evaluaciones del laboratorio central
 - Hematología/CBC
 - Químicas de suero
 - Análisis de orina
 - FACS expandidos (Semana 12 solamente)
 - Células B CD19 (Semanas 4 y 20 solamente)
 - CRP
 - C3, C4 (Semana 4 solamente)
 - Muestra farmacocinética
 - Inmunoglobulinas
- ESR (laboratorio local; método Westergren)
- Muestras de biomarcadores de investigación opcionales (muestras de sangre completa y suero) (Semana 12 solamente)
- Eventos adversos
- Medicaciones concomitantes

d. Semana 24 (Día 168 $\pm$ 3 días)

- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el paciente

- Evaluación del Dolor (VAS) por el paciente

- HAQ

- FACIT-F

- SF-36

- Evaluación de articulaciones

- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el médico

- Calcular DAS 28-ESR usando el conteo de articulaciones y la Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el paciente de esta visita y la ESR de la visita previa, si el resultado de ESR no está disponible

Evaluar la elegibilidad del sujeto para re-tratamiento en base a la DAS 28-ESR calculada y los resultados de laboratorio de la visita previa.

Si el sujeto es elegible para re-tratamiento, proceder al Día 1 de Re-tratamiento y completar las evaluaciones especificadas.

- Prueba de embarazo en orina para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido una ligadura de trompas)

- Evaluaciones del laboratorio central

Hematología/CBC

Químicas de suero

Análisis de orina

FACS expandidos

CRP

Inmunoglobulinas

RF

Anticuerpo anti-CCP

Muestra farmacocinética

Muestra HACA

- ESR (laboratorio local; método Westergren)
- Muestras de biomarcadores de investigación opcionales (muestras de sangre completa y suero)
- Eventos adversos
- Medicaciones concomitantes

e. *Semana 28 (Día 196 $\pm$ 3 días)*

· Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el paciente

· Evaluación del Dolor (VAS) por el paciente

· HAQ

· Evaluación de articulaciones

· Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS)

por el médico

· Completar solamente si el sujeto no ha sido re-tratado.

Calcular DAS 28-ESR usando el conteo de articulaciones y la Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el paciente de esta visita y la ESR de la visita previa, si el resultado de ESR no está disponible

Evaluar la elegibilidad del sujeto para re-tratamiento en base a la DAS 28-ESR calculada y los resultados de laboratorio de la visita previa.

Si el sujeto es elegible para re-tratamiento, proceder al Día 1 de Re-tratamiento y completar las evaluaciones especificadas.

- Prueba de embarazo en orina para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido una ligadura de trompas)

- Evaluaciones del laboratorio central

 - Hematología/CBC

 - Químicas de suero

 - Análisis de orina

 - Células B CD19

 - CRP

 - Inmunoglobulinas

 - Muestra farmacocinética

- ESR (laboratorio local; método Westergren)

- Eventos adversos

- Medicaciones concomitantes

f. Semanas 32, 40 y 44 (Días 224, 280 y 308, respectivamente; $\pm$ 3 días)

- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el paciente

- Evaluación del Dolor (VAS) por el paciente

- HAQ

- FACIT-F (Semana 32 solamente)

- Evaluación de articulaciones

- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el médico

- Completar solamente si el sujeto no ha sido re-tratado.
Calcular DAS 28-ESR usando el conteo de articulaciones y la Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el paciente de esta visita y la ESR de la visita previa, si el resultado de ESR no está disponible (Semanas 32 y 40 solamente)

Evaluar la elegibilidad del sujeto para re-tratamiento en base a la DAS 28-ESR calculada y los resultados de laboratorio de la visita previa.

Si el sujeto es elegible para re-tratamiento, proceder al Día 1 de Re-tratamiento y completar las evaluaciones especificadas.

- Prueba de embarazo en orina para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido una ligadura de trompas)

- Evaluaciones del laboratorio central

 - Hematología/CBC

 - Químicas de suero

 - Análisis de orina

 - FACS expandidos (realizar solamente si el sujeto no ha sido re-tratado; Semana 44 solamente)

 - Células B CD19

 - Inmunoglobulinas

 - CRP

 - Muestra farmacocinética

- ESR (laboratorio local; método Westergren)

- Eventos adversos

- Medicaciones concomitantes

g. Semana 48 (Día 336 $\pm$ 3 días)

- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el paciente

- Evaluación del Dolor (VAS) por el paciente

- HAQ

- FACIT-F

- SF-36

- Evaluación de articulaciones
- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el médico
- Prueba de embarazo en orina para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido una ligadura de trompas)
- Evaluaciones del laboratorio central
 - Hematología/CBC
 - Químicas de suero
 - Análisis de orina
 - FACS expandidos
 - CRP
 - Inmunoglobulinas
 - RF
 - Anticuerpo anti-CCP
 - Muestra farmacocinética
 - Muestra HACA
- ESR (laboratorio local; método Westergren)
- Muestras de biomarcadores de investigación opcionales (muestras de sangre completa y suero)
- Eventos adversos
- Medicaciones concomitantes
- h. Semana 60 (Día 420 $\pm$ 7 días)
 - Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el paciente
 - Evaluación del Dolor (VAS) por el paciente
 - HAQ
 - FACIT-F
 - Evaluación de articulaciones

- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el médico
- Prueba de embarazo en orina para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido una ligadura de trompas)
- Evaluaciones del laboratorio central
 - Hematología/CBC
 - Químicas de suero
 - Análisis de orina
 - FACS expandidos
 - CRP
 - Inmunoglobulinas
 - Muestras de biomarcadores de investigación opcionales (muestras de sangre completa y suero)
- ESR (laboratorio local; método Westergren)
- Eventos adversos
- Medicaciones concomitantes

i. *Semana 72 (Día 504 $\pm$ 7 días)*

Los sujetos cuyos conteos de células B periféricas (CD19⁺) no se han recuperado al completar esta visita entrarán al período de seguimiento de células B. La recuperación de células B es definida como los conteos de CD19⁺ periféricos que han retornado a los valores de línea de base o LLN, lo que sea menor.

- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el paciente
- Evaluación del Dolor (VAS) por el paciente
- HAQ
- FACIT-F

- SF-36
- Signos vitales (tasa cardiaca, presión sanguínea y temperatura)
- Examen físico, incluyendo peso
- Evaluación de articulaciones
- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el médico
- ECG de 12 derivaciones
- Prueba de embarazo en orina para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido una ligadura de trompas)
- Evaluaciones del laboratorio central
 - Hematología/CBC
 - Químicas de suero
 - Análisis de orina
 - FACS expandidos
 - CRP
 - Inmunoglobulinas
 - RF
 - Anticuerpo anti-CCP
- ESR (laboratorio local; método Westergren)
- Muestras de biomarcadores de investigación opcionales (muestras de sangre completa y suero)
- Eventos adversos
- Medicaciones concomitantes

Los sujetos elegibles para re-tratamiento durante las Semanas 24-40 serán distribuidos aleatoriamente para recibir un curso adicional de medicamento en estudio. Los sujetos deben completar todas las evaluaciones del Día 1 de Re-tratamiento

que no han sido realizadas durante la visita de calificación. Las evaluaciones realizadas desde la visita de calificación no necesitan ser repetidas.

Si la infusión no puede ser administrada el mismo día que la visita de calificación, el sujeto debe retornar para la infusión dentro de las 72 horas de la visita de calificación.

Después del curso de re-tratamiento (Días 1 y 15 de Re-tratamiento), el sujeto debe retornar a su siguiente visita programada en base al programa de evaluaciones desde el momento en el cual el sujeto calificó para el re-tratamiento. Por ejemplo, si un sujeto calificó para re-tratamiento en la visita de la Semana 32, después del curso de re-tratamiento (Días 1 y 15 de Re-tratamiento), la siguiente visita programada del sujeto debe ser la visita de la Semana 40.

a. Día 1 de Re-tratamiento (R1)

Todas las evaluaciones serán realizadas 30 minutos antes de la infusión a menos que se especifique lo contrario.

• Distribución aleatoria y asignación de medicamento en estudio a través del IVRS

• Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el paciente

• Evaluación del Dolor (VAS) por el paciente

• HAQ

• FACIT-F

• SF-36

• Signos vitales (tasa cardíaca, presión sanguínea y temperatura): pre-infusión, durante la infusión (cada 15 minutos por 1 hora, y entonces cada 30 minutos hasta el final

de la infusión) y post-infusión (cada 30 minutos por 1 hora post-infusión)

- Examen físico, incluyendo medición del peso corporal
- Evaluación de articulaciones
- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el médico
- Prueba de embarazo en orina para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido una ligadura de trompas)
- Evaluaciones del laboratorio central
 - Hematología/CBC (dentro de los 30 minutos pre- y post-infusión)
 - Químicas de suero
 - Análisis de orina
 - CRP
 - FACS expandidos (dentro de los 30 minutos pre- y post-infusión)
 - Células B CD19 (dentro de los 30 minutos pre- y post-infusión)
 - Inmunoglobulinas
 - RF
 - Anticuerpo anti-CCP
 - C3, C4
 - Muestra farmacocinética (dentro de los 30 minutos pre- y post-infusión)
 - Muestra de HACA
- ESR (laboratorio local; método Westergren)
- Muestras de biomarcadores de investigación opcionales (muestras de sangre completa y suero)

- Administración de metilprednisolona
- Administración de medicamento en estudio
- Eventos adversos
- Medicaciones concomitantes

b. Día 15 de Re-tratamiento (R15; $\pm$ 1 día)

Todas las evaluaciones serán realizadas 30 minutos antes de la infusión a menos que se especifique lo contrario.

- Signos vitales (tasa cardiaca, presión sanguínea y temperatura): pre-infusión, durante la infusión (cada 15 minutos por 1 hora, y entonces cada 30 minutos hasta el final de la infusión) y post-infusión (cada 30 minutos por 1 hora post-infusión)

- Prueba de embarazo en orina para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido una ligadura de trompas)

- Evaluaciones del laboratorio central

Hematología/CBC (dentro de los 30 minutos pre- y post-infusión)

Químicas de suero

Análisis de orina

C3, C4

Muestra farmacocinética (30 minutos pre- y post-infusión)

- Administración de metilprednisolona
- Administración de medicamento en estudio
- Eventos adversos
- Medicaciones concomitantes

Se pedirá a los sujetos que se retiraron temprano del período de tratamiento por cualquier razón que regresen para una visita de retiro temprano del tratamiento (hasta 14 días

después del retiro) y entonces regrese a las 4 semanas después de la visita de retiro y entonces cada 12 semanas por al menos 48 semanas desde el momento en que el sujeto se retira. Las siguientes evaluaciones serán realizadas en la visita de retiro temprano del tratamiento:

- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el paciente
- Evaluación del Dolor (VAS) por el paciente
- HAQ
- FACIT-F
- SF-36
- Signos vitales (tasa cardiaca, presión sanguínea y temperatura)
- Examen físico, incluyendo peso
- Evaluación de articulaciones
- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad (VAS) por el médico
- ECG de 12 derivaciones
- Prueba de embarazo en orina para mujeres con potencial de maternidad (incluyendo aquéllas que han tenido una ligadura de trompas)
- Evaluaciones del laboratorio central
 - Hematología/CBC
 - Químicas de suero
 - Análisis de orina
 - CRP
 - Células B CD19
 - Inmunoglobulinas
 - RF

Anticuerpo anti-CCP

Muestra farmacocinética

Muestra de HACA

Muestras de biomarcadores de investigación opcionales
(muestras de sangre completa y suero)

- ESR (laboratorio local; método Westergren)
- Eventos adversos
- Medicaciones concomitantes

Las evaluaciones de seguimiento de seguridad (SFU) serán realizadas en las Semanas 4, 12, 24, 36 y 48 de SFU después de un retiro temprano o la compleción del período de tratamiento como se define para los siguientes sujetos:

- Sujetos que fueron re-tratados durante las Semanas 24-40 y completaron el período de tratamiento (es decir, la visita de la Semana 72)
- Sujetos que se retiraron temprano del período de tratamiento

Las siguientes evaluaciones serán realizadas en cada visita de SFU:

- Todos los eventos adversos hasta la semana 4
- Eventos adversos serios y eventos adversos infecciosos después de la semana 4
- Medicaciones concomitantes usadas para tratar estos eventos
- Evaluaciones del laboratorio central

Hematología/CBC

Inmunoglobulinas

Muestra farmacocinética

Muestra de HACA

- Células B CD19

En la última visita, los sujetos cuyos conteos de células B periféricas (CD19⁺) no se han recuperado entrarán al período de seguimiento de células B. La recuperación de células B es definida como los conteos de CD19⁺ periféricos que han retornado a los valores de línea de base o LLN, lo que sea menor. Para todos los eventos adversos infecciosos serios reportados, CBC con diferenciales, Ig cuantitativa y conteos CD19 deben ser determinados dentro de 1 semana del inicio.

Los sujetos cuyos conteos de células B periféricas (CD19⁺) no se han recuperado en la última visita definida en el protocolo (Semana 72 o al final del SFU) entrarán al Período de Seguimiento de Células B y retornarán para visitas de estudio cada 12 semanas desde la última visita hasta la recuperación de las células B. La recuperación de células B es definida como los conteos de CD19⁺ periféricos que han retornado a los valores de línea de base o LLN, lo que sea menor.

Las siguientes evaluaciones y procedimientos serán realizados en cada visita de seguimiento de células B:

- Eventos adversos serios y eventos adversos infecciosos
- Medicaciones concomitantes usadas para tratar estos eventos
- Evaluaciones del laboratorio central

Hematología/CBC

Inmunoglobulinas

Citometría de flujo: conteo de células B (CD19⁺)

Para todos los eventos adversos infecciosos serios reportados, CBC con diferenciales, Ig cuantitativa y conteos CD19 deben ser determinados dentro de 1 semana del inicio.

Las muestras de sangre, suero y orina serán obtenidas en puntos específicos en el tiempo. Las instrucciones para

procesar, guardar y enviar las muestras a Genentech y el laboratorio clínico central serán proporcionadas en los manuales de laboratorio. Unos ensayos estándar serán usados para hematología, serología, química, β -hCG en suero, citometría de flujo, inmunología y análisis de orina.

El ELISA farmacocinético de rituximab mide los niveles de rituximab en muestras de suero humano. Usa anti-rituximab de cabra policlonal purificado por afinidad como el reactivo de captura y anticuerpo de cabra a ratón IgG F(ab)₂ conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) como el reactivo de detección.

El ELISA de HACA anti-rituximab es un ensayo de ponteado, que usa rituximab como el reactivo de captura y rituximab tratado con biotina y estreptavidina-HRP para detección. El ensayo usa una curva calibradora preparada con anticuerpos de cabra policlonales purificados por afinidad, a rituximab y es confirmado por inmunodepleción con rituximab. Los resultados de este ensayo fueron reportados con relación a este anticuerpo policlonal en términos de unidades relativas (RU)/ml.

Los sujetos pueden retirarse o haber descontinuado el período de tratamiento en cualquier momento, pero deben retornar al centro de estudio dentro de los 14 días para una visita de retiro temprano del tratamiento, SFU y potencialmente seguimiento de células B. Los sujetos que han descontinuado el período de tratamiento serán seguidos para evaluaciones de seguridad. Se debe hacer un esfuerzo para obtener estas evaluaciones para sujetos que descontinúan temprano el período de tratamiento. La razón primaria de una discontinuación temprana debe ser registrada en la página de CRF apropiada.

Las razones para discontinuación del sujeto por el investigador incluyen, pero no están limitadas a, las siguientes:

- Retiro voluntario del consentimiento
- Cualquier condición médica que pueda poner en riesgo la seguridad del sujeto si continúa en el estudio, según lo determinado por el investigador
- Determinación por el investigador que no es del mejor interés para el sujeto continuar en el estudio
- Sujetos que tienen una prueba positiva de embarazo en orina o suero en cualquier momento durante el estudio.

Los sujetos que se retiran temprano no serán reemplazados.

Genentech se reserva el derecho de terminar este estudio en cualquier momento. Las razones para terminar el estudio pueden incluir, pero no están limitadas a, las siguientes:

- La incidencia o severidad de eventos adversos en éste u otros estudios indica un riesgo de salud potencial para los sujetos.
- La inscripción de sujetos es insatisfactoria.
- El registro de datos es impreciso o incompleto.

Este estudio es diseñado para evaluar la eficacia de un curso de re-tratamiento con rituximab o placebo para sujetos elegibles y la seguridad del tratamiento con rituximab en sujetos con RA activa que están recibiendo MTX y que tuvieron una respuesta inadecuada previa o actual a una o más terapias anti-TNF. La elegibilidad de un sujeto para el re-tratamiento está basada en los criterios de remisión de DAS 28-ESR (DAS 28-ESR $\geq$ 2,6). Aproximadamente 555 sujetos serán inscritos. El estudio es de etiqueta abierta para el primer curso de

tratamiento (con rituximab) y cegado para sujetos elegibles para un curso de re-tratamiento (medicamento en estudio). Durante las Semanas 24-40, los sujetos que satisfacen los criterios de re-tratamiento serán distribuidos aleatoriamente en una relación 2:1 a rituximab o placebo.

A menos que se especifique lo contrario, todas las pruebas estadísticas son bilaterales y serán realizadas al nivel $\alpha=0,05$ de significancia.

El punto final primario es la proporción de sujetos con una respuesta ACR20 en la Semana 48 con relación a la línea de base (Día 1). El análisis de datos no cegados comenzará una vez que las evaluaciones de la Semana 48 de todos los sujetos estén en la base de datos y la base de datos sea limpiada y congelada.

Para el segmento de tratamiento de etiqueta abierta con rituximab (primeras 24 semanas del estudio), el número de sujetos inscritos será tabulado por centro. Para los sujetos que descontinúan el segmento de tratamiento de etiqueta abierta, las razones de discontinuación serán resumidas. Las violaciones de criterios clave de elegibilidad, otras desviaciones mayores del protocolo, y el número de sujetos que completan cada dosis programada, serán resumidos.

Para el segmento de tratamiento cegado, con medicamento en estudio, el número de sujetos distribuidos aleatoriamente será tabulado por centro y grupo de tratamiento. La disposición de los sujetos será resumida por grupo de tratamiento con respecto a la distribución aleatoria de sujetos, tratamiento y compleción del estudio. Las violaciones de criterios clave de elegibilidad, otras desviaciones mayores del protocolo, y el número de sujetos que completan cada dosis programada serán

resumidos por grupo de tratamiento. Para los sujetos que descontinúan temprano el segmento de re-tratamiento controlado por placebo, las razones de discontinuación serán resumidas y enumeradas por grupo de tratamiento.

La línea de base de los grupos de tratamiento será evaluada para determinar la comparabilidad con respecto a la demografía (es decir, edad, sexo, raza/grupo étnico) y las características de línea de base (por ejemplo peso corporal, duración de la RA, condición de RF en la línea de base, SJC/TJC en la línea de base, DAS 28-ESR en la línea de base y número de terapias de TNF previas). El valor de línea de base de cualquier variable será definido como el último valor disponible antes de la primera administración de rituximab (Día 1).

La seguridad será evaluada a través del resumen de eventos adversos, muertes, resultados de pruebas de laboratorio, signos vitales y HACA. Estos resúmenes serán producidos como un resumen general para el segmento de tratamiento de etiqueta abierta y por grupo de tratamiento para el segmento de re-tratamiento, controlado por placebo. Los análisis de seguridad estarán basados en sujetos que recibieron cualquier cantidad de medicamento en estudio. Los sujetos serán analizados de acuerdo con el tratamiento real recibido.

Los siguientes resúmenes de seguridad serán incluidos en los análisis de seguridad.

Unas descripciones al pie de la letra de eventos adversos emergentes del tratamiento serán mapeadas a términos del tesoro MedDRA. Los eventos adversos serán tabulados de acuerdo con la clase de órgano sistémico, el ramal de tratamiento y el grado NCI CTCAE. Las tabulaciones de eventos

adversos para eventos adversos serios, eventos adversos relacionados con infecciones, reacciones a la infusión relacionadas con rituximab y eventos adversos que conducen a la discontinuación del fármaco en estudio estarán basadas en todos los sujetos tratados y serán tabuladas después de la primera infusión del curso inicial con rituximab y el curso de re-tratamiento.

Además, los eventos adversos serios serán resumidos como incidencia por 100 pacientes-años después de la primera infusión del curso inicial con rituximab y el curso de re-tratamiento así como para el período de observación entero.

Las muertes de sujetos y la causa primaria de la muerte serán enumeradas y/o resumidas.

Unos resúmenes descriptivos de valores de laboratorio y cambios con respecto a la línea de base durante todo el estudio serán proporcionados. La proporción de sujetos que experimenten anomalías de laboratorio que emergen del tratamiento será resumida.

Unos resúmenes descriptivos de signos vitales y cambios con respecto a la línea de base durante todo el estudio serán proporcionados por grupo de tratamiento.

La proporción de sujetos con una respuesta mensurable de anticuerpos a rituximab será resumida.

La población destinada a ser tratada (ITT) consiste en todos los sujetos que son distribuidos aleatoriamente al segmento de re-tratamiento controlado por placebo y reciben cualquier medicamento en estudio. La población ITT es la población de análisis primario para los puntos finales primario

y secundarios. Los sujetos serán analizados de acuerdo con su tratamiento distribuido aleatoriamente.

El punto final primario es la proporción de sujetos re-tratados con una respuesta ACR20 en la Semana 48 en comparación con la línea de base (Día 1).

El logro de una ACR20 requiere $\geq 20\%$ de mejoría en comparación con la línea de base en los TJC y SJC así como $\geq 20\%$ de mejoría en tres de cinco mediciones adicionales, como sigue:

- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad por el médico
- Evaluación Global de la Actividad de la Enfermedad por el paciente
- Evaluación del Dolor (VAS) por el paciente
- HAQ
- Reactivo de fase aguda (CRP o ESR)

Se usará la CRP en el cálculo de ACR20. Si la CRP está ausente o no es realizada, se usará la ESR.

El análisis primario de la diferencia en las tasas de respuesta ACR20 entre el ramal de re-tratamiento con placebo y el ramal de re-tratamiento con rituximab será presentado usando la prueba estadística de Cochran-Mantel Haenszel, estratificada por condición de RF en la línea de base. Los resultados serán resumidos de manera descriptiva por grupo de tratamiento y expresados como proporciones, con los intervalos de confianza (CI) de 95% ajustados correspondientes de la diferencia entre tasas de respuesta y valores p.

Las tasas de respuesta ACR20 serán también analizadas usando regresión logística y prueba para una asociación entre

respuesta ACR20 en la Semana 48 y ramal de tratamiento mientras que se controla la condición de RF en la línea de base usando un modelo de regresión logística. Los estimados de parámetros del modelo serán examinados tabulando los errores estándar, estadísticas Wald y relaciones de desigualdad con los CI de 95% y valores p correspondientes.

Unos análisis de sensibilidad serán también realizados ajustando para términos explicatorios potenciales para la respuesta ACR20 (por ejemplo SJC de línea de base).

Los puntos finales secundarios serán analizados como sigue:

- La proporción de sujetos con respuesta ACR50 y ACR70 en la Semana 48 será analizada de la misma manera que se especificó para el punto final primario.

- El cambio en DAS 28-ESR desde la línea de base hasta la Semana 48 será evaluado usando un modelo de análisis de varianza (ANOVA), con el grupo de re-tratamiento con placebo/rituximab y la condición de RF en la línea de base como términos explicatorios en el modelo.

- La categoría ordenada de respuestas ACR (respondedores ACR70, respondedores ACR50-70, respondedores ACR20-50 y no respondedores ACR20) en la Semana 48 será analizada usando el modelo lógico acumulativo, estratificado por condición de RF en la línea de base. Los estimados de parámetros del modelo serán examinados tabulando los errores estándar, estadísticas Wald y relaciones de desigualdad con los CI de 95% y valores p correspondientes.

- Las tasas de respuesta EULAR (buenas o moderadas) en la semana 48 serán analizadas de la misma manera que se especificó para el punto final primario.

- El cambio en el conjunto esencial ACR (SJC, TJC, HAQ, evaluaciones globales por el paciente y el médico, dolor, CRP y ESR) desde la línea de base hasta la Semana 48 será analizado en un modelo ANOVA, con el grupo de re-tratamiento con placebo/rituximab y la condición de RF en la línea de base como términos explicatorios en el modelo.
- ACRn en la Semana 48 y AUC de ACRn en la Semana 48 serán evaluados usando un modelo de análisis de varianza (ANOVA), con el grupo de re-tratamiento con placebo/rituximab y la condición de RF en la línea de base como términos explicatorios en el modelo.
- El cambio en la subescala SF-36 y las calificaciones resumen desde la línea de base hasta la Semana 48 será reportado para las calificaciones de ocho dominios y las calificaciones de componentes mentales y físicos usando un análisis en un modelo ANOVA, con el grupo de re-tratamiento con placebo/rituximab y la condición de RF en la línea de base como términos explicatorios en el modelo. Además, las calificaciones de componentes mentales y físicos serán adicionalmente clasificadas en categorías y analizadas.
- El cambio en la evaluación de FACIT-F desde la línea de base hasta la Semana 48 será analizado en un modelo ANOVA, con el grupo de re-tratamiento con placebo/rituximab y la condición de RF en la línea de base como términos explicatorios en el modelo.
- La proporción de sujetos que logran remisión de DAS 28-ESR ($\text{DAS } 28\text{-ESR} < 2,6$) en la Semana 48 será analizada de la misma manera que se especificó para el punto final primario.

Los datos serán resumidos usando estadísticas descriptivas, incluyendo media, desviación estándar, media geométrica, coeficiente de variación, mediana e intervalo.

Los marcadores farmacodinámicos potenciales para muestras de sangre, incluyendo conteos de células B, niveles de Ig cuantitativos, subtipos de linfocitos y concentración de HACA, serán resumidos de manera descriptiva. Para estos análisis, los valores de línea de base medidos de la muestra antes de la dosis en el Día 1 serán usados para calcular el cambio desde la línea de base en cada punto de muestreo en el tiempo.

Unos análisis exploratorios serán realizados para evaluar la posible relación entre los marcadores farmacodinámicos, las mediciones PK y la respuesta clínica y serán especificados en el Plan de Análisis Estadístico.

Aproximadamente 555 sujetos serán inscritos. Asumiendo una tasa de deserción de hasta 25% durante el segmento de tratamiento de etiqueta abierta y hasta 10% de sujetos que lograron remisión de DAS 28-ESR en la Semana 24 y no son re-tratados, con una relación de distribución aleatoria de 2:1, este tamaño de muestra tendrá 80% de potencia para detectar una diferencia del 16% en las tasas de respuesta ACR20 desde la línea de base hasta la Semana 48 entre el grupo de re-tratamiento con rituximab (50% de respondedores ACR20) y el grupo de placebo (34% de respondedores ACR20) usando la prueba exacta de Fisher.

Las evaluaciones de seguridad consistirán en monitorizar y registrar los eventos adversos (AE) y los eventos adversos serios (SAE) definidos por el protocolo; medición de variables de laboratorio (hematología, química clínica y análisis de

orina) especificadas por el protocolo; medición de signos vitales especificados por el protocolo; y otras pruebas especificadas por el protocolo que son consideradas críticas para la evaluación de seguridad del medicamento en estudio.

Para monitorizar las reacciones relacionadas con la infusión, los signos vitales serán obtenidos inmediatamente antes de la infusión, cada 15 minutos en la primera hora durante la infusión, entonces cada 30 minutos durante el resto de la infusión, y cada 30 minutos por una hora después de la infusión, en los días de administración del medicamento en estudio. Unas lecturas adicionales pueden ser obtenidas en caso de una reacción relacionada con la infusión (por ejemplo hipotensión y/o fiebre).

Un AE es cualquier signo, síntoma o enfermedad desfavorable y no intencional asociado temporalmente con el uso de un producto de investigación (medicinal) u otra intervención impuesta por el protocolo, independientemente de la atribución.

Esto incluye lo siguiente:

- AE no observados previamente en el sujeto, que surgen durante el período de reporte de AE especificado por el protocolo, incluyendo signos y síntomas asociados con RA que no estaban presentes antes del período de reporte de AE.
- Complicaciones que ocurren como un resultado de intervenciones mandadas por el protocolo (por ejemplo, procedimientos invasivos tales como biopsias).
- Si es aplicable, AE que ocurren antes de la asignación del tratamiento de estudio asociados con eliminación de medicamentos del sistema, ausencia de inserción de tratamiento u otra intervención mandada por el protocolo.

- Condiciones médicas pre-existent (diferentes a la condición que está siendo estudiada) que en opinión del investigador han empeorado en severidad o frecuencia o cambiado en carácter durante el período de reporte de AE especificado por el protocolo.

Un AE debe ser clasificado como un SAE si satisface los siguientes criterios:

- Amenaza la vida (es decir, el AE, en la opinión del investigador, pone al sujeto en riesgo inmediato de muerte. No incluye un AE que, si hubiera ocurrido en una forma más severa, pudiera haber causado la muerte.).
- Requiere o prolonga la hospitalización del paciente.
- Resulta en incapacidad persistente o significativa (es decir, el AE resulta en interrupción sustancial de la capacidad del sujeto para conducir funciones de la vida normal).
- Resulta en un defecto de nacimiento/anomalía congénita en un neonato/infante nacido de una madre expuesta al producto de investigación.
- Es considerado un evento médico significativo por el investigador en base a la opinión médica (por ejemplo, puede poner en peligro al sujeto o puede requerir intervención médica/quirúrgica para impedir uno de los resultados enumerados anteriormente).

Todos los AE que no satisfacen alguno de los criterios para ser serios deben ser considerados como AE no serios.

Los términos "severo" y "serio" no son sinónimos. La severidad (o intensidad) se refiere al grado de un AE específico, por ejemplo infarto de miocardio suave (Grado 1), moderado (Grado 2) o severo (Grado 3). "Serio" es una

definición reguladora y se basa en el resultado o criterio de acción de un sujeto o evento asociado usualmente con eventos que representan una amenaza para la vida o el funcionamiento del sujeto. La seriedad (no la severidad) sirve como la guía para definir obligaciones de reporte de regulación del Patrocinante a las autoridades de regulación aplicables.

La severidad y la seriedad deben ser evaluadas independientemente cuando se registran los AE y SAE en la CRF.

Los investigadores evaluarán la ocurrencia de AE y SAE en todos los puntos de evaluación de los sujetos en el tiempo durante el estudio. Todos los AE y SAE, ya sean indicados voluntariamente por el sujeto, descubiertos por el personal del estudio durante el interrogatorio, o detectados a través de examen físico, prueba de laboratorio u otros medios, serán registrados en el registro médico del sujeto y en la página de CRF de AE y SAE apropiada.

Cada AE y SAE registrado será descrito por su duración (es decir, fechas de inicio y fin), severidad (véase la Tabla 2), criterios de seriedad de regulación si son aplicables, relación sospechada al producto de investigación (véase la guía siguiente) y acciones emprendidas.

La escala de graduación (severidad) de los AE encontrada en NCI CTCAE, V3.0, será usada para el reporte de AE.

Tabla 2

Escala de Graduación (Severidad) de Eventos Adversos

Grado	Severidad	Descripción Alterna ^a
1	Suave (aplicar criterios de graduación de NCI CTCAE específicos del evento)	Incomodidad transitoria o suave (< 48 horas); no interfiere con las actividades diarias del sujeto; no requiere intervención/terapia médica
2	Moderado (aplicar criterios de graduación de NCI CTCAE específicos del evento)	Interferencia suave a moderada con las actividades diarias del sujeto; intervención/terapia médica requerida nula o mínima
3	Severo (aplicar criterios de graduación de NCI CTCAE específicos del evento)	Interferencia considerable con las actividades diarias del sujeto; intervención/terapia médica requerida; hospitalización posible
4	Muy severo, que amenaza la vida, o incapacitante (aplicar criterios de graduación de NCI CTCAE específicos del evento)	Limitación extrema en actividad; intervención/terapia médica significativa requerida, hospitalización probable
5	Muerte relacionada con AE	

Nota: Independientemente de la severidad, algunos eventos pueden satisfacer también unos criterios serios de regulación. Hágase referencia a las definiciones de un SAE.

^a Usar estas definiciones alternativas para eventos Grado 1, 2, 3 y 4 cuando el AE observado o reportado no está en el listado de NCI CTCAE.

Para asegurar la consistencia de las evaluaciones de causalidad de AE y SAE, los investigadores deben aplicar la siguiente pauta general:

· Sí

Hay una relación temporal plausible entre el inicio del AE y la administración del producto de investigación, y el AE no puede ser fácilmente explicado por el estado clínico del sujeto, enfermedad intercurrente o terapias concomitantes; y/o el AE sigue un patrón conocido de respuesta al producto de investigación; y/o el AE se reduce o resuelve al discontinuar el producto de investigación o reducir la dosis y, si es aplicable, reaparece en un nuevo reto.

· No

Existe evidencia de que el AE tiene una etiología diferente del producto de investigación (por ejemplo, condición médica pre-existente, enfermedad subyacente, enfermedad intercurrente o medicación concomitante); y/o el AE no tiene una relación temporal plausible con la administración del producto de investigación (por ejemplo, cáncer diagnosticado 2 días después de la primera dosis del medicamento en estudio).

Nota: La evaluación del investigador de la causalidad para los reportes de AE individuales es parte del proceso de documentación del estudio. Independientemente de la evaluación de causalidad "Sí" o "No" para reportes de AE individuales, el Patrocinante evaluará prontamente todos los SAE reportados contra la experiencia acumulativa del producto para identificar y comunicar de manera expedita unos nuevos hallazgos de seguridad posibles a los investigadores y autoridades de regulación aplicables.

54/6/2-08
2/2

La RA debe ser registrada como un AE o SAE solamente si, en opinión del investigador, empeoró inesperadamente en severidad y/o frecuencia o cambió en naturaleza en cualquier momento durante el estudio. Cuando se registra un empeoramiento no anticipado de la artritis reumatoide en una página de CRF de AE o SAE, es importante transmitir el concepto de que la condición ha cambiado incluyendo descriptores aplicables (por ejemplo, "artritis reumatoide acelerada").

Se espera que el re-tratamiento bajo el protocolo en la presente (o con un anticuerpo CD20 diferente) será efectivo para prevenir o retardar la progresión en el daño estructural en la articulación y la erosión causados por RA. Se contempla que unos resultados eficaces ocurrirán si no se emplea MTX, es decir, se usa una monoterapia con el anticuerpo CD20.

Ejemplo 4

Estudio de la Eficacia del Rituximab en Pacientes con Artritis por Soriasis

Se sigue el protocolo en el Ejemplo 2, excepto que los pacientes son tratados para el daño en la articulación causado por artritis por soriasis. Se espera que unos resultados similares serán observados (usando rituximab o un anticuerpo 2H7 humanizado) como para la artritis reumática, es decir, la progresión en el daño estructural en la articulación será impedido con una primera dosis de anticuerpo CD20 (con o sin metotrexato dependiendo, por ejemplo, de que las dosificaciones puedan ser ajustadas apropiadamente) por lo menos a aproximadamente un mes desde la línea de base o inicio del tratamiento, preferiblemente por lo menos 24 semanas desde la línea de base, de preferencia por lo menos 52 semanas desde la

línea de base, y en puntos adicionales en el tiempo hasta 104 semanas desde la línea de base.

Estos regímenes basados en rituximab desafían el patrón de cuidado actual, y se espera que demuestren un beneficio clínico neto mejorado, el objetivo primario siendo impedir la progresión en el daño en la articulación. Se piensa que estos resultados serán significativamente mejores que aquéllos del .ramal de control.

Se predice y se espera que la administración de rituximab o un 2H7 humanizado al sujeto en el protocolo de re-dosificación programado expuesto en el Ejemplo 2 será efectivo para impedir la progresión del daño estructural en la articulación en la semana 52 o posteriormente. Se piensa que estos resultados serán significativamente mejores que aquéllos del control.

También se espera que, a aproximadamente la semana 48-54, otra dosis de 1 g o 2 g del anticuerpo CD20 (por ejemplo rituximab o un 2H7 humanizado) proporcionada toda de una vez o distribuida en aproximadamente 14-16 días en cantidades de 0,5 o 1 gramo sería efectiva para tratar el daño en la articulación para el segundo año entero, con o sin uno o más segundos medicamentos tales como agentes inmunosupresores. Así, el anticuerpo CD20 sería administrado inicialmente dentro de aproximadamente el período de tiempo de 2 semanas, seguido por otro tratamiento a aproximadamente 4-8 meses, seguido por otro tratamiento a aproximadamente un año desde el tratamiento inicial (medido desde el momento en que una cualquiera de las dosis fue administrada), seguido por un tratamiento a aproximadamente dos años desde el tratamiento inicial, con éxito esperado, en dosificaciones de aproximadamente medio

gramo o un gramo x 2-4 para cada tratamiento, administradas conjuntamente, aproximadamente semanalmente, o aproximadamente cada dos semanas durante aproximadamente dos a cuatro semanas. Se espera que los resultados de este tratamiento serían mucho mejores que aquéllos del control con placebo. Se espera que este protocolo de re-tratamiento será exitosamente usado por varios años con pocos o ningún efecto adverso.

Ejemplo 5

Estudio de Tratamiento de la Eficacia del Rituximab en Pacientes con Osteoartritis y Enfermedad de Crohn

Se piensa que los resultados del Ejemplo 2 tendrían éxito si los pacientes tuvieran daño en la articulación como resultado de osteoartritis o enfermedad de Crohn, ya sea que se use rituximab u otro anticuerpo CD20 tal como 2H7 humanizado, y ya sea que se use o no un agente inmunosupresor, con ajuste de las dosis como sería conocido por aquéllos versados en el arte. Adicionalmente, si tales pacientes son inicialmente tratados con anticuerpo CD20 y entonces re-tratados con tal anticuerpo aproximadamente seis meses o aproximadamente un año después de haber sido tratados la primera vez, usando de otro modo la misma dosificación y otro protocolo del Ejemplo 2, se espera que continuarán experimentando prevención de la progresión del daño en la articulación por un período de tiempo extenso.

También se espera que el rituximab u otro anticuerpo CD20 será por lo menos tan efectivo como el régimen de tratamiento convencional para inducción y mantenimiento de remisión del daño en la articulación, ofreciendo ventajas sustanciales sobre la terapia estándar en virtud de su perfil superior de efectos

secundarios, por ejemplo mucho menos tóxico que los esteroides, y mejor para restablecer la tolerancia.

Se espera que los pacientes en el ramal de tratamiento tolerarán bien las infusiones de rituximab y que sus células B serán reducidas rápidamente. Aparte del metotrexato, si es necesario, se piensa que unos agentes inmunosupresores adicionales no serán necesarios para la inducción de la remisión y el mantenimiento de la remisión sostenida (6 meses o más) en los pacientes tratados con anticuerpo CD20.

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar el daño en una articulación en un sujeto, que comprende administrar un anticuerpo CD20 al sujeto y realizar al sujeto, por lo menos aproximadamente un mes después de la administración, una prueba radiográfica que mide una reducción en el daño en la articulación en comparación con una línea de base anterior a la administración, en donde la cantidad de anticuerpo CD20 administrada es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación.

2. El método de la reivindicación 1, en el cual la prueba radiográfica después de administrar el anticuerpo CD20 ocurre por lo menos aproximadamente dos meses después de administrar el anticuerpo.

3. El método de la reivindicación 1, en el cual la prueba radiográfica después de administrar el anticuerpo CD20 ocurre por lo menos aproximadamente 10 semanas después de administrar el anticuerpo.

4. El método de la reivindicación 1, en el cual la prueba radiográfica después de administrar el anticuerpo CD20 ocurre por lo menos aproximadamente tres meses después de administrar el anticuerpo.

5. El método de la reivindicación 1, en el cual la prueba radiográfica después de administrar el anticuerpo CD20 ocurre por lo menos aproximadamente cuatro meses después de administrar el anticuerpo.

6. El método de la reivindicación 1, en el cual la prueba radiográfica después de administrar el anticuerpo CD20 ocurre por lo menos aproximadamente cinco meses después de administrar el anticuerpo.

7. El método de la reivindicación 1, en el cual la prueba radiográfica después de administrar el anticuerpo CD20 ocurre por lo menos aproximadamente 24 semanas después de administrar el anticuerpo.

8. El método de la reivindicación 1, en el cual la prueba radiográfica después de administrar el anticuerpo CD20 ocurre por lo menos aproximadamente 52 semanas después de administrar el anticuerpo.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende adicionalmente una administración adicional al sujeto de un anticuerpo CD20 en una cantidad efectiva para lograr una reducción continua o mantenida en el daño en la articulación en comparación con el efecto de una administración previa de anticuerpo CD20.

10. El método de la reivindicación 9, en el cual el anticuerpo CD20 es adicionalmente administrado al sujeto incluso si no hay mejoría clínica en el sujeto en el momento de la prueba radiográfica después de una administración previa.

11. El método de la reivindicación 10, en el cual la mejoría clínica es determinada evaluando el número de articulaciones sensibles o hinchadas, el Índice de Severidad de Evaluación de Soriasis, una evaluación clínica global del sujeto, evaluando la tasa de sedimentación de eritrocitos, o evaluando la cantidad de nivel de proteína C-reactiva.

12. El método de la reivindicación 1, en el cual la prueba mide una calificación Sharp modificada total.

13. El método de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo es rituximab.

14. El método de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:2 y 8.

15. El método de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:39 y 40.

16. El método de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:32 y 33.

17. El método de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende un dominio de cadena pesada variable con alteración N100A, o D56A y N100A, o D56A, N100Y y S100aR en SEQ ID NO:8 y un dominio de cadena liviana variable con alteración M32L, o S92A, o M32L y S92A en SEQ ID NO:2.

18. El método de la reivindicación 1, en el cual el daño en la articulación es causado por artritis, aflojamiento aséptico en la articulación de implantes ortopédicos, ausencia de unión de una fractura, espondiloartropatías, soriasis o enfermedad de Crohn.

19. El método de la reivindicación 18, en el cual el daño en la articulación es causado por artritis.

20. El método de la reivindicación 19, en el cual el daño en la articulación es causado por artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante o artritis por soriasis.

21. El método de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo es administrado de manera intravenosa.

22. El método de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo es administrado de manera subcutánea.

23. El método de la reivindicación 1, en el cual el sujeto nunca ha sido tratado previamente con un anticuerpo CD20.

24. El método de la reivindicación 1, en el cual el sujeto es un paciente ingenuo de metotrexato.

25. El método de la reivindicación 24, en el cual el paciente ingenuo de metotrexato tiene artritis reumatoide activa.

26. El método de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo es un anticuerpo desnudo.

27. El método de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo es conjugado con otra molécula.

28. El método de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo es administrado en una dosis de aproximadamente 0,4 a 4 gramos.

29. El método de la reivindicación 28, en el cual el anticuerpo es administrado en una dosis de aproximadamente 0,4 a 1,3 gramos.

30. El método de la reivindicación 29, en el cual la dosis es aproximadamente 1,5 a 3,5 gramos.

31. El método de la reivindicación 30, en el cual la dosis es aproximadamente 1,5 a 2,5 gramos.

32. El método de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo es administrado a una frecuencia de una a cuatro dosis dentro de un período de aproximadamente un mes.

33. El método de la reivindicación 32, en el cual la dosis es aproximadamente 500 mg a 1,2 gramos.

34. El método de la reivindicación 33, en el cual la dosis es aproximadamente 750 mg a 1,1 gramos.

35. El método de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo es administrado en dos a tres dosis.

36. El método de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo es administrado dentro de un período de aproximadamente 2 a 3 semanas.

37. El método de la reivindicación 1, en el cual ningún otro medicamento, aparte del anticuerpo CD20, es administrado al sujeto para tratar el daño en la articulación.

38. El método de la reivindicación 1, en el cual un segundo medicamento es administrado en una cantidad efectiva, en donde el anticuerpo CD20 es un primer medicamento.

39. El método de la reivindicación 38, en el cual el segundo medicamento es más de un medicamento.

40. El método de la reivindicación 38 o 39, en el cual el segundo medicamento es un antibiótico, un agente inmunosupresor, un medicamento anti-reumático modificador de la enfermedad (DMARD por sus siglas en inglés), un agente de control del dolor, un antagonista de integrina, un medicamento anti-inflamatorio no esteroide (NSAID por sus siglas en inglés), un antagonista de citocina, un bisfosfonato o una hormona, o una combinación de los mismos.

41. El método de la reivindicación 40, en el cual el segundo medicamento es un DMARD.

42. El método de la reivindicación 41, en el cual el DMARD es seleccionado del grupo consistente en auranofina, cloroquina, D-penicilamina, oro inyectable, oro oral, hidroxiclороquina, sulfasalazina, miocrisina y metotrexato.

43. El método de la reivindicación 40, en el cual el segundo medicamento es un NSAID.

44. El método de la reivindicación 43, en el cual el NSAID es seleccionado del grupo consistente en: pentasa, mesalazina, asacol, fosfato de codeína, benorilato, fenbufeno, naprosina, diclofenac, etodolac, indometacina, aspirina e ibuprofeno.

45. El método de la reivindicación 40, en el cual el segundo medicamento es un agente de control del dolor.

46. El método de la reivindicación 45, en el cual el agente de control del dolor es seleccionado del grupo consistente en: paracetamol y dextropropoxifeno.

47. El método de la reivindicación 40, en el cual el agente inmunosupresor es seleccionado del grupo consistente en etanercept, infliximab, adalimumab, leflunomida, anakinra, azatioprina y ciclofosfamida.

48. El método de la reivindicación 40, en el cual el segundo medicamento es seleccionado del grupo consistente en OPG, etanercept, infliximab, etanercept, adalimumab, kinaret, raptiva, osteoprotegerina (OPG), RANKFc, anti-RANKL, pamidronato, alendronato, actonel, zolendronato, clodronato, metotrexato, azulfidina, hidroxicloroquina, doxiciclina, leflunomida, sulfasalazina (SSZ), prednisolona, antagonista de receptor de interleucina-1, prednisona y metilprednisolona.

49. El método de la reivindicación 40, en el cual el segundo medicamento es seleccionado del grupo consistente en infliximab, una combinación de infliximab/metotrexato (MTX), MTX, etanercept, un corticosteroide, ciclosporina A, azatioprina, auranofina, hidroxicloroquina (HCQ), combinación de prednisolona, MTX y SSZ, combinaciones de MTX, SSZ y HCQ, la

combinación de ciclofosfamida, azatioprina y HCQ, y la combinación de adalimumab con MTX.

50. El método de la reivindicación 49, en el cual el corticosteroide es prednisona, prednisolona, metilprednisolona, hidrocortisona o dexametasona.

51. El método de la reivindicación 49, en el cual el segundo medicamento es MTX.

52. El método de la reivindicación 1, en el cual el sujeto es de factor reumatoide negativo.

53. El método de la reivindicación 1, en el cual el sujeto es de factor reumatoide positivo.

54. El método de la reivindicación 1, en el cual el sujeto recibió metotrexato antes de la línea de base.

55. El método de la reivindicación 54, en el cual el metotrexato fue administrado a una dosis de aproximadamente 10-25 mg/semana.

56. El método de la reivindicación 54 o 55, en el cual el metotrexato fue administrado durante por lo menos aproximadamente 12 semanas antes de la línea de base.

57. El método de la reivindicación 56, en el cual el metotrexato fue administrado a una dosis estable las últimas cuatro semanas antes de la línea de base.

58. El método de la reivindicación 54, en el cual el metotrexato fue administrado de manera peroral o parenteral.

59. El método de la reivindicación 1, en el cual el daño en la articulación es causado por artritis reumatoide y el sujeto ha exhibido una respuesta inadecuada a uno o más inhibidores anti-factor de necrosis tumoral (TNF por sus siglas en inglés).

60. El método de la reivindicación 59, en el cual metotrexato concomitante es administrado al sujeto junto con el anticuerpo CD20.

61. El método de la reivindicación 60, en el cual el anticuerpo CD20 es administrado a una dosis de aproximadamente 1000 mg x 2 en los días 1 y 15 de manera intravenosa al comienzo del tratamiento.

62. Un método para monitorizar el tratamiento del daño en una articulación en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo CD20 al sujeto y medir por radiografía, después de por lo menos aproximadamente un mes desde la administración, si el daño en la articulación ha sido reducido sobre la línea de base antes de la administración, en donde una disminución versus la línea de base en el sujeto después del tratamiento indica que el anticuerpo CD20 está teniendo un efecto sobre el daño en la articulación.

63. El método de la reivindicación 62, en el cual el grado de reducción versus la línea de base es medido una segunda vez después de la administración del anticuerpo CD20.

64. El método de la reivindicación 62 o 63, en el cual la medición es después de por lo menos aproximadamente 24 semanas.

65. Un artículo de elaboración, que comprende:

a. un recipiente que comprende un anticuerpo CD20; y

b. un inserto de empaque con instrucciones para tratar el daño en la articulación en un sujeto, en donde las instrucciones indican que se administra al sujeto el anticuerpo CD20 y es entonces sometido, por lo menos aproximadamente un mes después de la administración, a un prueba radiográfica que mide una reducción en el daño en la articulación en comparación

con una línea de base antes de la administración, en donde la cantidad de anticuerpo CD20 administrada es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación.

66. El artículo de la reivindicación 65, que comprende adicionalmente un recipiente que comprende un segundo medicamento, en donde el anticuerpo CD20 es un primer medicamento, que comprende adicionalmente unas instrucciones en el inserto de empaque para tratar al sujeto con una cantidad efectiva del segundo medicamento.

67. Un método para tratar el daño en una articulación en un sujeto, que comprende administrar un anticuerpo CD20 al sujeto, y realizar al sujeto, por lo menos aproximadamente 52 semanas después de la administración, una prueba radiográfica que mide una reducción en el daño en la articulación en comparación con una línea de base antes de la administración, en donde la cantidad de anticuerpo CD20 administrada es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación.

68. El método de la reivindicación 67, en el cual la prueba mide una calificación Sharp modificada total.

69. El método de la reivindicación 67, en el cual el anticuerpo es rituximab.

70. El método de la reivindicación 67, en el cual el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:2 y 8.

71. El método de la reivindicación 67, en el cual el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:39 y 40.

72. El método de la reivindicación 67, en el cual el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:32 y 33.

73. El método de la reivindicación 67, en el cual el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende un dominio de cadena pesada variable con alteración N100A, o D56A y N100A, o D56A, N100Y y S100aR en SEQ ID NO:8 y un dominio de cadena liviana variable con alteración M32L, o S92A, o M32L y S92A en SEQ ID NO:2.

74. El método de la reivindicación 67, en el cual el daño en la articulación es causado por artritis.

75. El método de la reivindicación 74, en el cual la artritis es artritis reumatoide.

76. El método de la reivindicación 75, en el cual la artritis es artritis reumatoide activa temprana.

77. El método de la reivindicación 67, en el cual el sujeto no ha sido tratado previamente con un agente inmunosupresor antes de la administración de una primera dosis de anticuerpo CD20 en el método de tratamiento.

78. El método de la reivindicación 67, en el cual el anticuerpo es administrado en una dosis de aproximadamente 0,4 a 4 gramos.

79. El método de la reivindicación 67, en el cual el anticuerpo es administrado en una dosis de aproximadamente 0,4 a 1,3 gramos a una frecuencia de una a cuatro dosis dentro de un período de aproximadamente un mes.

80. El método de la reivindicación 79, en el cual la dosis es aproximadamente 500 mg a 1,2 gramos.

81. El método de la reivindicación 80, en el cual la dosis es aproximadamente 750 mg a 1,1 gramos.

82. El método de la reivindicación 67, en el cual el anticuerpo es administrado en dos a tres dosis.

83. El método de la reivindicación 67, en el cual el anticuerpo es administrado dentro de un período de aproximadamente 2 a 3 semanas.

84. El método de la reivindicación 67, que comprende adicionalmente re-tratar al sujeto administrando al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo CD20.

85. El método de la reivindicación 84, en el cual el re-tratamiento es comenzado a por lo menos aproximadamente 24 semanas después de la primera administración del anticuerpo CD20.

86. El método de la reivindicación 85, en el cual un re-tratamiento adicional es comenzado.

87. El método de la reivindicación 86, en el cual el re-tratamiento adicional es comenzado a por lo menos aproximadamente 24 semanas después de la segunda administración el anticuerpo CD20.

88. El método de la reivindicación 84, en el cual el daño en la articulación ha sido reducido después del re-tratamiento.

89. El método de la reivindicación 84, en el cual ninguna mejoría clínica es observada en el sujeto en el momento de la prueba radiográfica después del re-tratamiento.

90. El método de la reivindicación 89, en el cual la mejoría clínica es determinada evaluando el número de articulaciones sensibles o hinchadas, el Índice de Severidad de Evaluación de Soriasis, una evaluación clínica global del

sujeto, evaluando la tasa de sedimentación de eritrocitos, o evaluando la cantidad de nivel de proteína C-reactiva.

91. El método de la reivindicación 67, en el cual un segundo medicamento es administrado en una cantidad efectiva, en donde el anticuerpo CD20 es un primer medicamento.

92. El método de la reivindicación 91, en el cual el segundo medicamento es más de un medicamento.

93. El método de la reivindicación 91, en el cual el segundo medicamento es un antibiótico, un agente inmunosupresor, un medicamento anti-reumático modificador de la enfermedad (DMARD por sus siglas en inglés), un agente de control del dolor, un antagonista de integrina, un medicamento anti-inflamatorio no esteroide (NSAID por sus siglas en inglés), un antagonista de citocina, un bisfosfonato o una hormona, o una combinación de los mismos.

94. El método de la reivindicación 93, en el cual el segundo medicamento es metotrexato.

95. El método de la reivindicación 67, en el cual el sujeto es de factor reumatoide negativo.

96. El método de la reivindicación 67, en el cual el sujeto es de factor reumatoide positivo.

97. El método de la reivindicación 67, en el cual el anticuerpo es administrado de manera intravenosa.

98. El método de la reivindicación 67, en el cual el anticuerpo es administrado de manera subcutánea.

99. Un método para monitorizar el tratamiento del daño en una articulación en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo CD20 al sujeto y medir por radiografía, después de por lo menos aproximadamente 52 semanas

desde la administración, si el daño en la articulación ha sido reducido sobre la línea de base antes de la administración, en donde una disminución versus la línea de base en el sujeto después del tratamiento indica que el anticuerpo CD20 está teniendo un efecto sobre el daño en la articulación.

100. El método de la reivindicación 99, en el cual el grado de reducción versus la línea de base es medido una segunda vez después de la administración del anticuerpo CD20.

101. Un artículo de elaboración, que comprende:

(a) un recipiente que comprende un anticuerpo CD20; y

(b) un inserto de empaque con instrucciones para tratar el daño en la articulación en un sujeto, en donde las instrucciones indican que se administra al sujeto el anticuerpo CD20 y entonces es sometido, por lo menos aproximadamente 52 semanas después de la administración, a un prueba radiográfica que mide una reducción en el daño en la articulación en comparación con una línea de base antes de la administración, en donde la cantidad de anticuerpo CD20 administrada es efectiva para lograr una reducción en el daño en la articulación.

102. El artículo de la reivindicación 101, que comprende adicionalmente un recipiente que comprende un segundo medicamento, en donde el anticuerpo CD20 es un primer medicamento, que comprende adicionalmente unas instrucciones en el inserto de empaque para tratar al sujeto con una cantidad efectiva del segundo medicamento.

103. El artículo de la reivindicación 102, en el cual el segundo medicamento es metotrexato.

104. Un método para el tratamiento del daño en una articulación en un sujeto, en donde (a) el sujeto ha exhibido una respuesta inadecuada a uno o más inhibidores anti-factor de necrosis tumoral (TNF por sus siglas en inglés); (b) el sujeto recibió por lo menos un curso previo de tratamiento con un anticuerpo CD20, y (c) el tratamiento comprende administrar por lo menos un curso adicional de tratamiento con un anticuerpo CD20.

105. El método de la reivindicación 104, en el cual el sujeto respondió a por lo menos un primer curso de tratamiento con anticuerpo anti-CD20.

106. El método de la reivindicación 104, en el cual el daño en la articulación es causado por artritis.

107. El método de la reivindicación 106, en el cual la artritis es artritis reumatoide.

108. El método de la reivindicación 104, en el cual el anticuerpo es rituximab.

109. El método de la reivindicación 104, en el cual el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:2 y 8.

110. El método de la reivindicación 104, en el cual el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:39 y 40.

111. El método de la reivindicación 104, en el cual el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende las secuencias de dominio variable en SEQ ID NOS:32 y 33.

112. El método de la reivindicación 104, en el cual el anticuerpo es 2H7 humanizado que comprende un dominio de cadena pesada variable con alteración N100A, o D56A y N100A, o D56A,

N100Y y. S100aR en SEQ ID NO:8 y un dominio de cadena liviana variable con alteración M32L, o S92A, o M32L y S92A en SEQ ID NO:2.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Mark Totoritis

<120> MÉTODO PARA TRATAR DAÑOS EN LAS ARTICULACIONES

<130> 39766-0192

<140> Aún no asignado

<141> Con la presente

<150> 60/737,291

<151> 2005-11-15

<150> 60/864,463

<151> 2006-11-06

<160> 43

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

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

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio variable de cadena liviana de 2H7 humanizado

<400> 2

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
			20					25					30		
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro	Leu	Ile	Tyr
		35					40					45			
Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 3
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> 2H7 CDR1

<400> 4
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> 2H7 CRD2

<400> 5
Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 2H7 CDR3

<400> 6

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

<210> 8

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio variable de cadena pesada de 2H7 humanizado

<400> 8

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

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso humano del subgrupo III

<400> 9

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

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada CDR1

<400> 10

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Met	His	
1				5					10	

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada CDR2

<400> 11

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

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada CDR3

<400> 12

Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	
1				5					10				

274

<210> 13
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de cadena liviana de 2H7 humanizado

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

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

<220>
 <223> Secuencia de cadena pesada de 2H7 humanizado

<400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 275

Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115					120					125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
	130					135					140				
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155				160	
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
			165					170						175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
		180						185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
	195						200					205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
	210					215					220				
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230					235				240	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
			245					250						255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
		260						265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
	275						280					285			
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
	290					295					300				
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
305					310					315				320	
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
			325					330					335		
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
	340						345						350		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
	355					360						365			
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
	370					375				380					
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
385					390					395				400	
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr
			405					410					415		
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
		420					425						430		
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
	435					440						445			
Ser	Pro	Gly	Lys												
	450														

<210> 15

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio variable de cadena pesada de 2H7 humanizado

<400> 15

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

Ala	Pro	Cys	Leu	Pro	Gly	Cys	Arg	His	Ser	Gln	His	Asp	Asp	Asn	Gly
145					150					155					160
Met	Asn	Leu	Arg	Asn	Ile	Ile	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Leu	Ile	Ala	Asp
				165					170						175
Ser	Asp	Thr	Pro	Thr	Ile	Arg	Lys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Phe	Val	Pro	Trp
			180					185					190		
Leu	Leu	Ser	Phe	Lys	Arg	Gly	Asn	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Glu	Asn	Lys
		195					200					205			
Ile	Val	Val	Arg	Gln	Thr	Gly	Tyr	Phe	Phe	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu
	210					215					220				
Tyr	Thr	Asp	Pro	Ile	Phe	Ala	Met	Gly	His	Val	Ile	Gln	Arg	Lys	Lys
225					230					235					240
Val	His	Val	Phe	Gly	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Val	Thr	Leu	Phe	Arg	Cys
				245					250					255	
Ile	Gln	Asn	Met	Pro	Lys	Thr	Leu	Pro	Asn	Asn	Ser	Cys	Tyr	Ser	Ala
			260					265					270		
Gly	Ile	Ala	Arg	Leu	Glu	Glu	Gly	Asp	Glu	Ile	Gln	Leu	Ala	Ile	Pro
		275					280					285			
Arg	Glu	Asn	Ala	Gln	Ile	Ser	Arg	Asn	Gly	Asp	Asp	Thr	Phe	Phe	Gly
	290					295					300				
Ala	Leu	Lys	Leu	Leu											
305															

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Antagonista de BAFF

<220>

<221> VARIANTE

<222> 1

<223> X puede ser cualquier aminoácido excepto cisteína

<220>

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> X puede ser cualquier aminoácido excepto cisteína

<220>

<221> VARIANTE

<222> 5

<223> X puede ser cualquier aminoácido excepto cisteína

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)...(12)

<223> X puede ser cualquier aminoácido excepto cisteína

<220>

<221> VARIANTE

<222> 14, 15

<223> X puede ser cualquier aminoácido excepto cisteína

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)...(16)

<223> X puede ser L, F, I o V

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (17)...(17)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido excepto cisteína

 <400> 18
 Xaa Cys Xaa Asp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa

 <210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de Fórmula 1

 <400> 19
 Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Ala Trp Val Pro Cys Ser Val Leu
 1 5 10 15
 Lys

 <210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de Fórmula 1

 <400> 20
 Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Trp Val Pro Cys Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Arg

 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de Fórmula 1

 <400> 21
 Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Arg Trp Val Pro Cys Glu Met Leu
 1 5 10 15
 Gly

 <210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de Fórmula 1

 <400> 22
 Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Ser Trp Val Pro Cys His Met Leu
 1 5 10 15
 Arg

 <210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de Fórmula 1

 <400> 23
 Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Trp Val Ala Cys Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Arg

 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de Fórmula 1

 <400> 24
 Gln Cys Phe Asp Arg Leu Asn Ala Trp Val Pro Cys Ser Val Leu Lys
 1 5 10 15

 <210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Fórmula II de antagonista de BAFF

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(1)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido excepto cisteína

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)...(3)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido excepto cisteína

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)...(5)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido excepto cisteína

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)...(9)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido excepto cisteína

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(15)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido excepto cisteína

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (17)...(17)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido excepto cisteína

<400> 25
 Xaa Cys Xaa Asp Xaa Leu Val Xaa Xaa Trp Val Pro Cys Xaa Xaa Leu
 1 5 10 15
 Xaa

<210> 26
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15
 Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
 20 25 30
 Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala
 35 40 45
 Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly
 50 55 60
 Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly
 65 70 75 80
 Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu Val
 85 90 95
 Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser
 100 105 110
 Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp
 115 120 125
 Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala
 130 135 140
 Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His Ser
 145 150 155 160
 Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr
 165 170 175
 Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
 180

<210> 27
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Mini-BR3

<400> 27
 Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
 1 5 10 15
 Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg
 20 25

<210> 28
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región de cadena liviana de Hu2H7.v138

<400> 28
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ala Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 29
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región de cadena pesada de hu2H7.v138

<400> 29
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp
		100						105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
	115						120					125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
	130					135					140				
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150				155						160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
			165						170					175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
		180						185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
	195						200					205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
	210					215					220				
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230				235						240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
			245						250					255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
			260					265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
	275						280					285			
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ala	Thr
	290					295					300				
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
305					310				315						320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
			325						330					335	
Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
		340						345					350		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
	355						360					365			
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
	370					375					380				
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
385					390				395						400
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr
			405						410					415	
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
			420					425					430		
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
	435					440						445			
Ser	Pro	Gly	Lys												
	450														

<210> 30

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de cadena liviana de 2H7 humanizado

```

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

```

```

<210> 31
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

```

```

<220>
<223> Región de cadena pesada de 2H7.V511

```

```

<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20      25      30
Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100      105      110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115      120      125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130      135      140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145      150      155      160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165      170      175
285

```

Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
			180					185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
		195					200					205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
	210					215					220				
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245				250						255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
			260					265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
	275						280					285			
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ala	Thr
	290					295					300				
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
305					310					315					320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
				325				330						335	
Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
			340					345					350		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
	355						360					365			
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
	370					375					380				
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
385					390					395					400
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr
				405				410						415	
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
			420					425					430		
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
	435					440						445			
Ser	Pro	Gly	Lys												
	450														

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena liviana de anticuerpo 2H7 humanizado

<400> 32

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

<210> 33
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo 2H7 humanizado

<400> 33
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 34
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Dominio variable de cadena pesada de 2H7 humanizado

<400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

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

<210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> 2H7 CDR1

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400>	35								
Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Xaa	His
1				5					10

<210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> 2H7 CDR3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400>	36							
Gln	Gln	Trp	Xaa	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr
1				5				

<210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> 2H7 CDR2

<220>
<221> VARIANTE
<222> 8
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 37
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Xaa Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 38
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> 2H7 CDR3

<220>
<221> VARIANTE
<222> 6, 7
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 38
Val Val Tyr Tyr Ser Xaa Xaa Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 39
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Dominio variable de cadena liviana de 2H7 humanizado

<400> 39
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
35 40 45
Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ala Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 40
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Dominio variable de cadena pesada de 2H7 humanizado

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

<210> 41
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Dominio variable de cadena pesada de 2H7 humanizado

<400> 41
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

424

Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
	195						200					205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
	210					215					220				
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250					255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
		260						265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
	275						280					285			
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ala	Thr
	290					295					300				
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
305					310					315					320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
				325					330					335	
Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
			340					345					350		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
	355						360					365			
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
	370					375					380				
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
385					390					395					400
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr
			405						410					415	
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
			420					425					430		
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
	435					440						445			
Ser	Pro	Gly													
	450														

<210> 42

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio variable de cadena pesada de 2H7 humanizado

<400> 42

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
		20						25					30		
Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp
		100					105						110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115				120						125			

Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
130						135					140				
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155					160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
			165						170					175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
		180						185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
	195						200					205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
	210					215					220				
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250					255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
			260					265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
	275						280					285			
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ala	Thr
	290					295					300				
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
305					310					315					320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
				325					330					335	
Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
			340					345					350		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
	355						360					365			
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
	370					375					380				
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
385					390					395					400
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr
				405					410					415	
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
			420					425					430		
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
	435					440						445			
Ser	Pro	Gly													
	450														

<210> 43

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio variable de cadena pesada de 2H7 humanizado

<400> 43

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25				30			
Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35					40					45				
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	100	105	110	
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	115	120	125	
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	130	135	140	
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	145	150	155	160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	165	170	175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	180	185	190	
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	195	200	205	
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	210	215	220	
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	225	230	235	240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	245	250	255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	260	265	270	
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	275	280	285	
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ala	Thr	290	295	300	
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	305	310	315	320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	325	330	335	
Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	340	345	350	
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	355	360	365	
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	370	375	380	
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	385	390	395	400
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	405	410	415	
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	420	425	430	
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	435	440	445	
Ser	Pro	Gly														450			

Figura 1

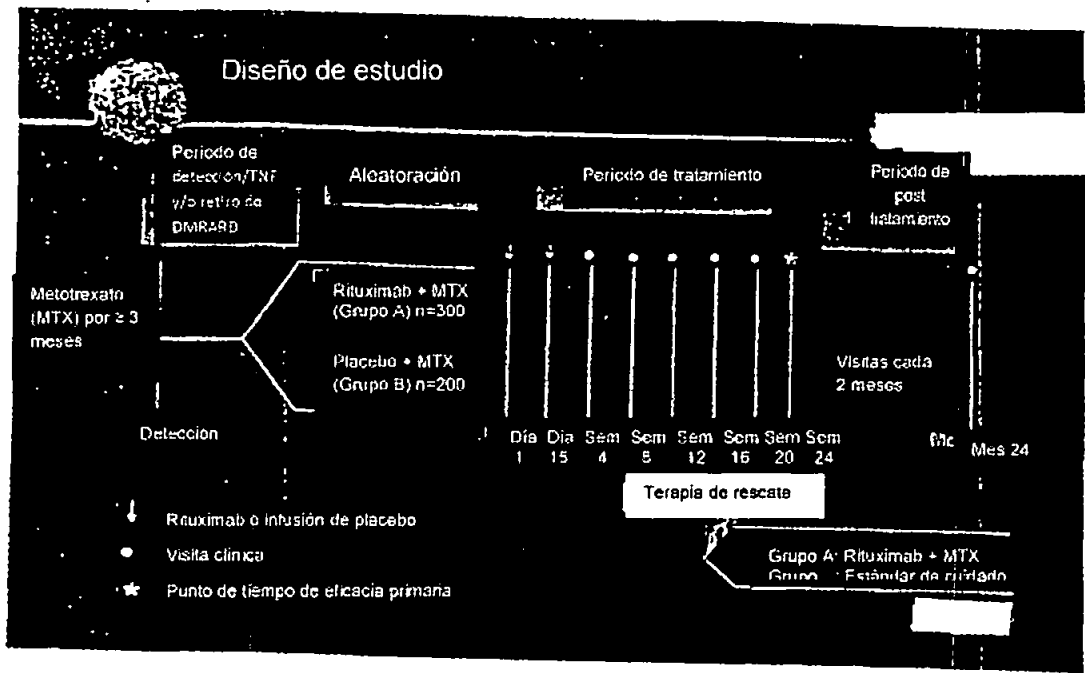


Figura 2

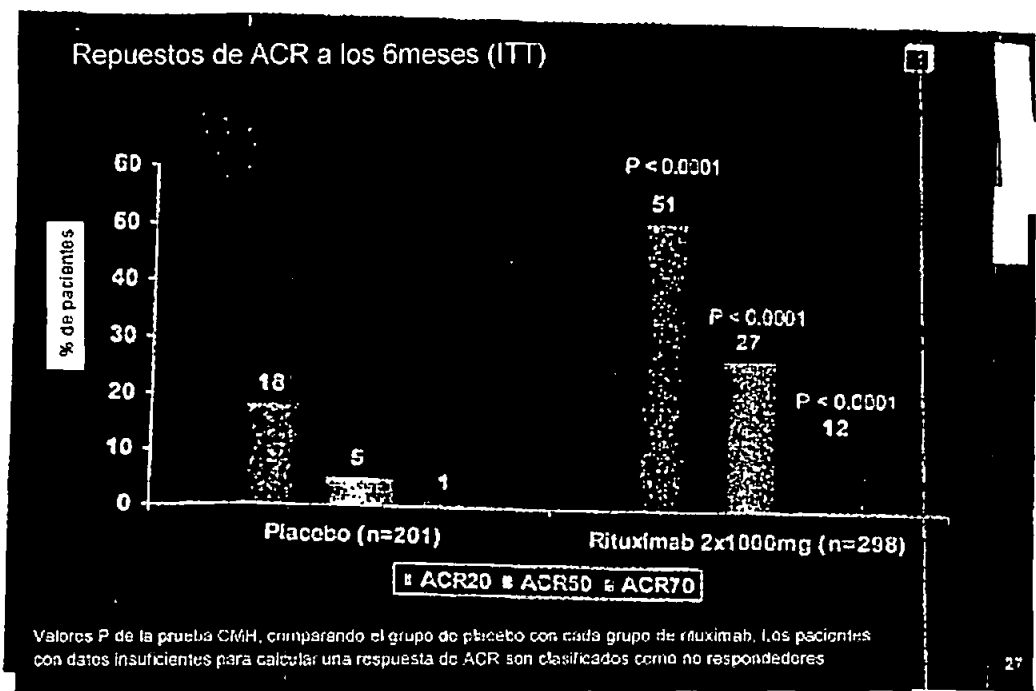
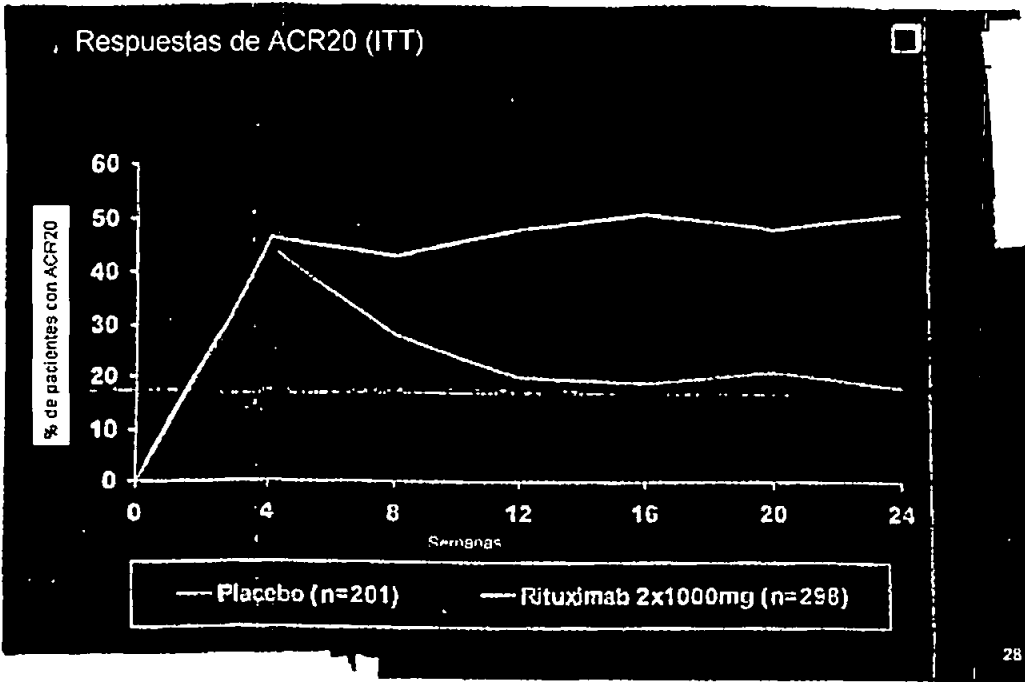


Figura 3



430

Figura 4

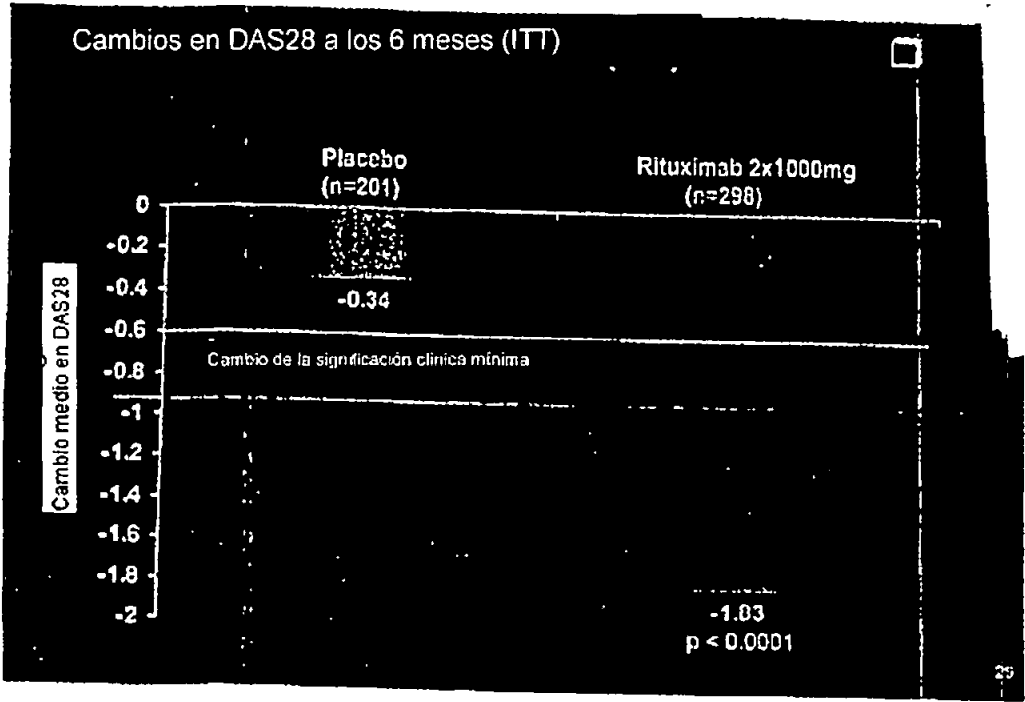


Figura 5

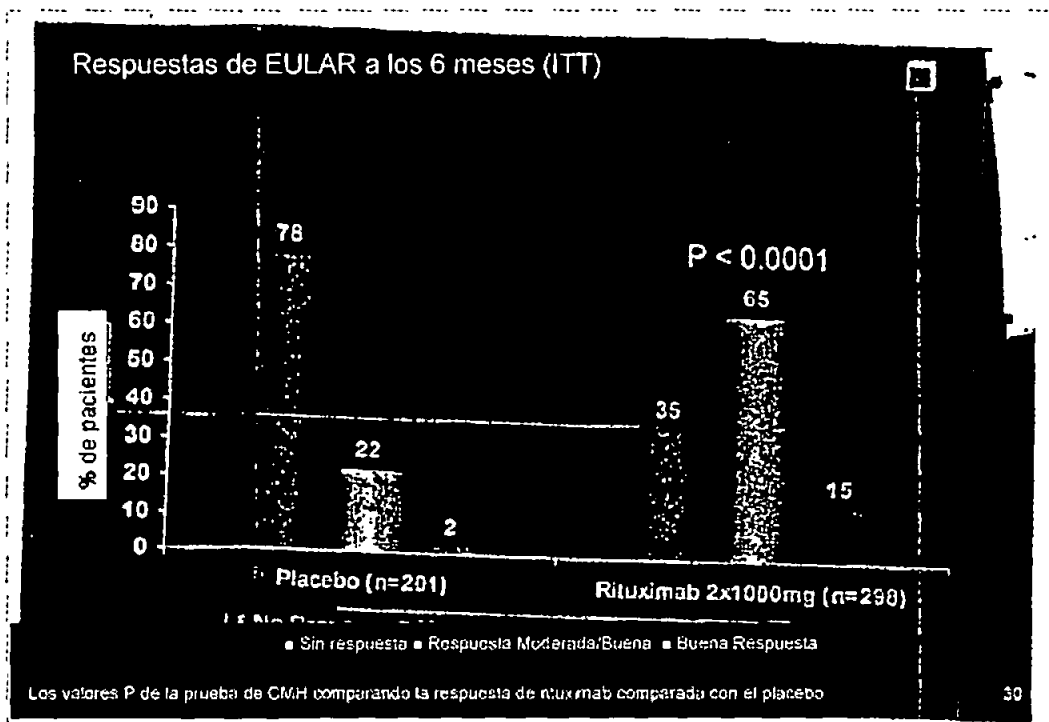


Figura 5

Figura 6

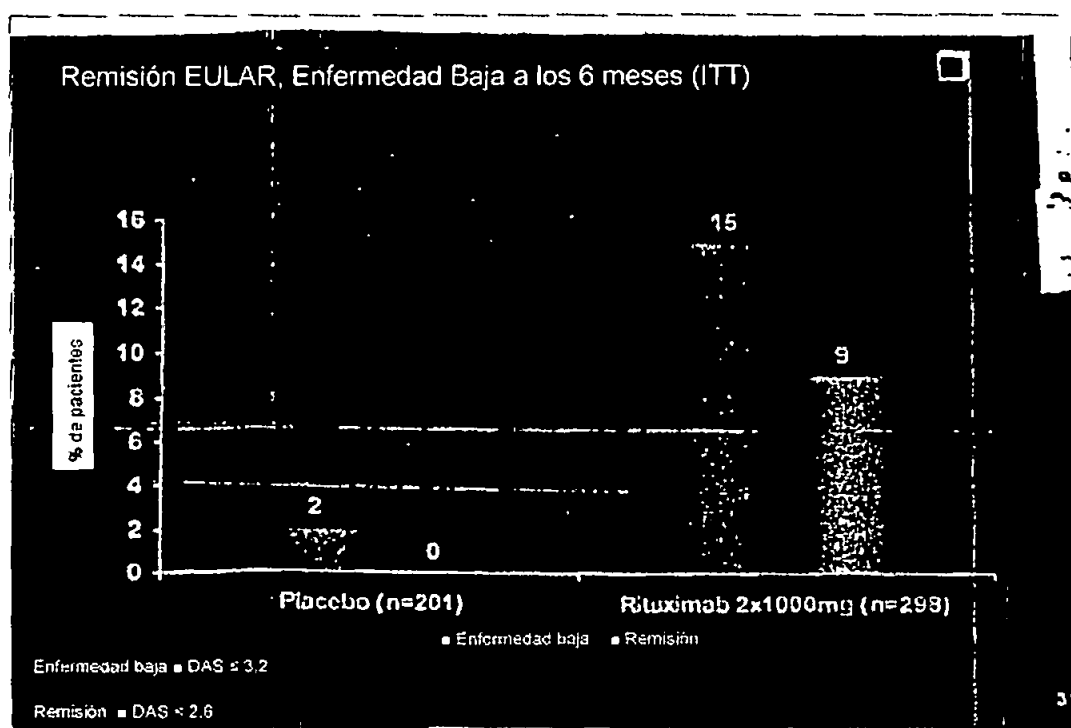
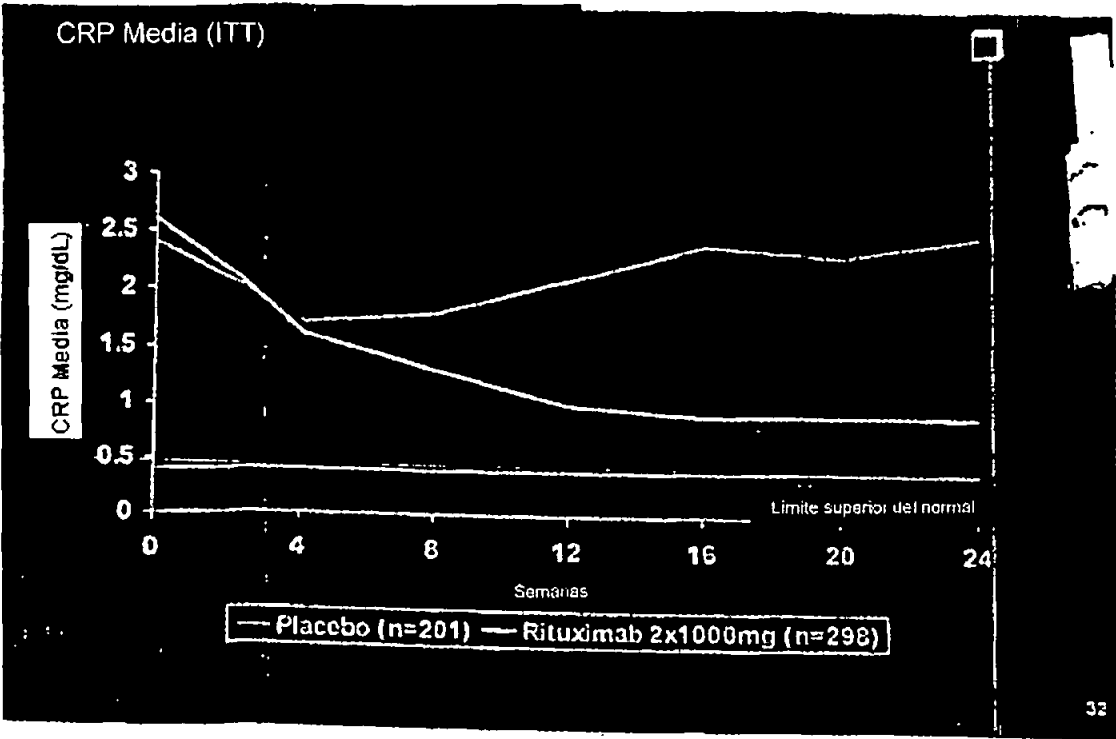


Figura 7



1134

Figura 8

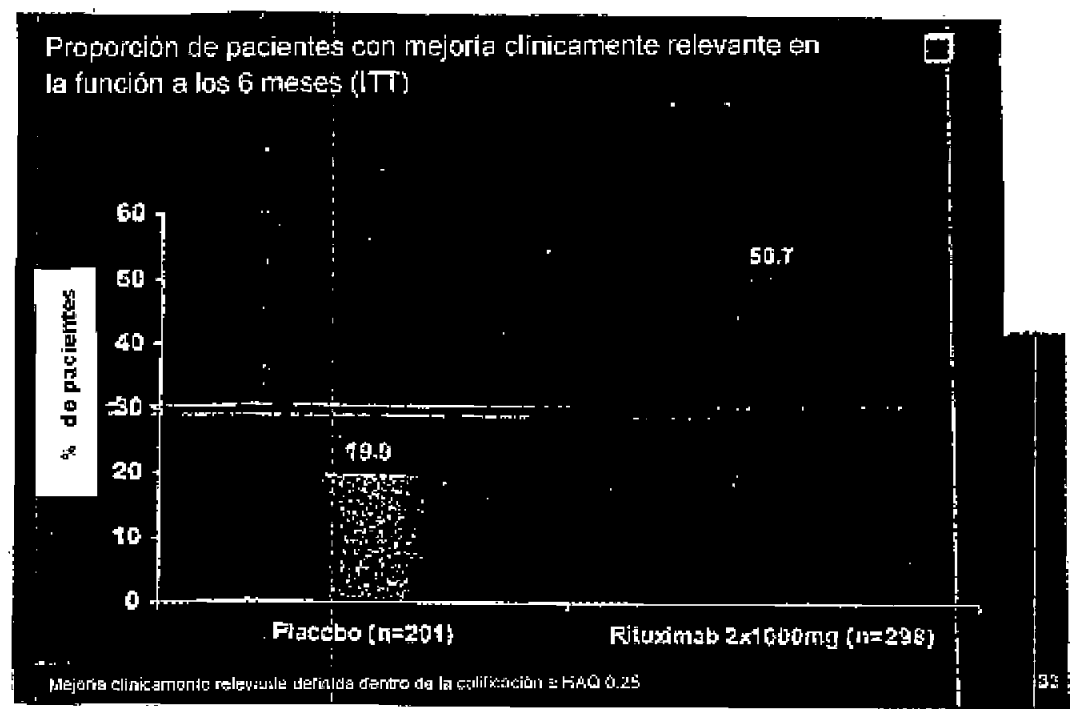


Figura 9

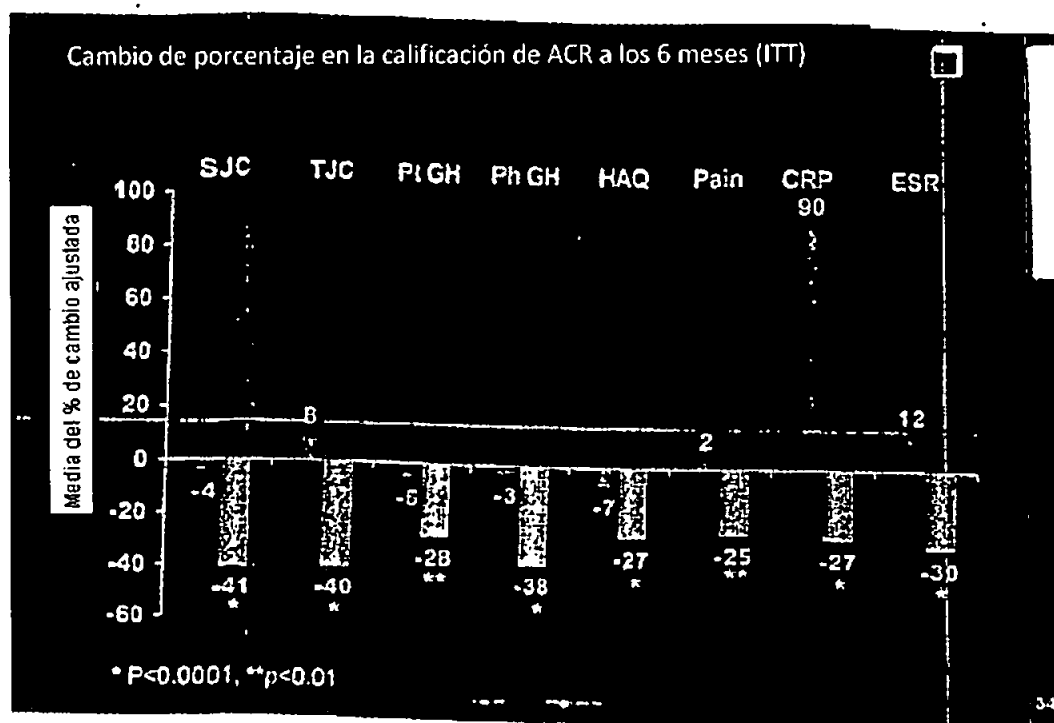


Figura 10

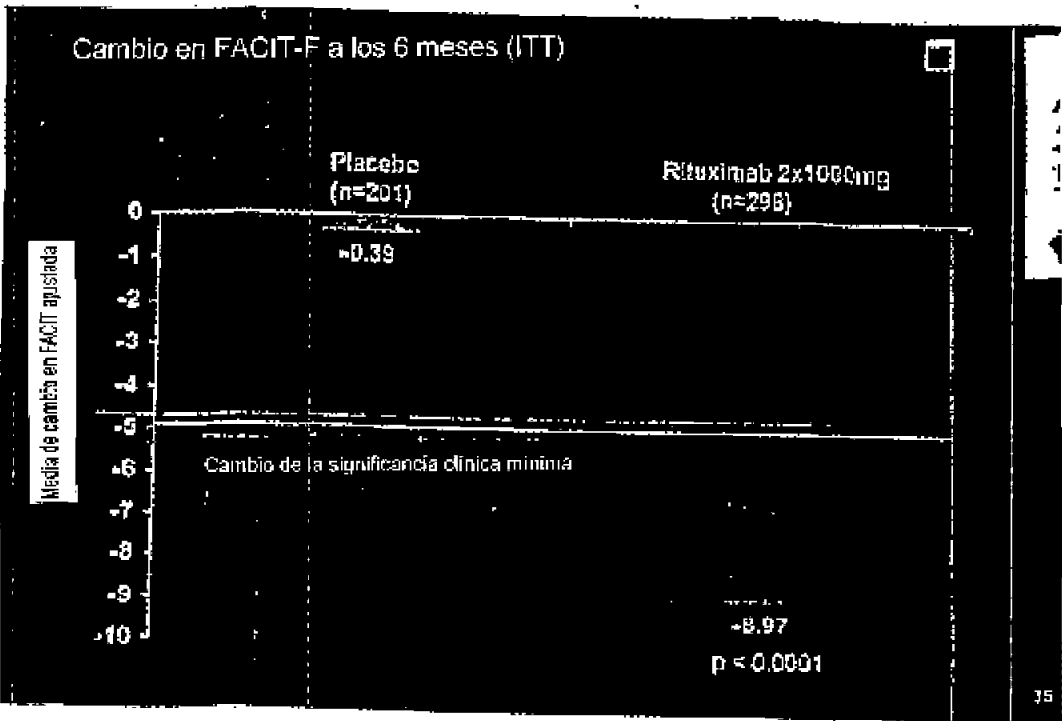


Figura 11

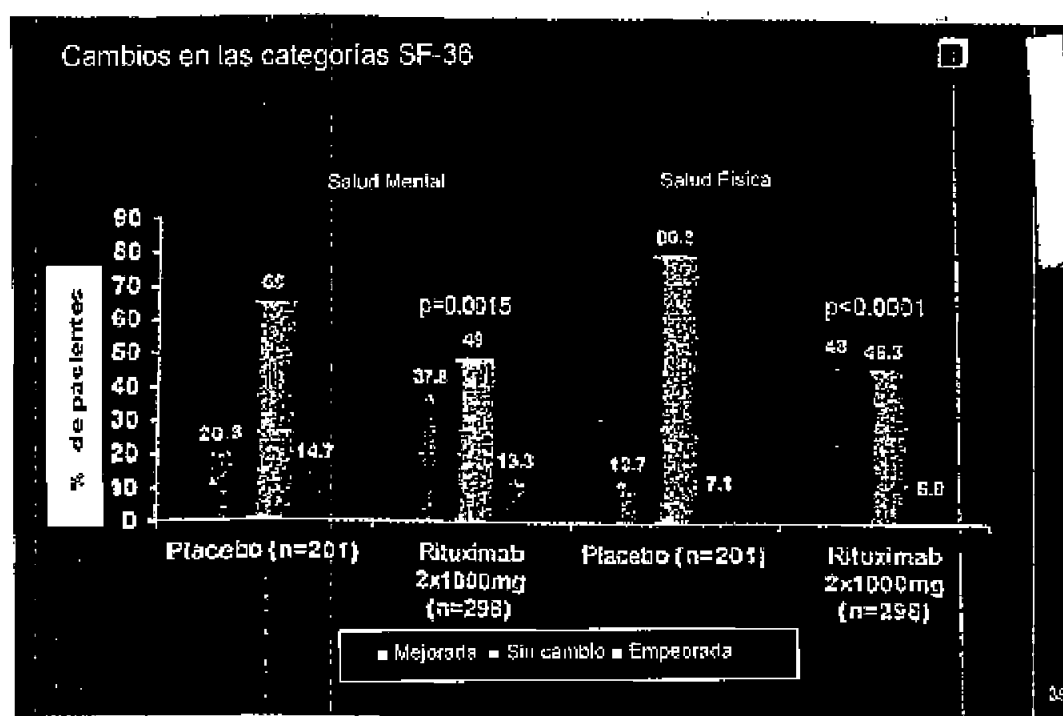


Figura 12

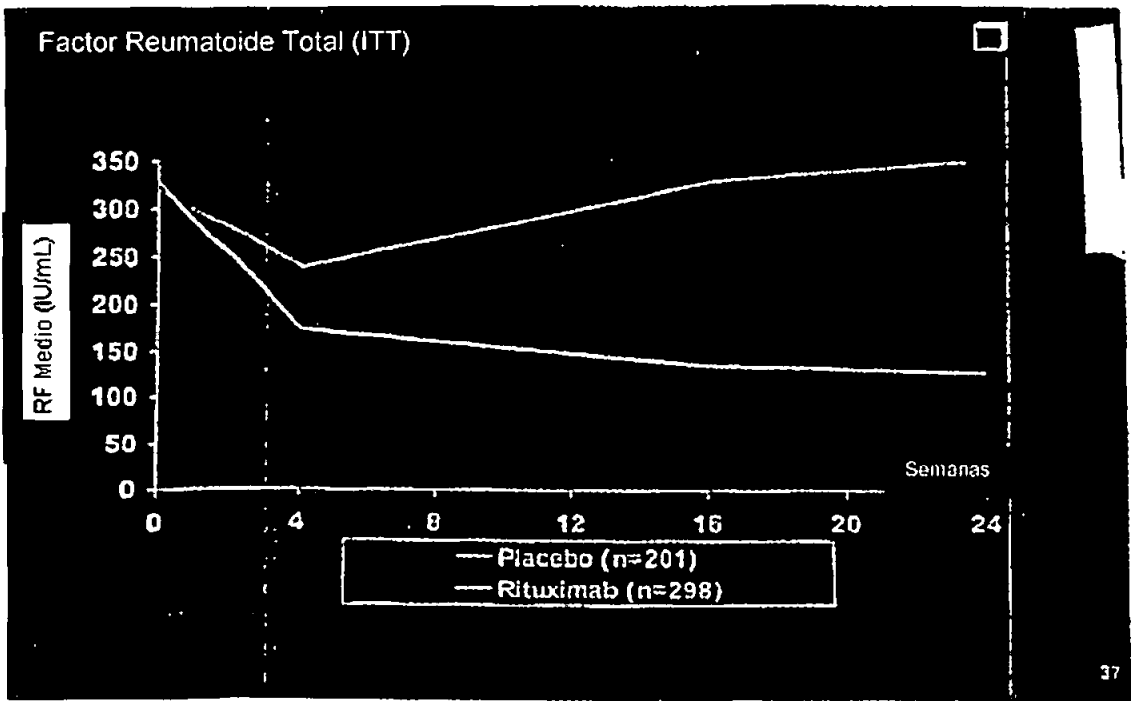


Figura 13

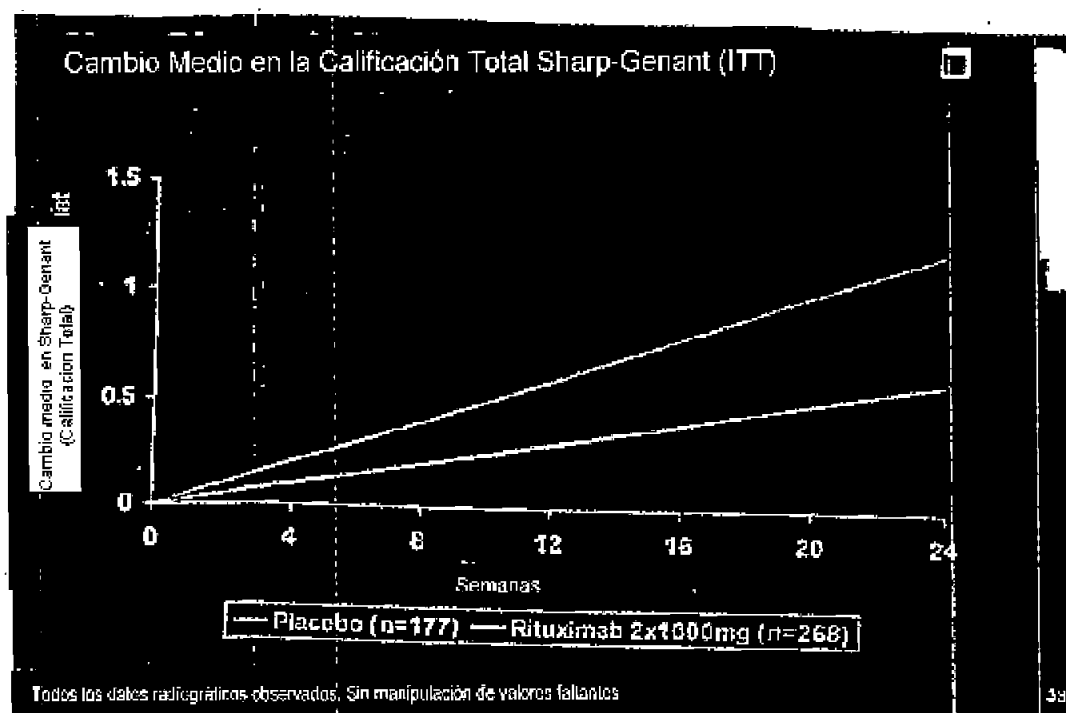


Figura 14

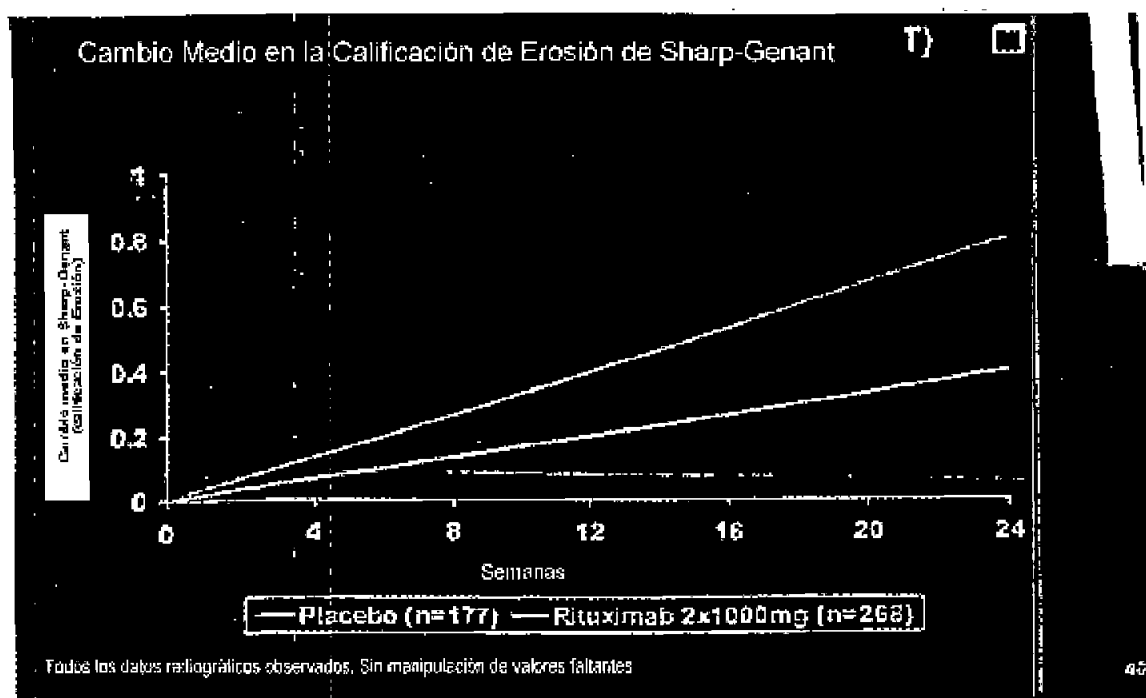


Figura 15

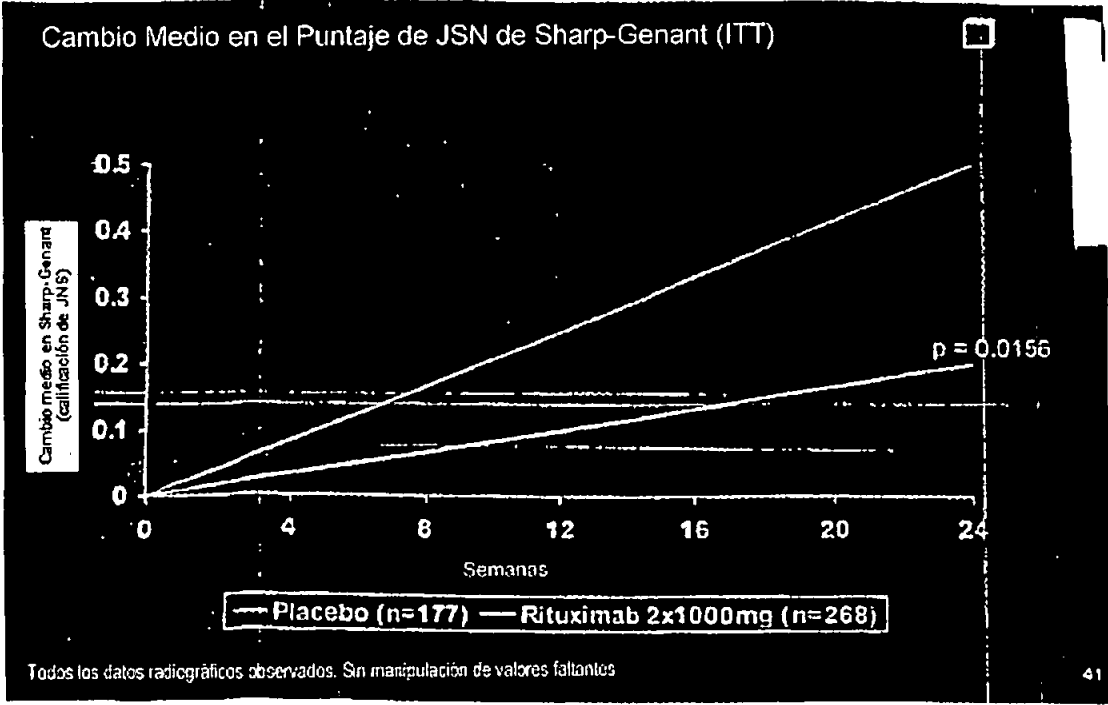


Figura 16

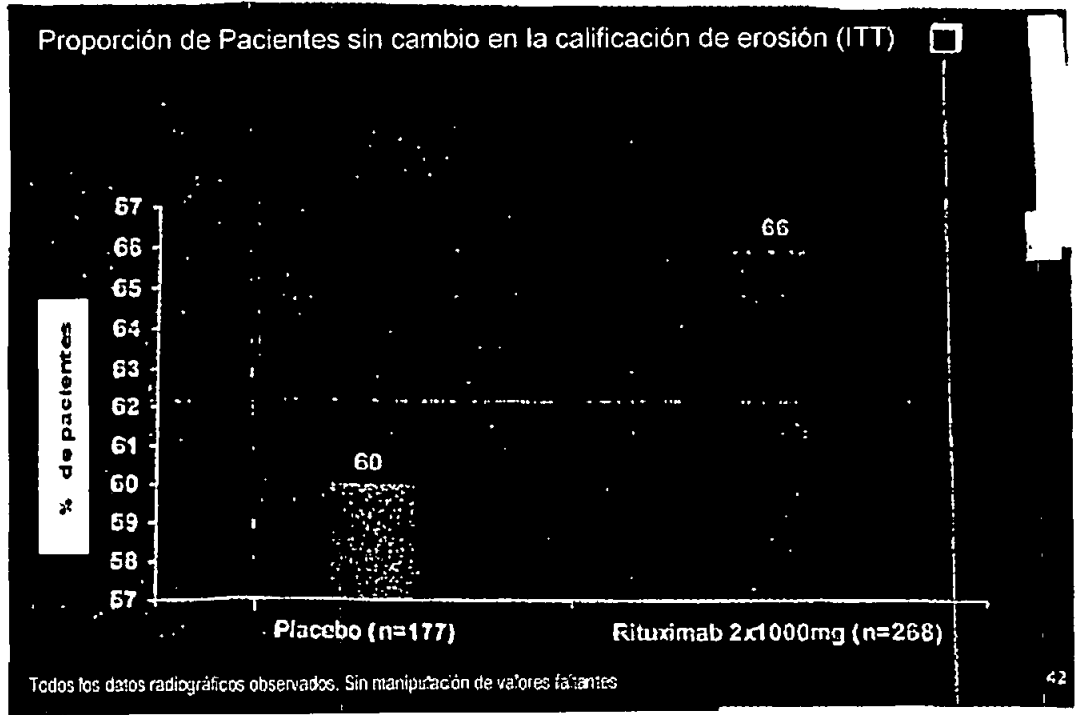


Figura 17

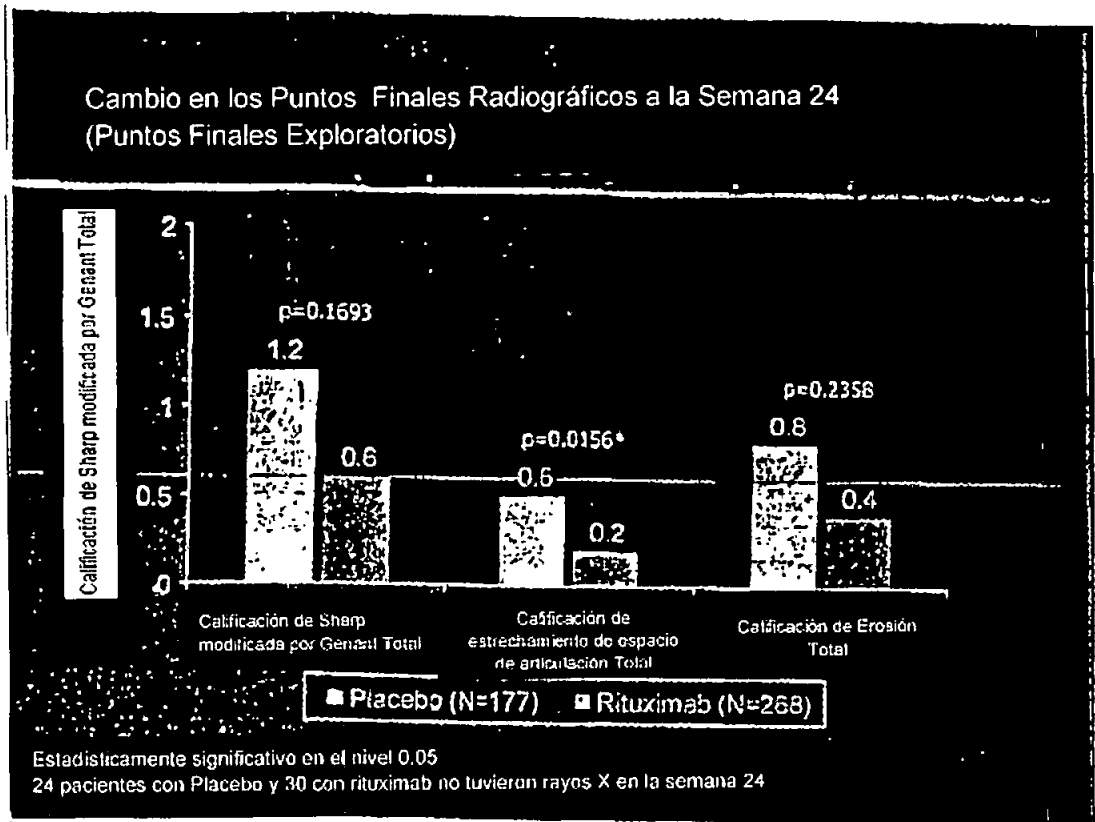


Figura 18

% de Cambio Medio en el Conjunto del Núcleo ACR Parámetros en la Semana 24 (ITT)			
	Placebo (N=201)	Rituximab (N=298)	Valor P
Conteo de articulaciones inflamadas (%)	-3.6	-41.1	<0.0001
Conteo de articulaciones sensibles (%)	8.4	-39.9	<0.0001
Valoración global del paciente (%)	-5.0	-28.4	0.0048
Valoración global del médico	-3.2	-35.4	<0.0001
HAQ (%)	-6.9	-27.0	<0.0001
Dolor (%)	1.7	-25.3	0.0045
CRP (mg/dL - %)	89.7	-27.1	<0.0001
ESR (mm/h - %)	11.7	-29.5	<0.0001

Los porcentajes son ajustados por ANCOVA
Los valores P son de ANCOVA
P values are from ANCOVA

Figura 19

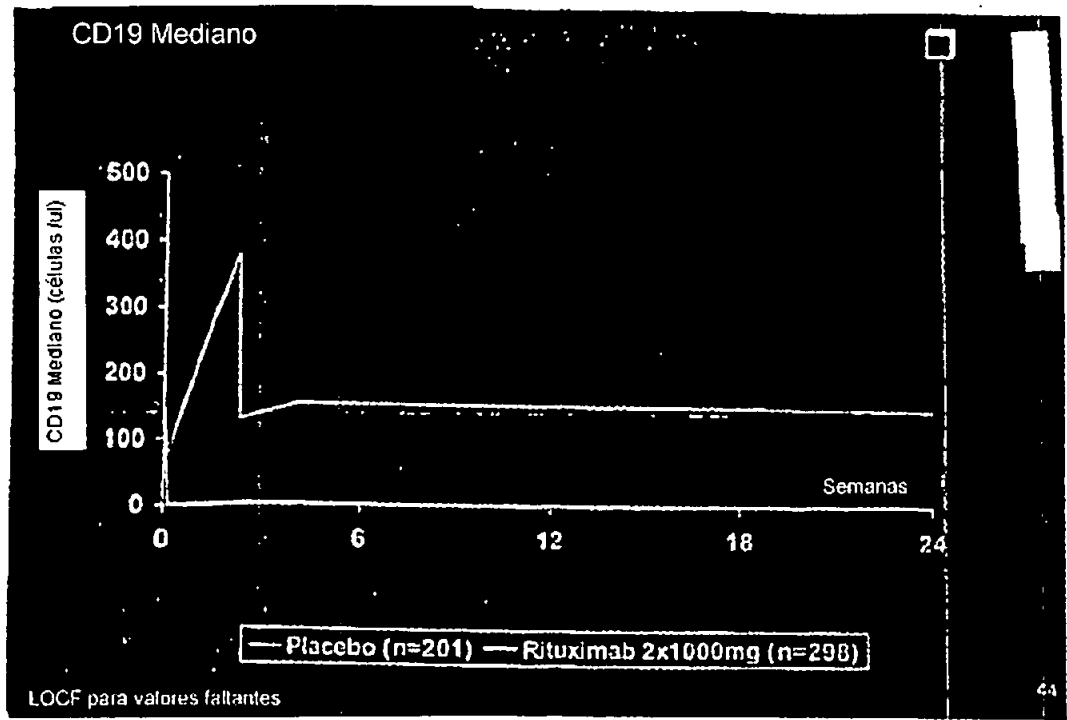


Figura 20

Evento Adverso reportado más comúnmente (Seguridad Pop)		
	Placebo (n=209)	Rituximab 2 x 1000 mg (n=308)
Todos los eventos	183 (88%)	261 (85%)
Artritis reumatoide	87 (42%)	65 (21%)
Dolor de cabeza	19 (9%)	26 (8%)
URTI	14 (7%)	24 (8%)
Nasofaringitis	12 (6%)	23 (7%)
Diarrea	16 (8%)	18 (6%)
Fatiga	12 (6%)	21 (7%)
Hipertensión	11 (5%)	21 (7%)
Artalgia	10 (5%)	17 (6%)
Náusea	5 (2%)	22 (7%)
UTI	16 (8%)	10 (3%)
Número de pacientes (%)		

Figura 21

Evento Adverso que Conduce a Retiro		
	Placebo (n=205)	Rituximab 2 x 1000 mg (n=308)
Todos los eventos	2 (<1%)	8 (3%)
Tos *	-	1 (<1%)
Ronquera *	-	1 (<1%)
Edema laríngeo *	-	1 (<1%)
Urticaria *	-	2 (<1%)
Taponamiento cardíaco	-	1 (<1%)
Reacción anafiláctica *	-	1 (<1%)
Artritis reumatoide	-	1 (<1%)
Cáncer gástrico	1 (<1%)	-
Aborto (espontáneo)	-	1 (<1%)

Número de pacientes (%) *Asociados con Infusión

Figura 22

Evento que ocurre durante/dentro de las 24h de las infusiones					
	Primera Infusión		Segunda Infusión		
	Placebo (n=209)	Rituximab (n=308)	Placebo (n=209)	Rituximab (n=308)	
Todos los eventos	49 (23%)	88 (29%)	29 (14%)	35 (11%)	23
Dolor de cabeza	10 (5%)	15 (5%)	2 (<1%)	3 (<1%)	
Hipertensión	4 (2%)	9 (3%)	4 (2%)	7 (2%)	
Náusea	2 (<1%)	8 (3%)	-	2 (<1%)	
Prurito	2 (<1%)	7 (2%)	-	-	
Urticaria	1 (<1%)	7 (2%)	-	-	
Insomnio	2 (<1%)	6 (2%)	-	-	
Enrojecimiento	2 (<1%)	5 (2%)	1 (<1%)	2 (<1%)	
Direxia	1 (<1%)	5 (2%)	2 (<1%)	-	
Irritación de	-	4 (1%)	-	1 (<1%)	
Garganta	7 (3%)	3 (<1%)	-	2 (<1%)	
Taquicardia					

Número de pacientes (%)

47

Figura 23

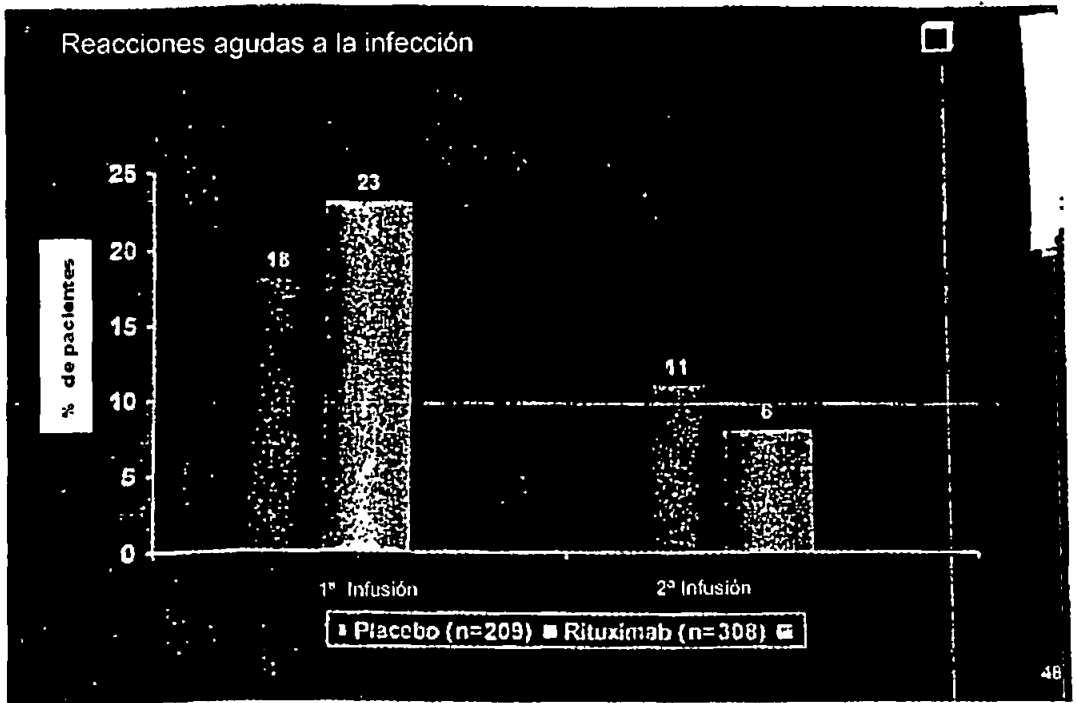


Figura 24

Eventos Adversos Serios que Ocurren durante /dentro de las 24h de la Infusión		
	Placebo (n=209)	Rituximab 2 x 1000 mg (n=308)
Primera Infusión		
Todos los Eventos	1 (<1%)	1 (<1%)
Reacción Anafiláctica	-	1 (<1%)
Diabetes Mellitus	1 (<1%)	-
Segunda Infusión		
Todos los eventos	2 (<1%)	1 (<1%)
Chest Pain	1 (<1%)	-
Dolor de pecho	1 (<1%)	-
Absceso intestinal	-	-
Hipertensión	-	1 (<1%)

Número de pacientes (%)

Figura 25

Clase de órgano en el Sistema (Seguridad Pop.) Infecciones & Infestaciones		
	Placebo (n=209)	Rituximab 2 x 1000 mg (n=308)
Todos los eventos	79 (38%)	127 (41%)
URTI	17 (7%)	24 (8%)
Nasofaringitis	12 (6%)	23 (7%)
UTI	16 (8%)	10 (3%)
Bronquitis	12 (6%)	13 (4%)
Sinusitis	11 (5%)	10 (3%)
Rinitis	4 (2%)	8 (3%)
Herpes simple	6 (3%)	4 (1%)
Influenza	3 (1%)	4 (1%)
Gastroenteritis	2 (<1%)	4 (1%)
Cistitis	1 (<1%)	4 (1%)
Número de pacientes (%)		

Figura 26

Infecciones Serias		
	Placebo (n=209)	Rituximab 2 x 1000 mg (n=308)
Todos los eventos	2 (<1%)	6 (2%)
Absceso intestinal	1 (<1%)	-
Celulitis gangrenosa	-	1 (<1%)
Infección de línea Central	1 (<1%)	-
Gastroenteritis	-	1 (<1%)
Hepatitis B (de novo)	-	1 (<1%)
Infección	-	1 (<1%)
Influenza	-	1 (<1%)
Pielonefritis	-	1 (<1%)
Zoonosis	-	1 (<1%)
Número de pacientes (%)		

Figura 27

Tasa de Infección		
	Placebo (n=209)	Rituximab 2 x 1000 mg (n=308)
	Eventos por 100 pacientes año	
Todas las infecciones	155	138
Infecciones clínicamente significativas	3.65	5.2

* Serías y/o aquellas que requieren antibiótico i.v.

Figura 28

HACA (ITT)		
	Placebo (n=201)	Rituximab 2 x 1000 mg (n=298)
Positivo en la semana 24	0/197 (0%)	12/287 (4%)

Figura 29

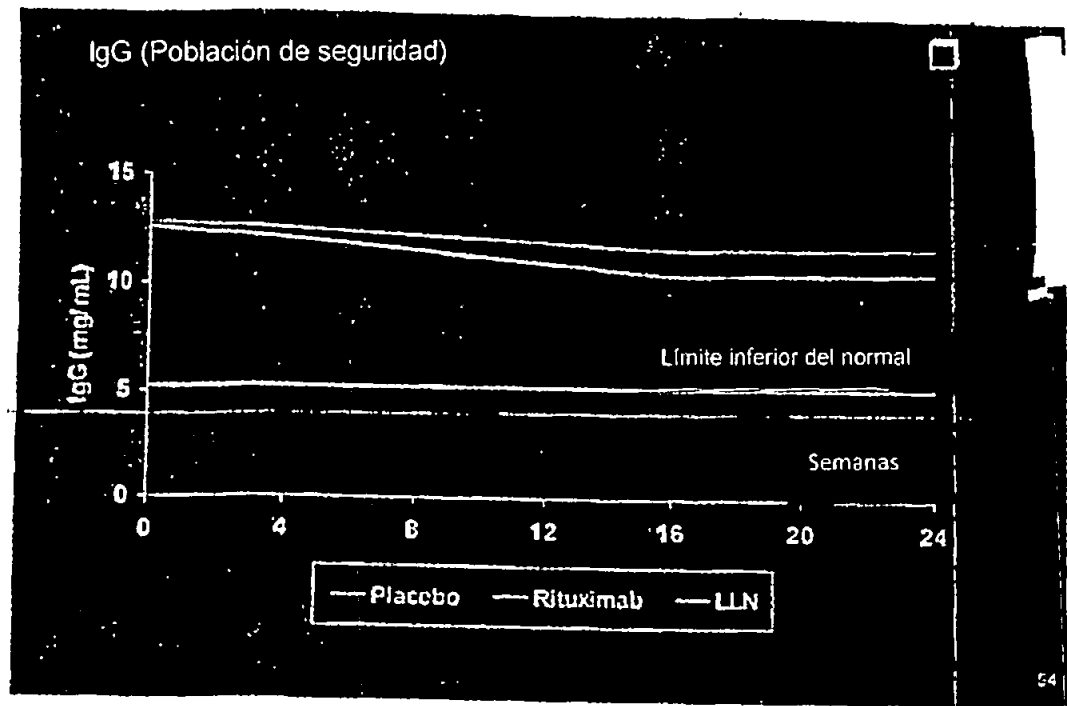


Figura 30

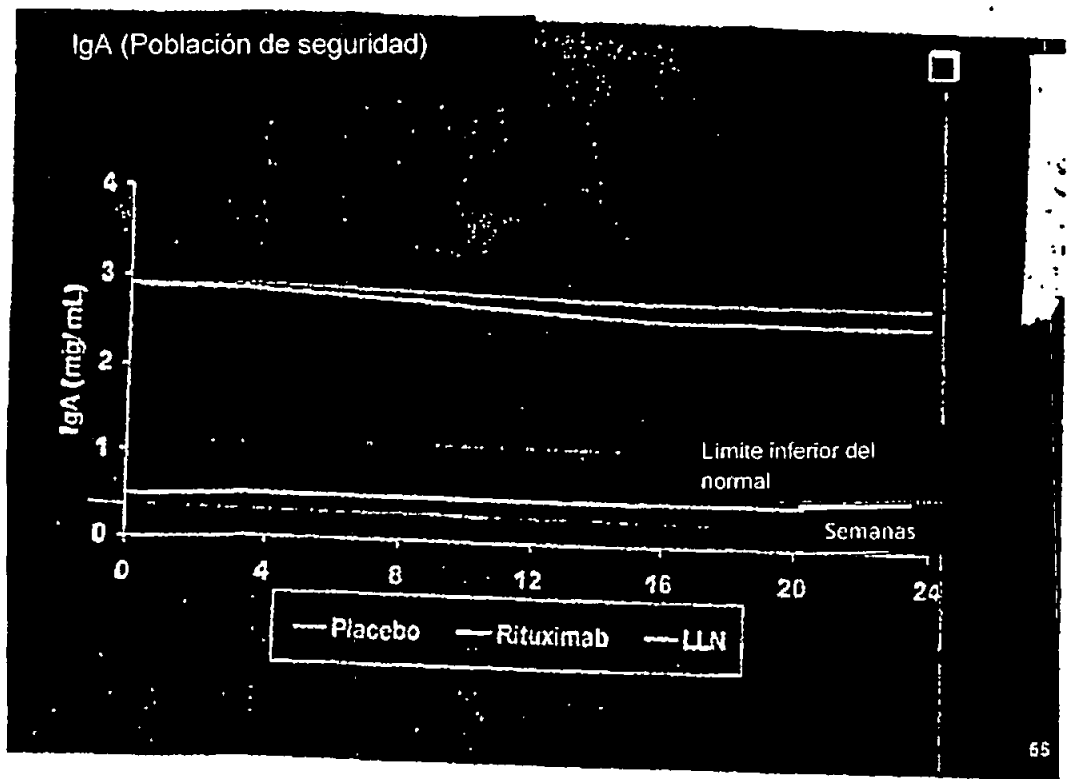


Figura 31

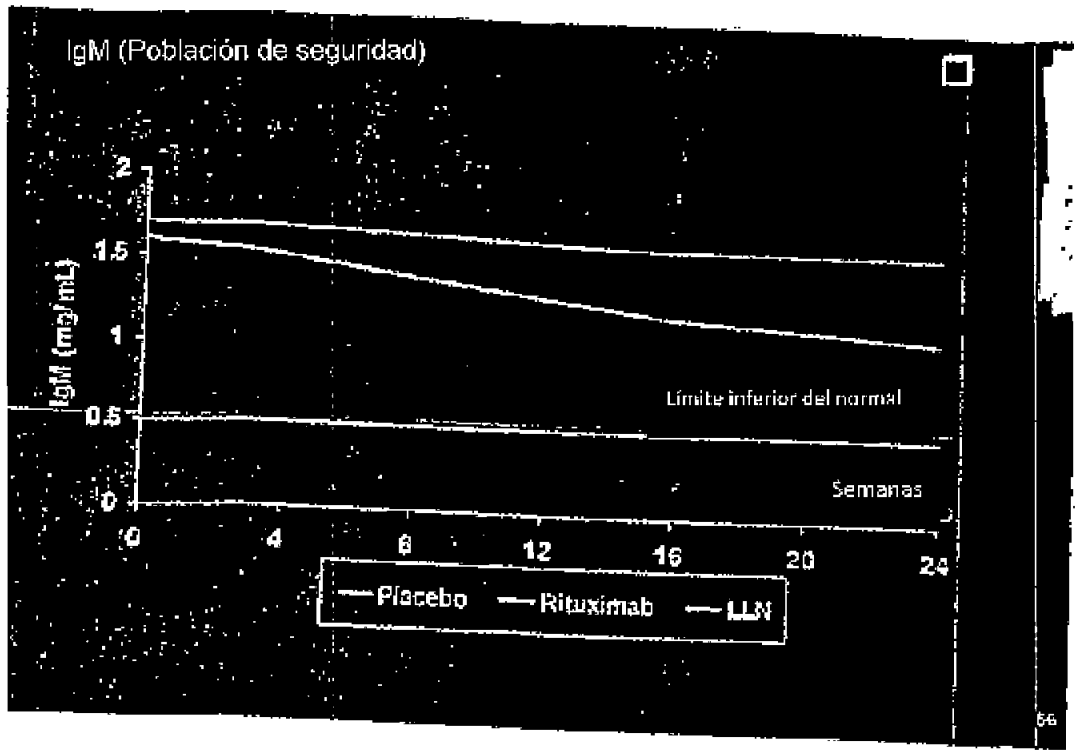


Figura 32 A

	FR1 1020 CDR1 3040
2H7	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC [RASSSVS-YMH] WYQOKP * * * * *
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASSSVS-YMH] WYQOKP * * * * *
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASQISNYLA] WYQOKP * * * * *
	FR2 50 CDR2 60 FR3 7080
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 * * * *

Figura 32 B

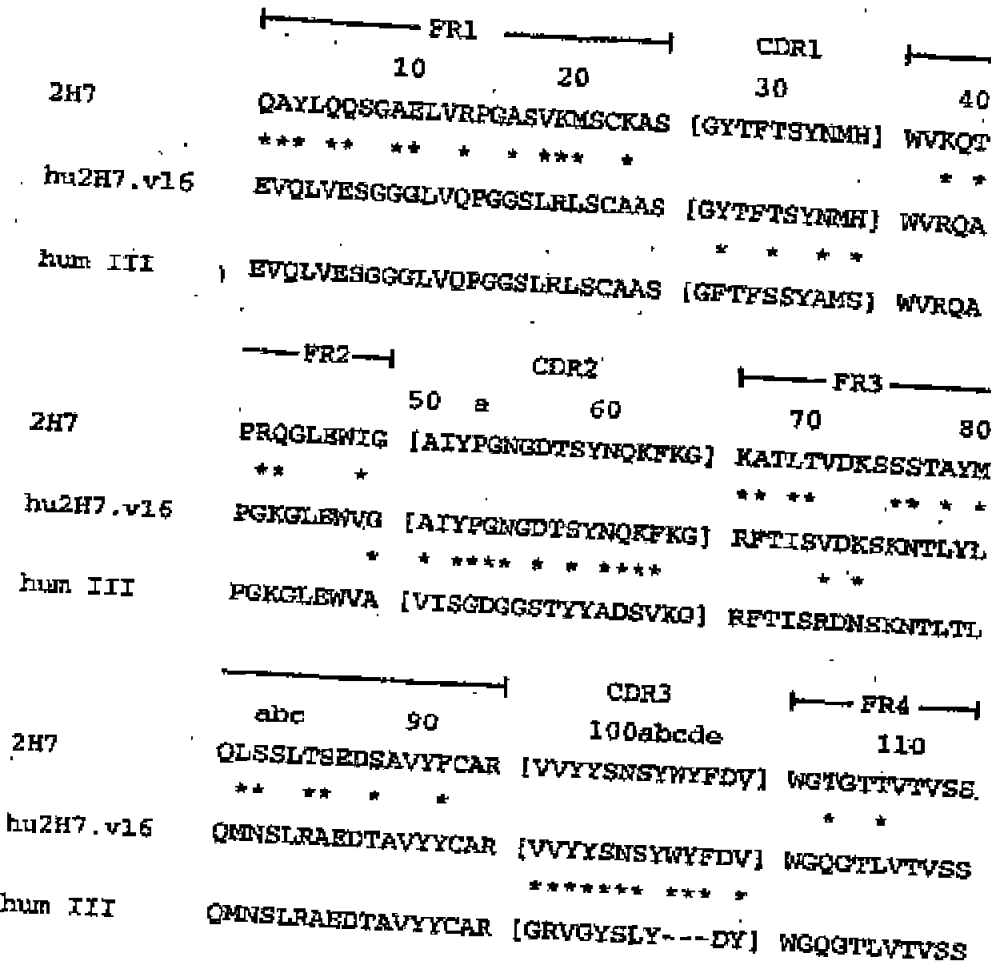


Figura 33

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMEWYQOKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRPSG
SGSGTDPTLTITSSLPEDFATYYCQWSPNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEBQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13)

Figura 34

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTPTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGATYPGNGDTSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWFVDWQGGLTVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCEVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

Figura 35

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNHHWVRQAPGKGLEWVGATYPGNGDTSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFVDVWGQGTLLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGPY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15)

Figura 36

	10	20	30	40	50
hu2H7.v16.liviana	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP				

hu2H7.v138.liviana	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP				
	10	20	30	40	50
	60	70	80	90	100
hu2H7.v16.liviana	SNLASGVPSRPSGSGSGTDFTLTISSLQPEDPATYYCQWSENPPTFGQG				

hu2H7.v138.liviana	SNLASGVPSRPSGSGSGTDFTLTISSLQPEDPATYYCQWSENPPTFGQG				
	60	70	80	90	100
	110	120	130	140	150
hu2H7.v16.liviana	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD				

hu2H7.v138.liviana	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD				
	110	120	130	140	150
	160	170	180	190	200
hu2H7.v16.liviana	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL				

hu2H7.v138.liviana	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL				
	160	170	180	190	200
	210				
hu2H7.v16.liviana	SSPVTKSFNRGEC				

hu2H7.v138.liviana	SSPVTKSFNRGEC				
	210				

Figura 37

hu2H7.v16.Pesada	10	20	30	40	50
hu2H7.v138.Pesada	10	20	30	40	50
hu2H7.v16.Pesada	60	70	80	90	100
hu2H7.v138.Pesada	60	70	80	90	100
hu2H7.v16.Pesada	110	120	130	140	150
hu2H7.v138.Pesada	110	120	130	140	150
hu2H7.v16.Pesada	160	170	180	190	200
hu2H7.v138.Pesada	160	170	180	190	200
hu2H7.v16.Pesada	210	220	230	240	250
hu2H7.v138.Pesada	210	220	230	240	250
hu2H7.v16.Pesada	260	270	280	290	300
hu2H7.v138.Pesada	260	270	280	290	300
hu2H7.v16.Pesada	310	320	330	340	350
hu2H7.v138.Pesada	310	320	330	340	350
hu2H7.v16.Pesada	360	370	380	390	400
hu2H7.v138.Pesada	360	370	380	390	400
hu2H7.v16.Pesada	410	420	430	440	450
hu2H7.v138.Pesada	410	420	430	440	450

Figura 38

hu2H7.v16	1	32
hu2H7.v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP	

	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
hu2H7.v16	52	
hu2H7.v511	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQG	

	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPTFGQG	
hu2H7.v16	102	
hu2H7.v511	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	

	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
hu2H7.v16	152	
hu2H7.v511	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	

	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
hu2H7.v16	202	214
hu2H7.v511	SSPVTKSFNRGEC	

	SSPVTKSFNRGEC	

Figura 39

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	TVSNVSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYS
hu2H7.v511		SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	TVSNVSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYS
hu2H7.v16	182	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPA	
hu2H7.v511		LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPA	
hu2H7.v16	232	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	
hu2H7.v511		PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	
hu2H7.v16	282	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP	
hu2H7.v511		VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAP	
hu2H7.v16	332	IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
hu2H7.v511		IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
hu2H7.v16	382	ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMHEA	
hu2H7.v511		ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMHEA	
hu2H7.v16	432	447	
hu2H7.v511			

Figura 40

Fig. 40A Dominio de cadena liviana variable 2H7.v114 Humanizado

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGS
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR

Fig. 40B Dominio de cadena pesada variable 2H7.v114 Humanizado

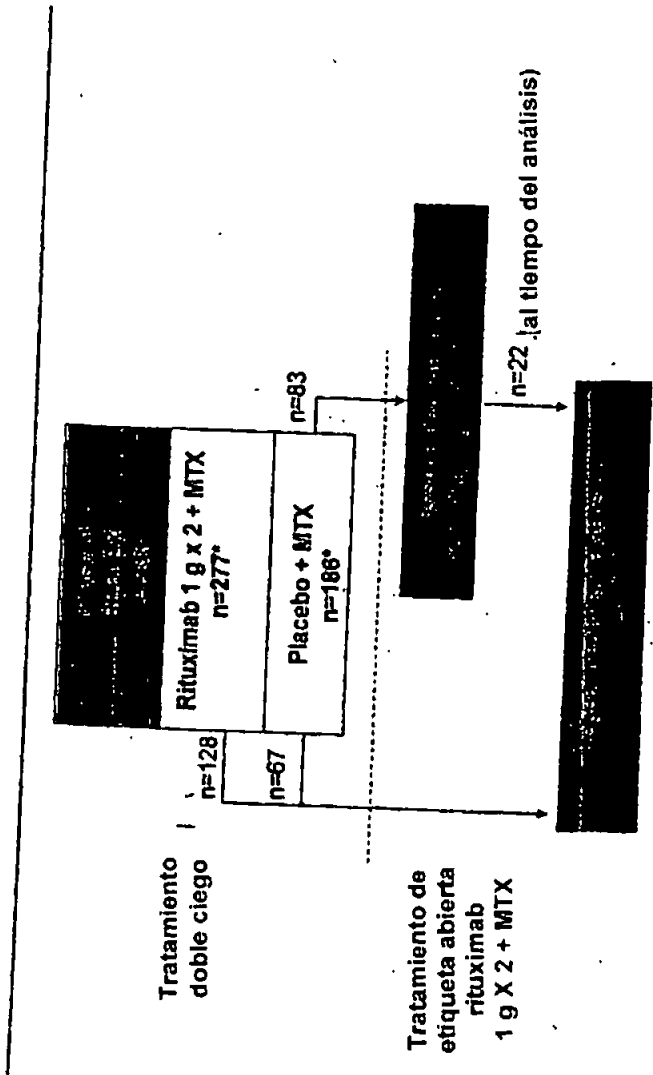
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAITYPGNGATSYN
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSASYWYFDVWGQGLTVTVSS

Fig. 40C Cadena pesada de longitud total 2H7.v114 Humanizado

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAITYPGNG
ATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSASYWYFDVWGQGL
TLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNATYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Figura 41

Disposición del paciente



* Los números representan pacientes con datos radiográficos disponibles a las 56 semanas

Figura 42

Cambio en puntos finales radiográficos en la semana 56

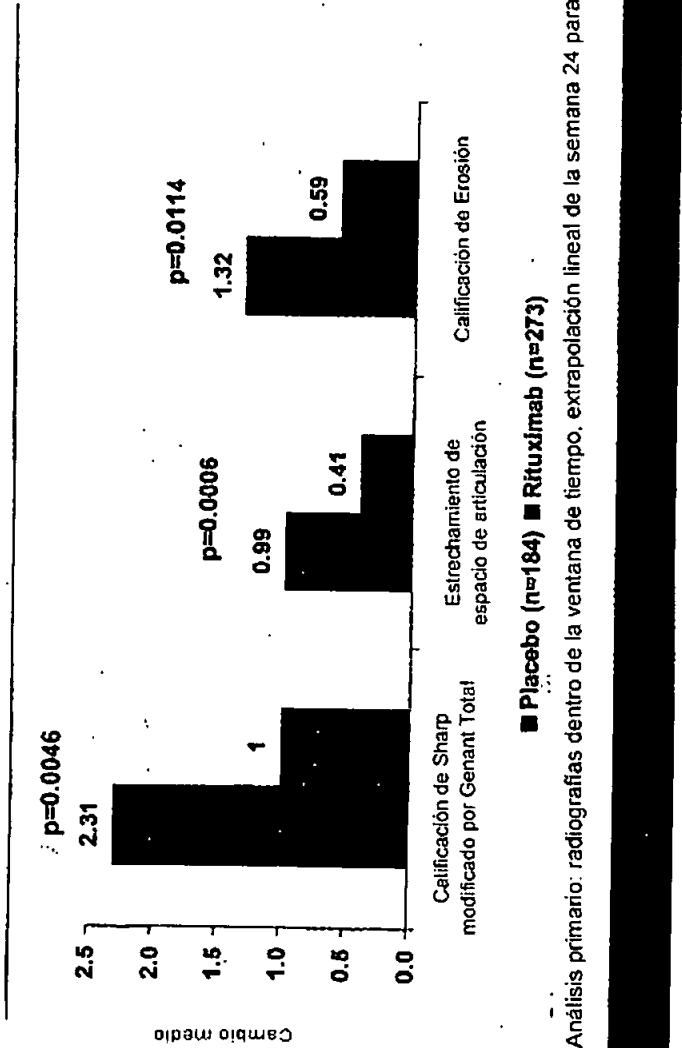


Figura 43

Cambio medio en la calificación Sharp-Genant total en el tiempo

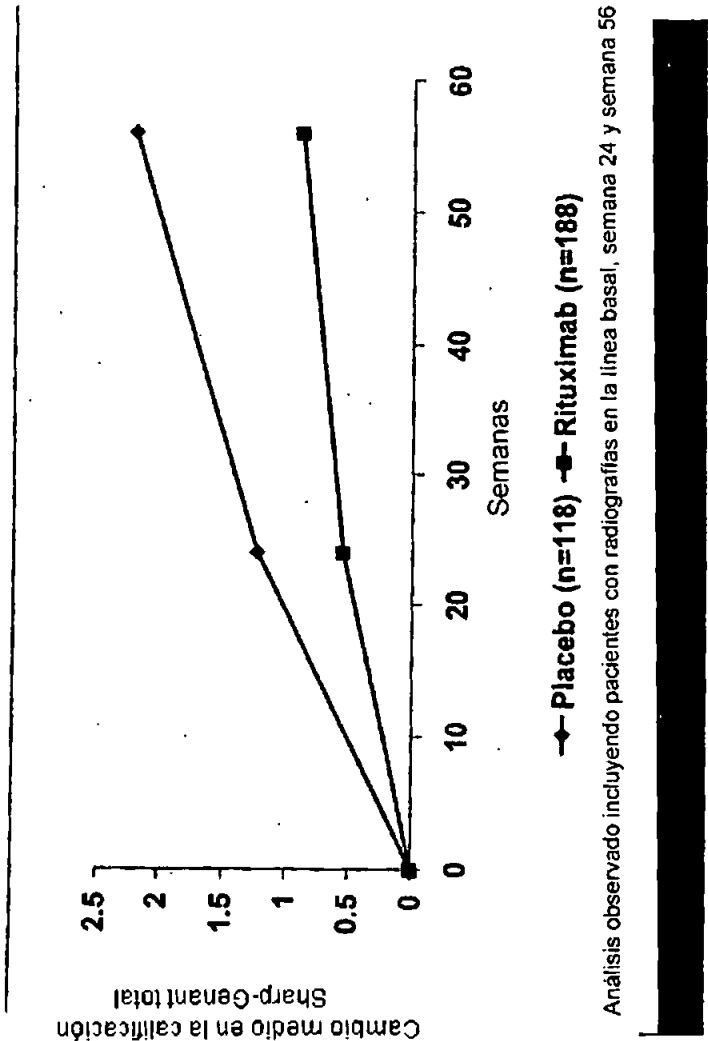


Figura 44

Distribución acumulativa del cambio en la calificación Sharp-Genant total

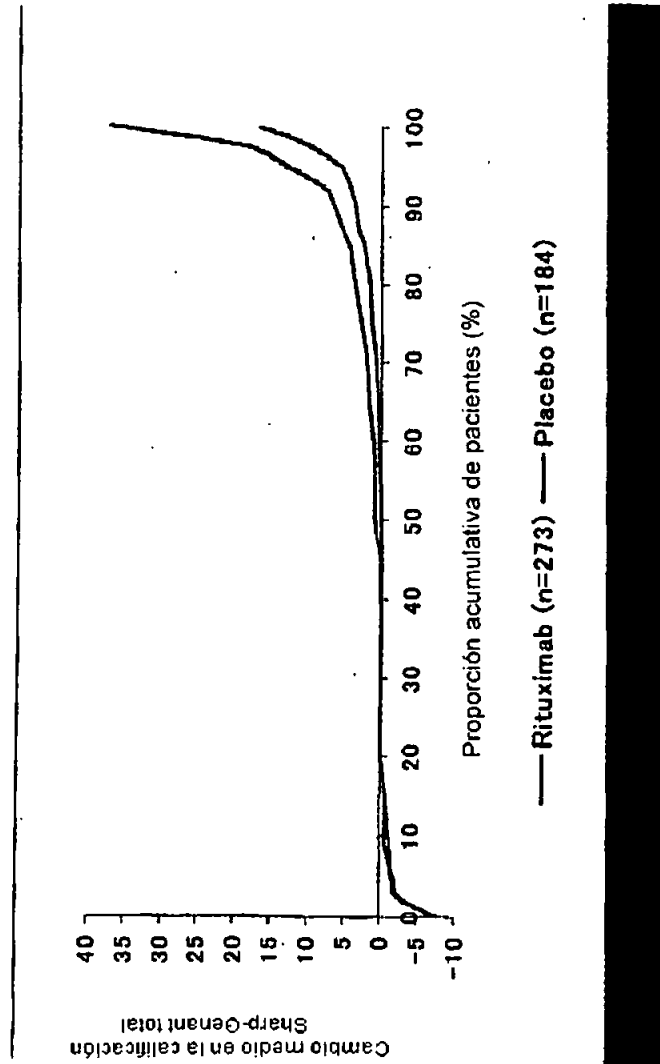


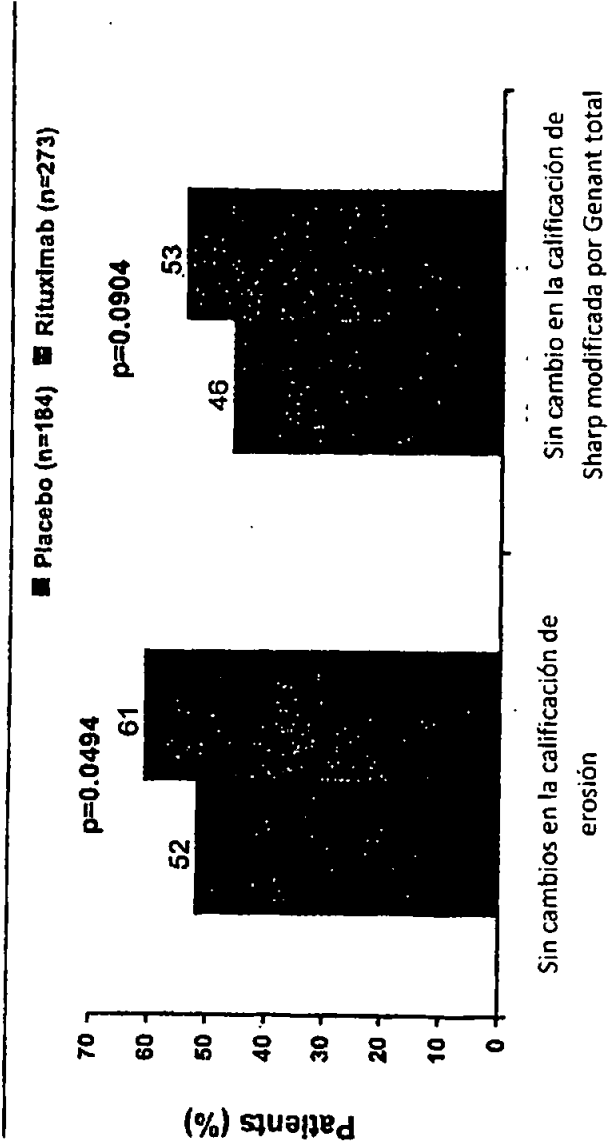
Figura 45

**Análisis de sensibilidad:
cambio de la calificación Sharp-Genant total**

	1.63 (n=184)	0.62 (n=273)	<0.0001
Imputación media para valores faltantes			
Todas las radiografías extrapolación lineal para valores faltantes	2.17 (n=186)	0.92 (n=277)	0.0094
Todas las radiografías, análisis completo	2.17 (n=156)	0.88 (n=242)	0.0090

Figura 46

Pacientes sin cambios radiográficos en la semana 56



Análisis primero: radiografías dentro de la ventana de tiempo, extrapolación lineal de la semana 24 para valores faltantes



No. 08-054162-00000-0000

Fecha: 2008-05-28 15:52:24 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASE NACIONALIA
Act. 411 PRESENTACION Folios: 474

cio
IA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- ♦ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]
- ♦ Descripción de la invención [X]
- ♦ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X]

COMPLETA [X]

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 []

Edgar Navarro

Firma Responsable

Fecha 28-05-08

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

476

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
HOFFMANN-LA ROCHE AG.
BIOGEN IDEC INC
GENENTECH INC

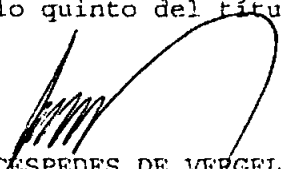
REFERENCIA	Radicación No.	8 54162
	Solicitud internacional	PCT/EP2006/044290
	Fecha inicio fase nacional	15/06/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	8327

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 19 JUN. 2008
jfernand