



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0612321-0 A2



* B R P I 0 6 1 2 3 2 1 A 2 *

(22) Data de Depósito: 13/04/2006
(43) Data da Publicação: 03/11/2010
(RPI 2078)

(51) Int.CI.:

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

(54) Título: MÉTODOS DE TRATAMENTO DE
DOENÇA INFLAMATÓRIA DO INTESTINO (IBD),
MÉTODO PARA REDUÇÃO DE UMA PONTUAÇÃO
DO ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA (DAI),
ARTIGO DE FABRICAÇÃO E USOS DE UM
ANTICORPO CD20

(30) Prioridade Unionista: 15/04/2005 US 60/671,902

(73) Titular(es): Genentech, INC.

(72) Inventor(es): Sheila Gujrathi

(74) Procurador(es): Carolina Nakata

(86) Pedido Internacional: PCT US2006013780 de 13/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/113308de 26/10/2006

(57) Resumo: MÉTODOS DE TRATAMENTO DE DOENÇA
INFLAMATÓRIA DO INTESTINO (IBD), MÉTODO PARA REDUÇÃO
DE UMA PONTUAÇÃO DO ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA
(DAI), ARTIGO DE FABRICAÇÃO E USOS DE UM ANTICORPO
CD20. A presente invenção refere-se ao tratamento de IBD,
especialmente colite ulcerativa (UC) com um anticorpo que se liga a
CD20.

**“MÉTODOS DE TRATAMENTO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA DO
INTESTINO (IBD), MÉTODO PARA REDUÇÃO DE UMA PONTUAÇÃO DO
ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA (DAI), ARTIGO DE FABRICAÇÃO E
USOS DE UM ANTICORPO CD20”**

5 Este é um pedido não provisório reivindicando prioridade com base em 35 USC §119 para o pedido provisório US 60/671,902 depositado em 15 de abril de 2005, cujo relatório descritivo é integralmente incorporado ao presente pedido como referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção relaciona-se ao tratamento de IBD, especialmente colite ulcerativa (UC) com um anticorpo que se liga a CD20.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

DOENÇA INFLAMATÓRIA DO INTESTINO (IBD)

Doença inflamatória do intestino (IBD) é o nome de um grupo de disfunções que causam inflamação no intestino. Os sintomas de IBD incluem espasmos e dores abdominais, diarréia, perda de peso e sangramento intestinal. A opinião de consenso atual com respeito à patogênese de IBD concentra-se no papel da desregulação geneticamente determinada na resposta imune do hospedeiro contra a flora bacteriana residente (Pallone et al., The immune system in inflammatory bowel disease. Em: Satsangi J, Sutherland LR, editores. *Inflammatory Bowel Disease*. Espanha: Churchill Livingstone, 85–93 (2003)).

Doença de Crohn e colite ulcerativa (UC) são as formas mais comuns de IBD.

25 Doença de Crohn usualmente causa úlceras ao longo do comprimento dos intestinos delgado e grosso. Doença de Crohn geralmente tanto se distribui no reto como causa inflamação ou infecção com drenagem ao redor do reto.

Quase sem exceção, UC envolve o reto e se espalha na proximidade

das porções contínuas ou por todo o cólon. A atividade da doença é usualmente intermitente, com recidiva e descanso. A imagem sigmoidoscópica ou colonoscópica é característica. Na doença branda, a mucosa colônica aparece hiperêmica e granular. Na doença mais severa, pequenos pontos de úlcera estão 5 presentes e a mucosa está characteristicamente friável e pode sangrar espontaneamente. Histologicamente, o infiltrado celular inflamatório na doença ativa usualmente inclui neutrófilos, que frequentemente invadem as criptas, como também estão associados com lesão epitelial e distorção da cripta. Um aumento do número de linfócitos na lâmina própria e plasmocitose basal estão usualmente 10 presentes.

Entre 500.000 e 700.000 pacientes sofrem de UC nos Estados Unidos (Loftus, *Gastroenterology* 126:1504-1517(2004)). Manifestações extra colônicas de UC incluem artrite, uveíte, estomatite aftosa, pioderma gangrenoso e eritema nodoso. A terapia inicial para pacientes com a doença branda a moderada 15 é usualmente um aminosalicilato. Em testes controlados, a melhora da doença por vários critérios ocorreu em até 30% dos sujeitos no grupo placebo, dessa forma, o tratamento específico pode ser uma opção para pacientes com doença muito branda. UC do lado esquerdo distal que envolve o reto e cólon sigmóide pode ser tratada de maneira eficaz com formulações enema 5-aminosalicilato (5-ASA). Em 20 pacientes com UC ativa que não respondem ao tratamento 5-ASA padrão e naqueles com a doença mais severa, corticoesteróides orais foram a base da terapia sintomática aguda. No entanto, corticoesteróides não são efetivos na manutenção de remissão a longo prazo em pacientes com UC dado que seu uso 25 está associado com toxicidade significante ao longo do tempo (Lennard-Jones et al., *Lancet* 1:188–189 (1965)).

Pacientes que não respondem a drogas 5-ASA e corticoesteróides para exacerbações da doença tiveram opções terapêuticas limitadas disponíveis. Muitos destes pacientes são tratados com agentes imunossupressivos, mais

comumente 6-mercaptopurina (6-MP) ou azatioprina, que pode ter um atraso significante no princípio do efeito terapêutico na doença ativa. Em pacientes com a doença severa que não responderam às altas doses de IV corticoesteróides e que estão a espera de colectomia, a eficácia significante a curto prazo com IV 5 ciclosporina foi observada em um pequeno estudo controlado por placebo (Lichtiger *et al.*, *N Engl J Med* 330:1841-1845 (1994)). Em última análise, a colectomia é necessária em 25%-40% dos pacientes. Existe uma clara necessidade não apropriada para um agente terapêutico seguro e efetivo que possa fornecer rápido controle da doença ativa e indução prolongada de remissão 10 da doença.

Embora a patogênese de UC não seja completamente entendida, existe um aumento de evidência de que UC possa ser uma disfunção auto-imune, com células B desempenhando um papel na patofisiologia da doença. Células B, assim como células T, estão presentes nos agregados linfoides basais, uma 15 característica histopatológica considerada indicative de UC e vista em cortes histológicos de pacientes com UC ativa (Yeung *et al.*, *Gut* 47:212-227(2000)). Nas avaliações clínicas e parâmetros histológicos que podem prognosticar recidiva em pacientes com UC em descanso, a presença de números elevados de células do plasma na porção basal da mucosa foi descoberto como sendo um indicador 20 independente de recidiva (Bitton *et al.*, *Gastroenterology* 120:1320 (2001)). Enquanto acha-se que a inflamação na mucosa em UC é dirigida por células T ativadas, estes pacientes possuem um perfil de padrão de expressão de citocina 25 T-auxiliar-2 (Th2) (Monteleone *et al.*, *Gut* 50(Suppl III)64 (2002)). Como citocinas Th2 classicamente dirigem respostas imunes de célula B e produção de anticorpos, um papel central para célula B pode ser postulado em UC.

Quantidades elevadas de IgG, IgM e IGA e células do plasma, como também produção elevada de anticorpos contra antígenos do lúmen intestinal e auto-antígenos foram encontradas na lâmina própria da mucos colônica inflamada

em pacientes com UC (MacDermott *et al.*, *Gastroenterology* 81:844-852 (1981)). Além disso, os dados aumentam na presença de auto-anticorpos em pacientes com UC, embora um papel definitivo destes anticorpos na patogênese de UC não seja certo. Aproximadamente dois terços dos pacientes com UC possuem um anticorpo circulante conhecido como anticorpo citoplasmático antineutrófilo perinuclear (p-ANCA), que é dirigido contra componentes de leucócitos neutrófilos (Quinton *et al.*, *Gut* 42:788-791 (1998)). Foi recentemente mostrado que o p-ANCA que ocorre em algumas formas de vasculite, e que é dirigido contra um componente do neutrófilo diferente (mieloperoxidase), é a própria causa da vasculite e lesão no tecido em modelos animais experimentais de vasculite (Xiao *et al.*, *J Clin Invest* 110:955-963 (2002)).

Outro marcador de autoimunidade é a resposta de célula B da mucosa colônica contra isoforma 5 topomiosina humana (hTM5), um suposto autoantígeno em UC. A mucosa colônica de pacientes com UC teve um aumento altamente significativo no número de células B da lâmina própria que produz IgG contra hTM5 comparado com pacientes com colite de Crohn e pacientes não IBD, sugerindo um papel distinto importante para anticorpos anti-hTM5 em UC (Onuma *et al.*, *Clin Exp Immunol* 121:466-471 (2000)). De maneira similar, o número de imunócitos anti-hTM5 IgG foi显著mente maior em pacientes com UC comparado com controles não-IBD, com 21 de 23 pacientes (91%) tendo imunócitos que produzem IgG, independente da atividade clínica (Onuma *et al.*, *Clin Exp Immunol* 121:466-471 (2000)). Além disso, o anticorpo anti-hTM5 foi detectado no soro de pacientes com UC e colangite esclerosante primária (Sakimaki *et al.*, *Gut* 47:236-241 (2000)). Foi demonstrado que anticorpos anti-côlon no soro de pacientes com UC podem reagir com抗ígenos de superfície nas células epiteliais colônicas ou mucina colônica em células do cálice (Inoue *et al.*, *Gastroenterology* 121:1523 (2001)). Estes anticorpos podem contribuir para a destruição da mucosa colônica por meio de mecanismos de citotoxicidade mediada

por célula dependente de anticorpo contra células epiteliais colônicas.

Em um estudo, a colite crônica espontânea que ocorre em camundongos deficientes no receptor de célula T (TCR α) foi observada ser mais severa na ausência de células B maduras. Camundongos deficientes em TCR α com colite crônica que cruzam com camundongos *knockout* a μ possuem descendentes que desenvolvem uma forma mais severa de colite do que camundongos deficientes em TCR α . Neste estudo, a severidade elevada de colite não foi devido à flora patogênica, mas à completa ausência de células B. Nos camundongos a μ *knockout*, a colite crônica foi atenuada acentuadamente após a adoção de transferência de células B periféricas dos camundongos deficientes em TCR α para camundongos de 3 a 4 semanas de idade deficientes em a μ antes do princípio de colite. Isso sugere um papel supressivo para células B no desenvolvimento de colite nestes modelos murino (Mizoguchi *et al.*, *Int Immunol* 12:597-605 (2000)).

15 ANTICORPOS CD20 E TERAPIA COM ESTES

Linfócitos são um dos muitos tipos de glóbulos brancos do sangue produzidos na medula óssea durante o processo de hematopoiese. Existem duas populações principais de linfócitos: Linfócitos B (células B) e linfócitos T (células T). Os linfócitos de interesse particular da presente invenção são as células B.

20 As células B amadurecem na medula óssea e deixam a medula expressando um anticorpo que se liga a um antígeno na superfície de suas células. Quando uma célula B virgem encontra pela primeira vez o antígeno para o qual o anticorpo de sua membrana é específico, a célula começa a se dividir rapidamente e sua progênie diferencia-se em células B de memória e células 25 efetoras denominadas “plasmócitos”. As células B de memória têm um período de vida mais longo e continuam a expressar o anticorpo na membrana com a mesma especificidade que a célula parental original. Os plasmócitos não produzem anticorpo na membrana, mas ao invés disto, produzem o anticorpo de

uma forma que possa ser secretado. Os anticorpos secretados são as principais moléculas efetoras da imunidade humoral.

O antígeno CD20 (também denominado antígeno de diferenciação restrito por linfócitos B humanos, Bp35) é uma proteína hidrofóbica de transmembrana com um peso molecular de aproximadamente 35kD localizada em linfócitos pré-B e B maduros. Valentine *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264(19):11282-11287 (1989) e Einfeld *et al.*, *EMBO J.* 7(3):711-717 (1988). O antígeno é também expressado em mais de 90% dos linfomas não-Hodgkin de célula B (NHL) (Anderson *et al.* *Blood* 63(6):1424-1433 (1984)), mas não é encontrado em células tronco hematopoiéticas, células pró-B, plamócitos normais ou em outros tecidos normais (Tedder *et al.* *J. Immunol.* 135(2):973-979 (1985)). CD-20 regula a(s) etapa(s) inicial(is) no processo de ativação para a iniciação do ciclo e diferenciação celular (Tedder *et al.*, *supra*), e possivelmente funciona como um canal de íon cálcio. Tedder *et al.*, *J. Cell. Biochem.* 14D:195 (1990).

Dado a expressão de CD20 em linfomas de células B, este antígeno pode servir como um possível “alvo” de tais linfomas. Essencialmente, tais alvos podem ser generalizados como segue: anticorpos específicos ao antígeno CD20 de superfície de células B são administrados a um paciente. Estes anticorpos anti-CD20 ligam-se especificamente ao antígeno CD20 (ostensivamente) em ambas as células normais e malignas; o anticorpo ligado à superfície do antígeno CD20 pode levar à destruição e à depleção das células B neoplásicas. Adicionalmente, os agentes químicos ou as marcas radioativas que têm o potencial de destruir o tumor podem ser conjugados ao anticorpo anti-CD20 de tal forma que o agente é especificamente “entregue” às células B neoplásicas. Independentemente da abordagem, o objetivo primário é destruir o tumor, a abordagem específica pode ser determinada pelo anticorpo anti-CD20 específico que é utilizado, e assim, as abordagens disponíveis para atingir o antígeno CD20 podem variar consideravelmente.

O anticorpo rituximab (RITUXAN®) é um anticorpo monoclonal químérico elaborado geneticamente direcionado contra o antígeno CD20. Rituximab é o anticorpo denominado "C2B8" na patente US 5.736.137 emitida em 7 de abril de 1998 (Anderson *et al.*). Rituximab é indicado para o tratamento de 5 pacientes com linfoma não-Hodgkin de células B, CD20-positivo, folicular ou de baixo grau refratário ou recidivado. *In vitro*, rituximab também demonstrou mediar citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e induzir apoptose (Reff *et al.*, *Blood* 83(2):435-445 (1994); Maloney *et al.*, *Blood* 88:637a (1996); Manches *et al.*, *Blood* 101:949-10 954 (2003)). A sinergia entre rituximab e quimioterapia foi observada também experimentalmente. Em particular, rituximab sensibiliza linhagens celulares de linfoma de células B humanas resistentes aos efeitos citotóxicos da doxorubicina, CDDP, toxina de difteria e ricina (Demidem *et al.*, *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12(3):177-186 (1997)). Estudos pré-clínicos *in vivo* 15 demonstraram que rituximab depleta as células B do sangue periférico, nódulos linfáticos e da medula óssea de macacos cynomolgus. Reff *et al.*, *Blood* 83:435-445 (1994).

Rituximab foi também estudado em uma variedade de disfunções auto-imunes não malignas, nas quais células B e auto-anticorpos parecem 20 desempenhar um papel na patofisiologia da doença. Edwards *et al.*, *Biochem Soc. Trans.* 30:824-828 (2002). Rituximab foi relatado aliviar potencialmente sinais e sintomas de, por exemplo, artrite reumatóide (RA) (Leandro *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.* 61:883-888 (2002); Edwards *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl. 9): S46 (2002); Stahl *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 62 (Suppl. 1): OP004 (2003); Emery *et* 25 *al.*, *Arthritis Rheum.* 48(9): S439 (2003)), lúpus (Eisenberg, *Arthritis. Res. Ther.* 5:157-159 (2003); Lenadro *et al.* *Arthritis Rheum.* 46: 2673-2677 (2002); Gorman *et al.*, *Lupus*, 13: 312-316 (2004)), púrpura trombocitopênica imune (D'Arena *et* *al.*, *Leuk. Lymphoma* 44:561-562 (2003); Stasi *et al.*, *Blood*, 98: 952-957 (2001);

Saleh *et al.*, *Semin. Oncol.*, 27 (Supp 12):99-103 (2000); Zaja *et al.*, *Haematologica*, 87: 189-195 (2002); Ratanatharathorn *et al.*, *Ann. Int. Med.*, 133: 275-279 (2000)), aplasia pura de células vermelhas (Auner *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 116: 725-728 (2002)); anemia auto-imune (Zaja *et al.*, *Haematologica* 87:189–195 (2002) (errata aparece em *Haematologica* 87:336 (2002); doença por aglutinina fria (Layios at al., *Leukemia*, 15: 187-8 (2001); Berentsen *et al.*, *Blood*, 103: 2925-2928 (2004); Berentsen *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 115: 79-83 (2001); Bauduer, *Br. J. Haematol.*, 112: 1083-1090 (2001); Damiani *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 114: 229-234 (2001)), síndrome tipo B de resistência à insulina severa (Coll *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 350: 310-311 (2004), crioglobulinemia mista (DeVita *et al.*, *Arthritis Rheum.* 46 Suppl 9: S206/S469 (2002)), miastenia grave (Zaja *et al.*, *Neurology*, 55: 1062-63 (2000); Wylam *et al.*, *J. Pediatr.*, 143: 674-677 (2003)), granulomatose de Wegener (Specks *et al.*, *Arthritis & Rheumatism* 44: 2836-2840 (2001)), pênfigo vulgar refratário (Dupuy *et al.*, *Arch Dermatol.*, 140:91-96 (2004)), dermatose (Levine, *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl. 9):S1299 (2002)), síndrome de Sjogren (Somer *et al.*, *Arthritis & Rheumatism*, 49: 394-398 (2003)), crioglobulinemia mista tipo II ativa (Zaja *et al.*, *Blood*, 101: 3827-3834 (2003)), pênfigo vulgar (Dupay *et al.*, *Arch. Dermatol.*, 140: 91-95 (2004)), neuropatia auto-imune (Pestronk *et al.*, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74:485–489 (2003); síndrome opsoclono-mioclonia (Pranzatelli *et al.* *Neurology* 60(Suppl. 1) PO5.128:A395 (2003)) e esclerose múltipla remitente-recorrente (RRMS). Cross *et al.* (resumo) "Preliminary Results from a Phase II Trial of Rituximab in MS" Oitavo Encontro Anual dos Comitês das Américas para Pesquisa e Tratamento de Esclerose Múltipla, 20–21 (2003).

Um estudo Fase II (WA16291) foi conduzido em pacientes com artrite reumatóide (RA), fornecendo 48 semanas de acompanhamento dos dados de segurança e eficácia de rituximab. Emery *et al.* *Arthritis Rheum* 48(9):S439 (2003); Szczepanski *et al.* *Arthritis Rheum* 48(9):S121 (2003); Edwards *et al.*, *N Engl. J. Med.* 350:2572-82 (2004). Um total de 161 pacientes foram igualmente

randomizados para quatro braços de tratamento: metotrexato, rituximab sozinho, rituximab mais metotrexato e rituximab mais ciclofosfamida (CTX). O regime de tratamento de rituximab foi uma grama administrada intravenosamente nos dias 1 e 15. Infusões de rituximab na maioria dos pacientes com RA foram bem toleradas pela maioria dos pacientes, com 36% de pacientes experimentando pelo menos um evento adverso durante sua primeira introdução (comparado com 30% de pacientes recebendo placebo). Geralmente, a maioria dos eventos adversos foi considerada branda a moderada na severidade e foi bem equilibrada por todos os grupos de tratamento. Houve um total de 19 eventos adversos sérios pelos 5 quatro braços ao longo das 48 semanas, que foram levemente mais frequente no grupo rituximab/CTX. A incidência de infecções foi bem equilibrada por todos os grupos. A média da taxa de infecções sérias nesta população de pacientes RA foi 4,66 por cento de pacientes por ano, que é mais baixa que a taxa de infecções que exigem entrada hospitalar nos pacientes RA (9,57 por 100 pacientes por ano) 10 relatado em um estudo epidemiológico baseado em uma comunidade. Doran et al., *Arthritis Rheum.* 46:2287–2293 (2002).

15

O perfil de segurança relatado de rituximab em um pequeno número de pacientes com disfunção neurológica, incluindo neuropatia auto-imune (Pestronk et al., *supra*), síndrome opsoclono-mioclon (Pranzatelli et al., *supra*), e 20 RRMS (Cross et al., *supra*), foi similar àquele relatado em oncologia ou RA. Em um estudo patrocinado de investigação avançada (IST) de rituximab em combinação com interferon-beta (IFN- β) ou acetato de glatiramer em pacientes com RRMS (Cross et al., *supra*), 1 de 10 pacientes tratados foi admitido para o hospital por 25 uma noite em observação após ter sentido febre moderada e seguindo primeira introdução de rituximab, enquanto os outros 9 pacientes completaram os quatro regimes de introdução sem qualquer evento adverso relatado.

Patentes e publicações de patentes que relacionam anticorpos CD20 e moléculas de ligação CD20 incluem patentes US. 5.776.456, 5.736.137,

5.843.439, 6.399.061 e 6.682.734, assim como patente US 2002/0197255, patente US 2003/0021781, patente US 2003/0082172, patente US 2003/0095963, patente US 2003/0147885 (Anderson et al.); Patente US 6.455.043, patente US 2003/0026804 e documento WO 2000/09160 (Grillo-Lopez, A.); documento WO 5 2000/27428 (Grillo-Lopez e White); documento WO 2000/27433 e patente US 2004/0213784 (Grillo-Lopez e Leonard); documento WO 2000/44788 (Braslawsky et al.); documento WO 2001/10462 (Rastetter, W.); documento WO 2001/10461 (Rastetter e White); documento WO 2001/10460 (White e Grillo-Lopez); patente US 2001/0018041, patente US 2003/0180292, documento WO 2001/34194 10 (Hanna e Hariharan); patente US 2002/0006404 e documento WO 2002/04021 (Hanna e Hariharan); patente US 2002/0012665 e documento WO 2001/74388 (Hanna, N.); patente US 2002/0058029 (Hanna, N.); patente US 2003/0103971 (Hariharan e Hanna); patente US 2002/0009444 e documento WO 2001/80884 (Grillo-Lopez, A.); documento WO 2001/97858 White, C.); patente US 15 2002/0128488 e documento WO 2002/34790 (Reff, M.); documento WO 2002/060955 (Braslawsky et al.); documento WO 2002/096948 (Braslawsky et al.); documento WO 2002/079255 (Reff and Davies); patente US 6,171,586 e documento WO 1998/56418 (Lam et al.); documento WO 1998/58964 (Raju, S.); documento WO 1999/22764 (Raju, S.); documento WO 1999/51642, patente US 20 20 6,194,551, patente US 6,242,195, patente US 6,528,624 e patente US 6,538,124 (Idusogie et al.); documento WO 2000/42072 (Presta, L.); documento WO 2000/67796 (Curd et al.); documento WO 2001/03734 (Grillo-Lopez et al.); patente US 2002/0004587 e documento WO 2001/77342 (Miller e Presta); patente US 2002/0197256 (Grewal, I.); patente US 2003/0157108 (Presta, L.); documento WO 25 04/056312 (Lowman et al.); patente US 2004/0202658 e documento WO 2004/091657 (Benyunes, K.); documento WO 2005/000351 (Chan, A.); patente US 2005/0032130A1 (Beresini et al.); patente US 2005/0053602A1 (Brunetta, P.); patentes US 6.565.827, 6.090.365, 6.287.537, 6.015.542, 5.843.398 e 5.595.721

(Kaminski *et al.*); patente US 5.500.362, 5.677.180, 5.721.108, 6.120.767 e 6.652.852 (Robinson *et al.*); patente US 6.410.391 (Raubitschek *et al.*); patente US 6.224.866 e documento WO 00/20864 (Barbera-Guillem, E.); documento WO 2001/13945 (Barbera-Guillem, E.); documento WO 2000/67795 (Goldenberg); 5 patente US 2003/0133930 e documento WO 2000/74718 (Goldenberg e Hansen); patente US 2003/0219433 e documento WO 2003/68821 (Hansen *et al.*); documento WO 2004/058298 (Goldenberg e Hansen); documento WO 2000/76542 (Golay *et al.*); documento WO 2001/72333 (Wolin e Rosenblatt); patente US 6.368.596 (Ghetie *et al.*); patente US 6.306.393 e patente US 10 2002/0041847 (Goldenberg, D.); patente US 2003/0026801 (Weiner e Hartmann); documento WO 2002/102312 (Engleman, E.); patente US 2003/0068664 (Albitar *et al.*); documento WO 2003/002607 (Leung, S.); documento WO 2003/049694, patente US 2002/0009427, e patente US 2003/0185796 (Wolin *et al.*); documento WO 2003/061694 (Sing and Siegall); documento US 2003/0219818 (Bohen *et al.*); 15 patente US 2003/0219433 e documento WO 2003/068821 (Hansen *et al.*); patente US 2003/0219818 (Bohen *et al.*); patente US 2002/0136719 (Shenoy *et al.*); documento WO 2004/032828 (Wahl *et al.*); e documento WO 2002/56910 (Hayden-Ledbetter); patente US 2003/0219433 A1 (Hansen *et al.*); documento WO 2004/035607 (Teeling *et al.*); patente US 2004/0093621 (Shitara *et al.*); 20 documento WO 2004/103404 (Watkins *et al.*); documento WO 2005/000901 (Tedder *et al.*); patente US 2005/0025764 (Watkins *et al.*); documento WO 2005/016969 e patente US 2005/0069545 A1 (Carr *et al.*); e documento WO 2005/014618 (Chang *et al.*). Ver também patente US 5.849.898 e patente EP 25 (Seed *et al.*); patente EP 332.865 A2 (Meyer e Weiss); patente US 4,861,579 (Meyer *et al.*); patente US 2001/0056066 (Bugelski *et al.*); e documento WO 1995/03770 (Bhat *et al.*);

Publicações relacionando terapia com rituximab incluem: Perotta e Abuel, "Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to rituximab"

Resumo # 3360 *Blood* 10(1)(parte 1-2): p. 88B (1998); Perotta *et al.*, "Rituxan in the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)", *Blood*, 94: 49 (resumo) (1999); Matthews, R., "Medical Heretics" *New Scientist* (7 April, 2001); Leandro *et al.*, "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response" *Arthritis and Rheumatism* 44(9): S370 (2001); Leandro *et al.*, "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", *Arthritis and Rheumatism*, 46:2673–2677 (2002), em que durante um período de 2 semanas, cada paciente recebeu duas introduções de 500 mg de rituximab, duas introduções de 750 mg de ciclofosfamida, e dose alta oral de corticoesteróides, e em que dois dos pacientes recidivados tratados em 7 e 8 meses, respectivamente, e foram retratados, embora com diferentes protocolos; Weide *et al.*, "Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy", *Lupus*, 12: 779-782 (2003), em que um paciente foi tratado com rituximab ($375 \text{ mg/m}^2 \times 4$, repetido em intervalos semanais) e, além disso, aplicações de rituximab foram distribuídas a cada 5-6 meses e então a manutenção da terapia foi aceita com 375 mg/m^2 a cada três meses, e um segundo paciente com SLE refratária foi tratado com sucesso com rituximab e é aceita manutenção de terapia a cada três meses, com ambos pacientes respondendo bem à terapia de rituximab; Edwards e Cambridge, "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" *Rheumatology* 40:205-211 (2001); Cambridge *et al.*, "B lymphocyte depletion in patients with rheumatoid arthritis: serial studies of immunological parameters" *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl. 9): S1350 (2002); Edwards *et al.*, "Efficacy and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: Um teste controlado placebo randomizado em pacientes com artrite reumatóide. *Arthritis and Rheumatism* 46(9): S197 (2002); Pavelka *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 63: (S1):289-90 (2004); Emery *et al.*, *Arthritis Rheum.* 50 (S9):S659 (2004); Levine e Pestronk, "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab"

Neurology 52: 1701-1704 (1999); DeVita et al., "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheum* 46:2029-2033 (2002); Hidashida et al. "Treatment of DMARD-refractory rheumatoid arthritis with rituximab." Apresentado no *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology*; 24 a 29 de outubro; Nova Orleans, LA (2002); Tuscano, J. "Successful treatment of infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab" Apresentado no *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology*; 24 a 29 de outubro; Nova Orleans, LA (2002); "Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic" Martin e Chan, *Immunity* 20:517-527 (2004); Silverman e Weisman, "Rituximab Therapy and Autoimmune Disorders, Prospects for Anti-B Cell Therapy", *Arthritis and Rheumatism*, 48: 1484-1492 (2003); Kazkaz e Isenberg, "Anti B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases", *Current opinion in pharmacology*, 4: 398-402 (2004); Virgolini e Vanda, "Rituximab in autoimmune diseases", *Biomedicine & pharmacotherapy*, 58: 299-309(2004); Klemmer et al., "Treatment of antibody mediated autoimmune disorders with a AntiCD20 monoclonal antibody Rituximab", *Arthritis And Rheumatism* , 48:S624-S624 (2003); Kneitz et al., "Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases" *Immunobiology* 206: 519-527 (2002); Arzoo et al., "Treatment of refractory antibody mediated autoimmune disorders with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab)" *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61 (10):922-4 (2002) Looney, R., "Treating human autoimmune disease by depleting B cells" *Ann Rheum Dis.* 61: 863-866 (2002); Lake e Dionne, "Future Strategies in Immunotherapy" em *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (2003 por John Wiley & Sons, Inc.) artigo on-line com data de postagem: 15 de janeiro de 2003 (Capítulo 2 "Antibody-Directed Immunotherapy"); Liang e Tedder, *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, Seção: CD20 as an Immunotherapy Target, artigo on-line com data de postagem: 15 de janeiro de 2002 intitulado "CD20"; Apêndice 4A intitulado "Monoclonal

Antibodies to Human Cell Surface Antigens" por Stockinger *et al.*, edições: Coligan *et al.*, em *Current Protocols in Immunology* (2003 John Wiley & Sons, Inc) on-line com data de postagem: maio de 2003; data da publicação impressa: fevereiro de 2003, Penichet e Morrison, "CD Antibodies/molecules: Definition; Antibody

5 Engineering" em *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine* Seção: Chimeric, Humanized and Human Antibodies; postado on-line em 15 de janeiro de 2002, Speacks *et al.* "Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy" *Arthritis & Rheumatism* 44:2836-2840 (2001), resumo on-line submissão e convite Koegh *et al.*, "Rituximab for Remission Induction in

10 Severe ANCA-Associated Vasculitis: Report of a Prospective Open-Label Pilot Trial in 10 Patients", American College of Rheumatology, Seção número: 28-100, Título da Seção: Vasculitis, Tipo da Seção: ACR Seção Concorrente, Categoria Primária:

28 Vasculitis, Seção 18 de outubro de 2004 (<http://www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.asp>); Eriksson, "Short-term

15 outcome and safety in 5 patients with ANCA-positive vasculitis treated with rituximab", *Kidney and Blood Pressure Research*, 26: 294 (2003); Kneitz *et al.*, "B cell depletion with rituximab for refractory vasculitis" *Kidney and Blood Pressure Research*, 26: 294 (2003); Jayne, poster 88 (11th International Vasculitis and ANCA workshop), 2003 American Society of Nephrology; Stone e Specks, "Rituximab

20 Therapy for the Induction of Remission and Tolerance in ANCA-associated Vasculitis", no Clinical Trial Research Summary de 2002-2003 Immune Tolerance Network, <http://www.immunetolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html>; e Leandro *et al.*, "B cell repopulation occurs mainly from naïve B cells in patient with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus" *Arthritis Rheum.*, 48 (Suppl 9): S1160 (2003).

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Em um primeiro aspecto, a invenção relaciona-se a um método para tratar doença inflamatória do intestino (IBD) moderada a severa em um sujeito

humano que compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um anticorpo CD20, em que a administração do anticorpo resulta em uma resposta clínica ou remissão da doença no sujeito.

Em outro aspecto, a invenção relaciona-se a um método para tratar
5 doença inflamatória do intestino (IBD) em um sujeito humano com IBD ativa que compreende administrar somente uma ou duas doses de um anticorpo CD20 ao sujeito, em que a remissão da doença ou resposta é alcançada pela administração de uma ou duas doses do anticorpo CD20.

A invenção também fornece um método para tratar doença
10 inflamatória do intestino (IBD) em um sujeito humano com IBD ativa que compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um anticorpo CD20 e também compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um segundo medicamento selecionado do grupo que consiste de um aminosalicilato, um corticoesteróide oral, 6-mercaptopurina (6-MP) e azatioprina.

15 Em ainda um aspecto adicional, a invenção relaciona-se a um método para redução de uma pontuação do índice de atividade da doença (DAI) em um sujeito humano com colite ulcerativa ativa (UC) que compreende administrar um anticorpo CD20 ao sujeito em uma quantidade eficaz para reduzir a pontuação DAI.

20 Em ainda uma realização adicional, a invenção relaciona-se a um artigo de fabricação, que compreende:

- i. um recipiente que compreende um anticorpo CD20; e
- ii. uma bula com instruções de uso para tratar doença inflamatória do intestino (IBD) em um sujeito humano, em que as instruções indicam que uma quantidade eficaz 25 do anticorpo CD20 é administrada ao sujeito humano.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1A é um alinhamento de sequência que compara as sequências de aminoácidos de domínio variável leve (V_L) de cada um dos

2H7 murino (SEQ ID NO: 1), variante 2H7.v16 humanizada (SEQ ID NO: 2), e o subgrupo I de cadeia leve kappa humano (SEQ ID NO: 3). As CDRs de V_L do 2H7 e hu2H7v.16 são como segue: CDR1 (SEQ ID NO:4), CDR2 (SEQ ID NO:5), e CDR3 (SEQ ID NO:6).

5 FIG. 1B é um alinhamento de sequência que compara as sequências de aminoácidos de domínio variável pesado (V_H) de cada um dos 2H7 murino (SEQ ID NO:7), variante 2H7.v16 humanizada (SEQ ID NO:8), e a sequência consenso humana do subgrupo III de cadeia pesada (SEQ ID NO:9). As CDRs de V_H do 2H7 e hu2H7v.16 são como segue: CDR1 (SEQ ID NO:10), CDR2 (SEQ ID NO:11), e CDR3 (SEQ ID NO:12).

10 Nas FIG. 1A e FIG. 1B, a CDR1, CDR2 e CDR3 em cada cadeia estão fechadas dentro de parênteses, ladeadas pelas regiões de estrutura FR1-FR4, como indicado. 2H7 refere-se ao anticorpo 2H7 murino. Os asteriscos entre duas linhas das sequências indicam as posições que são diferentes entre as duas 15 sequências. A numeração de resíduo está de acordo com Kabat *et al.* *Sequences of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), com inserções mostradas como a, b, c, d, e e.

20 FIG. 2 mostra um alinhamento das cadeias leves 2H7.v16 e 2H7.v511 maduras (SEQ ID NOS: 13 e 15, respectivamente), com numeração de resíduo de domínio variável Kabat e numeração de resíduo de domínio constante Eu.

FIG. 3 mostra um alinhamento das cadeias pesadas 2H7.v16 e 2H7.v511 maduras (SEQ ID NOS: 14 e 16, respectivamente), com numeração de resíduo de domínio variável Kabat e numeração de resíduo de domínio constante Eu.

FIG. 4 decreve o esquema de estudo para o protocolo no Example 1.

25 **DESCRIÇÃO DETALHADA DAS REALIZAÇÕES PREFERIDAS**

I. DEFINIÇÕES

"Doença inflamatória do intestino" ou "IBD" refere-se ao grupo de disfunções que causam inflamação no intestino, geralmente manifestada com

sintomas que incluem espasmos e dores abdominais, diarréia, perda de peso e sangramento intestinal. As principais formas de IBD são colite ulcerativa (UC) e doença de Crohn.

“Colite ulcerativa” ou “UC” é uma doença crônica, episódica e inflamatória do intestino grosso e reto caracterizada por diarréia sanguinolenta. Colite ulcerativa é caracterizada por inflamação crônica na mucosa colônica e pode ser categorizada de acordo com a localização: “proctite” envolve somente o reto, “proctosigmoidite” afeta o reto e o colon sigmóide, “colite do lado esquerdo” engloba o lado esquerdo inteiro do intestino grosso, “pancolite” inflama o cólon inteiro.

“Doença de Crohn” também chamada “enterite regional” é uma doença auto-imune crônica que pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, mas ocorre mais comumente no íleo (a área onde o intestino delgado e grosso se encontram). Doença de Crohn, em contraste a colite ulcerativa, é caracterizada pela inflamação crônica e estende-se através de todas as camadas da parede intestinal e envolve o mesentério como também linfonodos regionais. Se o intestino delgado ou cólon está ou não envolvido, o processo patológico básico é o mesmo.

Colite Ulcerativa e doença de Crohn podem ser distinguidas entre si clinicamente, endoscopicamente, patologicamente e sorologicamente em mais de 90% dos casos; as diferenças são consideradas IBD indeterminadas (*Harrison's Principles of Internal medicine*, 12^a edição, p. 1271 (1991)).

IBD “moderada-severa” é IBD onde os sinais ou sintomas da doença no sujeito são maiores que a branda. Tais sujeitos podem ser identificados por um gastroenterologista especialista. O sujeito com IBD moderada-severa pode ter sido tratado com corticoesteróides orais para UC dentro de 2 anos antes da seleção, e/ou tratamento intensivo pode ter sido igual ou maior do que uma dose equivalente de prednisona de 20 mg/dia por pelo menos 2 semanas de duração. Tais sujeitos

podem ser refratários a esteróides e/ou dependentes de esteróides. Um sujeito com UC moderada-severa pode ser selecionado baseado na pontuação DAI, por exemplo, onde uma pontuação DAI de sangramento retal ≥ 6 , ≥ 2 , e/ou pontuação de sigmoidoscopia flexível ≥ 2 indica que o sujeito tem UC moderada-severa.

- 5 Alternativamente, ou adicionalmente, o critério para avaliação da doença branda, moderada e severa como em Truelove e Witts *Br Med J.* 2:1041-1048 (1955) (ver Tabela 1 abaixo) pode ser usado para identificar tais sujeitos. Sujeitos com colite fulminante ou tóxica usualmente possuem mais que 10 movimentos intestinais por dia, sangramento contínuo, distenção abdominal e sensibilidade, e evidência 10 radiológica de edema e possivelmente dilatação do intestino.

Tabela 1

Critério de Trulove e Witts para Avaliação da Atividade da Doença em

Colite Ulcerativa

Movimentos diários do intestino (no.)	< ou = a 5	> 5
Hematoquézia	Quantidade pequena	Quantidade grande
Temperatura	< 37,5°C	> ou = a 37,5°C
Pulso	< 90/min	> ou = 90/min
Taxa de sedimentação de eritrócito	< 30 mm/h	> ou = a 30 mm/h
Hemoglobina	> 10 g/dl	< ou = a 10 g/dl
Sujeitos com menos que 6 dos critérios acima para atividade severa possuem atividade moderada da doença.		

Um “sujeito” na presente invenção é um sujeito humano.

- 15 Um sujeito com IBD “ativa” é o que sente pelo menos um sintoma de IBD no momento da seleção ou tratamento inicial

IBD “refratária a esteróide” é IBD com progresso ou piora, mesmo que o esteróide esteja sendo administrado ao sujeito com IBD.

Um sujeito com IBD “dependente de esteróide” é dependente do uso de esteróide e pode não diminuir ou retirar a administração de esteróides devido aos sintomas persistentes.

Um “sintoma” de IBD é um fenômeno mórbido ou afastamento do normal na estrutura, função ou sensação sentida pelo sujeito e indicativa de IBD.

A “mucosa” é o tecido úmido que limita os órgãos específicos e as cavidades do corpo em todo o corpo, incluindo o trato intestinal. Glândulas ao longo da mucosa secretam muco (um fluido espesso).

“Côlon” é a divisão do intestino grosso que se estende desde o ceco até o reto.

Mucosa “colônica” é a mucosa que limita o côlon.

“Placas de Peyer” são agregados de folículos linfáticos encontrados por todo o corpo, especialmente no revestimento interno da mucosa do trato digestivo e respiratório.

Por “remissão da doença” entende-se substancialmente a não evidência dos sintomas da doença. A remissão pode ser alcançada dentro de um período de tempo, tal como dentro de ou em aproximadamente 8 semanas, do início do tratamento com a dose inicial ou a partir desta, do antagonista ou anticorpo. A remissão pode também ser mantida por um período de tempo, tal como 4 semanas ou 48 semanas. A remissão da doença pode ser definida como uma pontuação de sigmoidoscopia de 0 a 1 e/ou pontuação de sangramento retal de 0.

Uma “sigmoidoscopia” é uma inspeção, através de um endoscópio, do interior do cólon sigmóide.

Uma “pontuação de sigmoidoscopia” refere-se a uma pontuação determinada por um clínico baseada em uma sigmoscopia. O sistema de pontuação de sigmoidoscopia preferida é como segue:

0 = normal ou doença inativa

1 = doença branca (eritema, padrão vascular diminuído, fragilidade branca)

2 = doença moderada (eritema acentuado, padrão vascular ausente, fragilidade, erosões)

3 = doença severa (sangramento espontâneo, ulceração)

“Sangramento retal” refere-se a qualquer sangramento no reto ou a

5 partir deste.

Uma “pontuação de sangramento retal” é a pontuação determinada para qualquer extensão de sangramento retal. Uma pontuação de sangramento diária representa o sangramento mais forte do dia. O sistema de pontuação de sangramento retal preferido é:

10 0 = nenhum sangue visto

1 = linhas de sangue com fezes menos do que a metade do tempo

2 = sangue evidente com fezes na maior parte do tempo

3 = passagem de sangue sozinho.

Por “resposta clínica” entende-se uma melhora nos sintomas da
 15 doença. A resposta clínica pode ser alcançada dentro de um certo período de tempo, por exemplo, dentro de ou em aproximadamente 8 semanas do início do tratamento com a dose inicial ou a partir desta, do antagonista ou anticorpo. A resposta clínica pode também ser mantida por um período de tempo, tal como 24 semanas ou 48 semanas. A resposta clínica pode ser avaliada em termos de uma
 20 redução na pontuação do índice de atividade da doença (DAI), por exemplo, a pontuação DAI pode ser reduzida para mais ou igual a 3 pontos.

Um sistema de pontuação do “índice de atividade da doença (DAI)” é um método para avaliar quantitativamente a atividade de UC. O sistema de pontuação DAI preferido está mostrado na Tabela 2 abaixo.

25

TABELA 2

SISTEMA DE PONTUAÇÃO DAI PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE UC

Frequência de fezes (cada sujeito serve como seu próprio controle para estabelecer o grau de anormalidade da freqüência de fezes)

0 = número normal de fezes para este sujeito

1 = 1-2 fezes mais do que o normal

2 = 3-4 fezes mais do que o normal

3 = 5 ou mais fezes mais do que o normal

- 5 **Sangramento retal** (a pontuação de sangramento diária representa o sangramento mais forte do dia)

0 = nenhum sangue visto

1 = linhas de sangue com fezes menos do que a metade do tempo

2 = sangue evidente com fezes na maior parte do tempo

- 10 3 = passagem de sangue sozinho.

Constatações de protosigmoidoscopia flexível

0 = normal ou doença inativa

1 = doença branda (eritema, padrão vascular diminuído)

- 2 = doença moderada (eritema acentuado, padrão vascular ausente, fragilidade, 15 erosões)

3 = doença severa (sangramento espontâneo, ulceração)

- 20 **Avaliação global do médico** (reconhece os 3 outros critérios, registro diário do sujeito de desconforto abdominal e senso geral de bem estar, e outras observações, tais como constatações físicas e o estado de desempenho do sujeito)

0 = normal

1 = doença branda

2 = doença moderada

3 = doença severa

- 25 Um “auto-anticorpo” é um anticorpo produzido por um sujeito e dirigido contra um antígeno do próprio sujeito.

Uma “tropomiosina” é uma proteína fibrosa extraída do músculo.

Existem 8 isoformas de tropomiosina humana conhecidas. Em células epiteliais

do cólon, a isoforma 5 de tropomiosina humana (hTM5) é a isoforma predominante, com menores quantidades da isoforma 4 (hTM4).

Por “anticorpo anti-hTM5” entende-se um anticorpo produzido por um sujeito e dirigido contra esta hTM5 do próprio sujeito.

5 “Anticorpo citoplasmático antineutrófilo perinuclear (p-ANCA)” refere-se a um auto-anticorpo produzido por um sujeito e dirigido contra componentes leucócitos neutrófilos deste sujeito. “Perinuclear” refere-se ao padrão de coloração de tais auto-anticorpos.

10 Por nível de auto-anticorpo “atípico” entende-se um nível de tal auto-anticorpo que excede o nível normal. Tal nível de auto-anticorpo normal ou típico pode ser o nível encontrado em tecido colônico ou mucosa de um sujeito normal, ou sujeito que não está sofrendo de IBD.

15 Uma “célula B” é um linfócito que amadurece na medula óssea, e inclui uma célula B virgem, célula B de memória, ou células B efetoras (células do plasma). A célula B na presente invenção pode ser uma célula B normal ou não-maligna.

20 Um “marcador de superfície de célula B” ou “antígeno de superfície de célula B” na presente invenção é um antígeno expressado na superfície de uma célula B que pode ser atingido com um antígeno ou anticorpo que se liga a este. Marcadores de superfície de célula B exemplares incluem os marcadores de superfície de leucócitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 e CD86 (para descrições, ver The Leukocyte Antigen Facts Book, 2^a Edição. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., Nova York). Outros marcadores de superfície de célula B incluem RP105, FcRH2, célula B CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA, e 239287. O marcador de superfície de célula B de

interesse particular é preferencialmente expressado nas células B comparado a outros tecidos de célula não B de um sujeito e pode ser expresso em ambos, precursores de células B e células B maduras.

O antígeno "CD20", ou "CD20" é uma fosfoproteína não-glicosilada
5 de aproximadamente 35 kDa, encontrada na superfície de mais de 90% das células B do sangue periférico ou órgãos linfóides. CD20 está presente em ambas as células B normais assim como células B malignas, mas não é expresso em células tronco. Outros nomes para CD20 na literatura incluem "antígeno restrito de linfócito B" e "Bp35". O antígeno CD20 está descrito em Clark
10 et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:1766 (1985), por exemplo.

Um "antagonista de marcador de superfície de célula B" é uma molécula que sob ligação a um marcador de superfície de célula B nas células B, destroem ou depletam células B em um sujeito e/ou interferem em uma ou mais funções da célula B, por exemplo, pela redução ou prevenção de uma resposta
15 humoral produzida pela célula B. O antagonista preferivelmente é capaz de depletar células B (isto é, reduzir níveis de célula B circulante) em um sujeito tratado com este. Tal depleção pode ser alcançada via vários mecanismos tal como citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC), inibição de proliferação de
20 célula B e/ou indução de morte de célula B (por exemplo, via apoptose). Antagonistas incluídos dentro do escopo da presente invenção incluem anticorpos, peptídeos sintéticos ou peptídeos de sequência nativa, imunoadesinas, e antagonistas de molécula pequena que se ligam a um marcador de superfície de célula B tal como CD20, opcionalmente conjugado ou fundido a
25 um agente citotóxico. O antagonista preferido compreende um anticorpo.

Um "antagonista do anticorpo CD20" na presente invenção é um anticorpo que sob ligação ao CD20 em células B, destroem ou depletam células B em um sujeito e/ou interferem em uma ou mais funções da célula B, por exemplo,

por redução ou prevenção de uma resposta humoral produzida pela célula B. O anticorpo antagonista preferivelmente é capaz de depletar células B (isto é, reduzir níveis de célula B circulante) em um sujeito tratado com este. Tal depleção pode ser alcançada via vários mecanismos tal como citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC), inibição de proliferação de célula B e/ou indução de morte de célula B (por exemplo, via apoptose).

O termo "anticorpo" na presente invenção é usado no senso mais amplo e especificamente abrange anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) formados por pelo menos dois anticorpos intactos e fragmentos de anticorpo, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada.

"Fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, preferivelmente que compreende a região de ligação de antígeno deste. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e fragmentos Fv; diacorpos, anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia única e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpo.

Um anticorpo intacto na presente invenção é aquele que compreende duas regiões de ligação de antígeno, e uma região Fc. Preferivelmente, o anticorpo intacto possui uma região Fc funcional.

Exemplos de anticorpos CD20 incluem: "C2B8" que é agora chamado "rituximab" ("RITUXAN®") (patente US 5.736.137); o anticorpo murino 2B8 marcado com ítrio-[90] designado "Y2B8" ou "Ibritumomab Tiuxetan" ZEVALIN® comercialmente disponível pela Idec Pharmaceuticals, Inc. (patente US 5.736.137; 2B8 depositada com ATCC sob acesso no HB11388 em 22 de junho de 1993); IgG2a "B1" murino, também chamado "Tositumomab", opcionalmente marado com ¹³¹I para gerar o "¹³¹I-B1" ou anticorpo "iodo I¹³¹ tositumomab" (BEXXAR™) comercialmente disponível pela Corixa

(ver também, patente US 5.595.721); anticorpo monoclonal murino "1F5" (Press *et al.*, *Blood* 69(2):584-591 (1987) e variantes destes incluindo "estrutura embutida" ou 1F5 humanizado (documento WO 2003/002607, Leung, ATCC depósito HB-96450); anticorpo 2H7 murino e 2H7 quimérico (patente US 5.677.180); um 2H7 humanizado 5 (documento WO 2004/056312 (Lowman *et al.*); e como apresentado abaixo), 2F2 (HuMAX-CD20), um anticorpo humano completo de alta afinidade (Genmab, Denmark; ver, por exemplo, Glennie e van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003) e Cragg *et al.*, *Blood* 101: 1045-1052 (2003); documento WO 2004/035607; patente US 2004/0167319); os anticorpos monoclonais humanos apresentados no documento WO 10 2004/035607 e patente US 2004/0167319 (Teeling *et al.*); os anticorpos que possuem complexos de cadeias de açúcar ligados a N-glicosídeo ligados à região Fc descritos na patente US 2004/0093621 (Shitara *et al.*); anticorpos monoclonais e fragmentos de ligação de antígeno a CD20 (documento WO 2005/000901, Tedder *et al.*) tais como HB20-3, HB20-4, HB20-25 e MB20-11; moléculas de ligação CD20 tais como as séries 15 AME de anticorpos, por exemplo, anticorpos AME 33 como apresentados no documento WO 2004/103404 e patente US 2005/0025764 (Watkins *et al.*, Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME); moléculas de ligação CD20 tais como aquelas descritas na patente US 2005/0025764 (Watkins *et al.*); anticorpo A20 ou variantes destes tal como anticorpo A20 quimérico ou humanizado (cA20, hA20, 20 respectivamente) (patente US 2003/0219433, Immunomedics); anticorpos de ligação CD20, incluindo Leu-16 com epitopo depletado, 1H4, ou 2B8, opcionalmente conjugado com IL-2, como na patente US 2005/0069545A1 e documento WO 2005/16969 (Carr *et al.*); anticorpo biespecífico que se liga a CD22 e CD20, por exemplo, hLL2xhA20 (WO2005/14618, Chang *et al.*); anticorpos monoclonais L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 ou 25 NU-B2 disponíveis por meio da International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *et al.*, Em: *Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., pág. 440, Oxford University Press (1987)); 1H4 (Haisma *et al.* *Blood* 92:184 (1998)). Os anticorpos CD20 preferidos na presente invenção são anticorpos CD20 quiméricos, humanizados ou humanos, mais

preferivelmente rituximab, 2H7 humanizado, 2F2 (Hu-Max-CD20) anticorpo CD20 humano (Genmab), e anticorpo A20 humanizado (Immunomedics).

Os termos "rituximab" ou "RITUXAN®" na presente invenção referem-se ao anticorpo monoclonal murino/humano químérico geneticamente engenheirado 5 direcionado contra o antígeno CD20 e designado "C2B8" na patente US 5.736.137, incluindo fragmentos destes que retêm a capacidade de se ligar a CD20.

Puramente para os propósitos da presente invenção e a menos que indicado de outra forma, um anticorpo "2h7 humanizado" é um variante humanizado do anticorpo 2H7 murino, em que o anticorpo é efetivo para reduzir 10 células B circulantes *in vivo*.

Em uma realização, o anticorpo humanizado compreende um, dois, três, quatro, cinco ou seis das seguintes sequências de CDR:

CDR L1 sequência RASSSVSYXH em que X é M ou L (SEQ ID NO. 21), por exemplo, SEQ ID NO. 4 (Fig. 1A),

15 CDR L2 sequência de SEQ ID NO:5 (Fig. 1A),

CDR L3 sequência QQWXFNPP em que X é S ou A (SEQ ID NO. 22), por exemplo, SEQ ID NO:6 (Fig. 1A),

CDR H1 sequência de SEQ ID NO:10 (Fig. 1B),

CDR H2 sequência de AIYPNGXTSYNQKFKG em que X é D ou A (SEQ ID NO. 20 23), por exemplo, SEQ ID NO. 11 (Fig. 1B), e

CDR H3 sequência de VVYYSSXYWYFDV em que X na posição 6 é N, A, Y, W ou D, e o X na posição 7 é S ou R (SEQ ID NO. 24), por exemplo SEQ ID NO. 12 (Fig. 1B).

As sequências CDR acima estão geralmente presentes nas sequências de estrutura variável leve e variável pesada humanas, tais como 25 substancialmente os resíduos de FR consenso humano do subgrupo I kappa cadeia leve humana (V_{L6I}), e substancialmente os resíduos de FR consenso humano do subgrupo III cadeia pesada humana (V_{HIII}). Ver também documento WO 2004/056312 (Lowman *et al.*).

A região pesada variável pode estar ligada a uma região constante da cadeia IgG humana, em que a região pode ser, por exemplo, IgG1 ou IgG3, incluindo sequência nativa e regiões constantes variantes.

Em uma realização preferida, tal anticorpo comprehende a sequência de domínio variável pesada da SEQ ID NO:8 (v16, como mostrado na Fig. 1B), opcionalmente também comprehende a sequência de domínio variável leve da SEQ ID NO:2 (v16, como mostrado na Fig. 1A), que opcionalmente comprehende uma ou mais substituições de aminoácidos nas posições 56, 100, e/ou 100a, por exemplo, D56A, N100A ou N100Y, e/ou S100aR no domínio variável pesado e uma ou mais substituições de aminoácidos nas posições 32 e/ou 92, por exemplo, M32L e/ou S92A, no domínio variável leve. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo intacto que comprehende as sequências de aminoácidos de cadeia leve da SEQ ID NOs. 13 ou 15, e sequências de aminoácidos de cadeia pesada da SEQ ID NO. 14, 16, 17 ou 20.

Um anticorpo 2H7 humanizado preferido é ocrelizumab (Genentech).

O anticorpo na presente invenção pode, além disso, comprehender pelo menos uma substituição de aminoácido na região Fc que melhora atividade de ADCC, tal como aquele em que as substituições de aminoácido estão nas posições 298, 333, e 334, preferivelmente S298A, E333A, e K334A, usando-se numeração Eu de resíduos de cadeia pesada. Ver também patente US 6.737.056B1, Presta.

Qualquer um destes anticorpos pode comprehender pelo menos uma substituição na região Fc que melhora ligação de FcRn ou meia vida do soro, por exemplo, uma substituição na posição 434 da cadeia pesada, tal como N434W.

Ver também patente US 6.737.056B1, Presta.

Qualquer um destes anticorpos podem, além disso, comprehender pelo menos uma substituição de aminoácido na região Fc que aumenta atividade de CDC, por exemplo, que comprehende pelo menos uma substituição na posição

326, preferivelmente K326A ou K326W. Ver também patente US 6.528.624B1 (Idusogie *et al.*).

- Alguns variantes 2H7 humanizados são aqueles que compreendem o domínio variável leve da SEQ ID NO:2 e o domínio variável pesado da SEQ ID NO:8, incluindo aqueles com ou sem substituições em uma região Fc (se presente), e aqueles que compreendem um domínio variável pesado com alteração N100A; ou D56A e N100A; ou D56A, N100Y, e S100aR; na SEQ ID NO:8 e um domínio variável leve com alteração M32L; ou S92A; ou M32L e S92A; na SEQ ID NO:2.

M34 no domínio variável pesado de 2H7v16 foi identificado como uma fonte potencial de estabilidade do anticorpo e é outro candidato potencial para substituição.

Em um resumo de várias realizações preferidas da invenção, a região variável de variantes baseada no 2H7.v16 compreende as sequências de aminoácidos de v16 exceto nas posições de substituições de aminoácidos que estão indicadas na Tabela 3 abaixo. A menos que indicado de outra forma, os variantes 2H7 terão a mesma cadeia leve como aquela de v16.

TABELA 3

VARIANTES DE ANTICORPO 2H7 HUMANIZADO EXEMPLARES

Versão 2H7	Cadeia pesada Trocas (V _H)	Cadeia leve Trocas (V _L)	Trocas Fc
16 para referência			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	

Versão	Cadeia pesada	Cadeia leve	Trocas Fc
	2H7	Trocas (V_H)	Trocas (V_L)
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L
588	-		S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y, S100aR		S298A, E333A, K334A, K326A

Um 2H7 humanizado preferido comprehende sequência de domínio

variável leve 2H7.v16:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPFGQGTKVEIKR

5 (SEQ ID NO:2);

e sequência de domínio variável pesada 2H7.v16:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
GNGDTSYNQKFGRFTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYNSNYW
YFDVWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:8).

10 Onde o anticorpo 2H7v16 humanizado é um anticorpo intacto, ele pode compreender a sequência de aminoácido de cadeia leve:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPFGQGTKVEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT

15 EQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13);

e a sequência de aminoácido de cadeia pesada da SEQ ID NO:14 ou:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
GNGDTSYNQKFGRFTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYNSYW
YFDVWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV

- 5 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVWD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
- 10 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:17).

Outro anticorpo 2H7 humanizado preferido comprehende sequência de domínio variável leve 2H7.v511:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR

- 15 (SEQ ID NO:18)

e sequência de domínio variável pesada 2H7.v511:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
GNGATSYNQKFGRFTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSYRYW
YFDVWGQGTLTVSS (SEQ ID NO. 19).

- 20 Onde o anticorpo 2H7.v511 humanizado é um anticorpo intacto, ele pode compreender a sequência de aminoácido de cadeia leve:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

- 25 TYSLSSLTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:15)

e a sequência de aminoácido de cadeia pesada da SEQ ID NO:16 ou:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP
GNGATSYNQKFGRFTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSYRYW

YFDVWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
5 YKCKVSNAALPAPIAATISKAKGQPQREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO. 20).

Anticorpos “inibitórios do crescimento” são aqueles que previnem ou reduzem proliferação de uma célula que expressa um antígeno ao qual o anticorpo se liga. Por exemplo, o anticorpo pode prevenir ou reduzir proliferação de células B *in vitro* e/ou *in vivo*.

Anticorpos que “induzem apoptose” são aqueles que induzem morte celular, por exemplo, de uma célula B, como determinado pelos testes padrão de apoptose, tal como ligação de anexina V, fragmentação do DNA, dilatação do retículo endoplasmático, fragmentação celular e/ou formação de vesículas na membrana (chamados corpos apoptóticos).

“Anticorpos nativos” são usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compostas de duas cadeias leves idênticas (L) e duas cadeias pesadas idênticas (H). Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação bissulfeto covalente, enquanto o número de ligações bissulfeto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isótipos de imunoglobulina. Cada cadeia pesada e leve também tem regularmente pontes bissulfeto espaçadas entre cadeias. Cada cadeia pesada tem em uma terminação um domínio variável (V_H) seguida por um número de domínios constantes. Cada cadeia leve possui um domínio variável em uma terminação (V_L) e um domínio constante na sua outra terminação, o domínio constante da cadeia leve está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável da cadeia leve está alinhado com o domínio variável da cadeia pesada.

Acredita-se que resíduos de aminoácidos específicos formem uma interface entre os

domínios variáveis de cadeia leve e cadeia pesada.

O termo “variável” refere-se ao fato que certas porções do domínio variável diferenciam-se extensivamente na sequência entre anticorpos e são usadas na ligação e especificidade de cada anticorpo específico para seu 5 antígeno específico. No entanto, a variabilidade não é distribuída uniformemente por todos os domínios variáveis dos anticorpos. Ela está concentrada em três segmentos chamados regiões hipervariáveis ambos nos domínios variáveis de cadeia leve e cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são chamadas de regiões de estrutura (FRs). Os domínios 10 variáveis das cadeias leves e pesadas nativas, cada um compreende quatro FRs adotando amplamente uma configuração β -folha, conectada por três regiões hipervariáveis, na qual formam *loops* que se conectam, e em alguns casos formam parte da estrutura β -folha. As regiões hipervariáveis em cada cadeia são 15 mantidas juntas em íntima proximidade pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação do antígeno dos anticorpos. (ver Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Os domínios constantes não estão diretamente envolvidos na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções 20 efetoras, tal como participação do anticorpo na citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC).

Digestão de anticorpos por papaína produz dois fragmentos de ligação de antígeno idênticos, chamados fragmentos “Fab”, cada um com um único sítio de ligação de antígeno, e um fragmento “Fc” residual, cujo nome reflete 25 sua habilidade para cristalizar de imediato. Tratamento por pepsina rende um fragmento $F(ab')_2$ que possui dois sítios de ligação de antígeno e é ainda capaz de interligar-se ao antígeno.

“Fv” é um fragmento mínimo de anticorpo que contém um

reconhecimento de antígeno completo e sítio de ligação de antígeno. Esta região consiste de um dímero de uma cadeia pesada e um domínio variável de cadeia leve em associação não covalente estreita. É nesta configuração que as três regiões hipervariáveis de cada domínio variável interagem para definir um sítio de

5 ligação de antígeno na superfície do dímero VH-VL. Coletivamente, as seis regiões hipervariáveis conferem especificidade de ligação de antígeno ao anticorpo. No entanto, até um único domínio variável (ou metade de uma Fv que compreende somente três regiões hipervariáveis específicas para um antígeno) possui a habilidade de reconhecer e ligar-se a um antígeno, embora com

10 afinidade mais baixa que o sítio de ligação inteiro.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Fragmentos Fab' diferem de fragmentos Fab pela adição de poucos resíduos na terminação carboxila de um domínio CH1 de cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas

15 da região de dobradiça do anticorpo. Fab'-SH é a designação na presente invenção para Fab' na qual o(s) resíduo(s) cisteína(s) dos domínios constantes produz pelo menos um grupo tiol livre. Fragmentos do anticorpo F(ab')₂ originalmente foram produzidos como pares de fragmentos Fab' que possuem dobradiças cisteína entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de

20 anticorpo são também conhecidos.

As “cadeias leves” de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem ser designadas para um ou dois tipos claramente distintos, chamados kappa (κ) e lambda (λ), baseados nas sequências de aminoácidos de seus domínios constantes.

25 Dependendo da sequência de aminoácido do domínio constante de suas “cadeias pesadas”, (se presentes) os anticorpos podem ser designados para diferentes classes. Existem cinco classes principais de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e várias destas podem também ser divididas em subclasses

(isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de anticorpos são chamados de α , δ , ϵ , γ , e μ , respectivamente. As subunidades de estruturas e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

A menos que indicado de outra forma, na presente invenção a numeração dos resíduos nos domínios constantes de uma cadeia pesada de imunoglobulina é aquela do indicador EU como em Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, EU. (1991)), expressamente incorporada à presente invenção como referência. O “indicador EU como em Kabat” refere-se à numeração de resíduos do anticorpo IgG1 EU humano.

O termo “região Fc” na presente invenção é usado para definir uma região C-terminal de uma imunoglobulina de cadeia pesada, incluindo sequência nativa de regiões Fc e regiões Fc variantes. Embora os limites da região Fc de uma imunoglobulina de cadeia pesada possam variar, a região Fc de cadeia pesada IgG humana é usualmente definida por se estender de um resíduo de aminoácido na posição Cys226, ou de Pro230, até a terminação carboxila deste. A lisina C-terminal (resíduo 447 de acordo com o sistema de numeração EU) da região Fc pode ser removida, por exemplo, durante a purificação do anticorpo ou pela recombinação do ácido nucléico engenheirado que codifica uma cadeia pesada do anticorpo. Consequentemente, uma composição de anticorpos intactos pode compreender populações de anticorpo com todos os resíduos K447 removidos, populações de anticorpo sem resíduos K447 removidos, e populações de anticorpo que possuem uma mistura de anticorpos com e sem resíduos K447.

A “região Fc funcional” possui uma “função efetora” de uma região Fc de sequência nativa. “Funções efetoras” exemplares incluem ligação C1q; citotoxicidade dependente de complemento; ligação de receptor Fc; citotoxicidade

mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC); fagocitose; baixa regulação de receptores de superfície celular (por exemplo, receptor de célula B; BCR), etc. Tais funções efetoras geralmente requerem que a região Fc seja combinada com um domínio de ligação (por exemplo, um anticorpo de domínio variável) e podem 5 ser avaliadas usando-se várias análises como divulgado na presente invenção, por exemplo.

Uma “região Fc de sequência nativa” compreende uma sequência de aminoácido idêntica a uma sequência de aminoácido de uma região Fc encontrada na natureza. Regiões Fc humanas de sequência incluem uma região 10 Fc IgG1 humana de sequência nativa (alótipos A e não A); região Fc IgG2 humana de sequência nativa; região Fc IgG3 humana de sequência nativa; região Fc IgG4 humana de sequência nativa assim como naturalmente variantes das acima que ocorrem naturalmente.

Uma “região Fc variante” compreende uma sequência de aminoácido 15 que difere daquela região Fc de sequência nativa em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido, preferivelmente uma ou mais substituições de aminoácido. Preferivelmente, a região Fc variante tem pelo menos uma substituição de aminoácido comparada a uma região Fc de sequência nativa ou à região Fc de um polipeptídeo parental, por exemplo, de aproximadamente uma a 20 aproximadamente dez substituições de aminoácidos, e preferivelmente de aproximadamente uma a aproximadamente cinco substituições de aminoácidos em uma região Fc de sequência nativa ou na região Fc do polipeptídeo parental. A região Fc variante na presente invenção irá preferivelmente possuir pelo menos aproximadamente 80% de homologia com uma região Fc de sequência nativa 25 e/ou com uma região Fc de um polipeptídeo parental, e mais preferivelmente pelo menos aproximadamente 90% de homologia com esta, mais preferivelmente pelo menos aproximadamente 95% de homologia com esta.

“Citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo” e

"ADCC" referem-se à reação mediada por célula na qual células citotóxicas não específicas que expressam receptores Fc (FcRs) (por exemplo, células Natural Killer (NK), neutrófilos, e macrófagos) reconhecem o anticorpo ligado na célula atingida e subsequentemente causam lise da célula atingida. As células primárias

5 para mediação de ADCC, células NK, expressam somente FcγRIII, enquanto que monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão FcR em células hematopoiéticas está resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Para avaliar atividade de ADCC de uma molécula de interesse, um ensaio *in vitro* de ADCC, tal como descrito na patente
10 US 5.500.362 ou 5.821.337 pode ser apresentado. Células efetoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células *Natural Killer* (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, atividade ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, em um modelo animal tal como divulgado em Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

15 "Células efetoras humanas" são leucócitos que expressam um ou mais FcRs e desempenham funções efetoras. Preferencialmente, as células expressam pelo menos FcγRIII e realizam função efetora de ADCC. Exemplos de leucócitos humanos que mediam ADCC incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC), células *natural killer* (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; com PBMCs e células NK sendo preferidas.
20

Os termos "receptor Fc" ou "FcR" são usados para descrever um receptor que se liga a região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de sequência nativa. Além disso, um FcR preferido é aquele que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui subclasses dos receptores FcγRI, 25 FcγRII, e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e alternativamente formas ligadas destes receptores. Receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um "receptor de ativação") e FcγRIIB (um "receptor de inibição"), que têm sequências similares de aminoácidos que diferem primeiramente nos domínios citoplasmáticos destes.

Receptor de ativação Fc γ RIIA contém um motivo de ativação de imuno-receptor baseado em tirosina (ITAM) em seu domínio citoplasmático. Receptor de ativação Fc γ RIIA contém um motivo de inibição de imuno-receptor baseado em tirosina (ITIM) em seu domínio citoplasmático. (ver Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcRs foram revisados em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); e de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341 (1995). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são englobados pelo termo "FcR" na presente invenção. O termo também inclui o receptor neonatal, FcRn, que é responsável por transferir as IgGs maternas para os fetos e homeostase de imunoglobulina (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

"Citotoxicidade dependente de complemento" ou "CDC" refere-se à habilidade de uma molécula lisar um alvo na presença de complemento. A via de ativação de complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema complemento (C1q) para uma molécula complexa (por exemplo, um anticorpo) com um antígeno cognato. Para avaliar ativação de complemento, um teste CDC, por exemplo, como descrito em Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), pode ser realizado.

Fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia única" ou "scFv" compreendem os domínios V_H e V_L do anticorpo, em que estes domínios estão presentes em uma única cadeia de polipeptídeo. Preferivelmente, o polipeptídeo Fv, além disso, compreende um ligante polipeptídeo entre os domínios V_H e V_L que permite o scFv formar a estrutura desejada para a ligação de antígeno. Para uma revisão de scFv ver Plückthun em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg e Moore eds., Springer-Verlag, Nova York, páginas 269-315 (1994).

O termo "diacorpos" refere-se a fragmentos de anticorpo pequeno com dois sítios de ligação de antígeno, cujos fragmentos compreendem um

domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) na mesma cadeia de polipeptídeo (V_H-V_L). Pelo uso de um ligante que é muito curto para permitir pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a parear com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígeno.
5 Diacorpos estão descritos mais inteiramente em, por exemplo, patente EP 404.097; documento WO 93/11161; e Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

O termo "anticorpo monoclonal" como usado na presente invenção refere-se a um anticorpo de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos e/ou ligam-se ao(s) mesmo(s) epitopo(s), exceto por possíveis variantes que podem aparecer durante a produção do anticorpo monoclonal, tais variantes geralmente estando presentes em menores quantidades. Tal anticorpo monoclonal tipicamente inclui um anticorpo que compreende uma sequência de polipeptídeo que se liga a um alvo, em que a sequência de polipeptídeo de ligação alvo foi obtida por um processo que inclui a seleção de uma sequência de polipeptídeo de ligação alvo única de uma pluralidade de sequências de polipeptídeos. Por exemplo, o processo de seleção pode ser a seleção de um único clone de uma pluralidade de clones, tais como um grupo de clones de hibridoma, clones de fago ou clones de DNA recombinantes. Deve ser entendido que a sequência de ligação alvo selecionada pode ser também alterada, por exemplo, para melhorar a afinidade para este alvo, para humanizar a sequência de ligação alvo, para melhorar sua produção na cultura celular, para reduzir sua imunogenicidade *in vivo*, para criar anticorpo multiespecífico, etc., e que um anticorpo que compreende a sequência de ligação alvo alterada é também um anticorpo monoclonal desta invenção. Em contraste com preparações de anticorpo policlonal que tipicamente incluem diferentes anticorpos dirigidos contra

diferentes determinantes (epitopos), cada anticorpo monoclonal de uma preparação de anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antígeno. Além disso, para suas especificidades, as preparações de anticorpos monoclonais são vantajosas, pois elas são tipicamente descontaminadas de outras imunoglobulinas. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não sendo construído como produção requerida do anticorpo por qualquer método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais para serem usados de acordo com a presente invenção podem ser produzidos por uma variedade de técnicas, incluindo, por exemplo, o método de hibridoma (por exemplo., Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975); Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988); Hammerling *et al.*, em: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de DNA recombinantes (ver, por exemplo., patente US 4.816.567), tecnologias de exposição por fago (ver, por exemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee *et al.*, *J.Mol.Biol.*340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. EUA* 101(34):12467-12472 (2004); e Lee *et al.* *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), e tecnologias para produção de anticorpos humanos e similares a humanos em animais que possuem partes ou todos os *loci* de imunoglobulina ou genes que codificam sequências de imunoglobulina humana (ver, por exemplo, documento WO 1998/24893; documento WO 1996/34096; documento WO 1996/33735; documento WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); patentes US 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas da GenPharm), 5.545.807, documento WO 1997/17852, patentes US 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126; 5.633.425 e 5.661.016; Marks *et al.*,

Bio/Technology, 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Lonberg *et al.*, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); e Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

5 Os anticorpos monoclonais da presente invenção especificamente incluem anticorpos "quiméricos" (imunoglobulinas), nos quais uma porção da cadeia leve e/ou pesada é idêntica a, ou homóloga às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpo específica, enquanto o
10 restante da(s) cadeia(s) é idêntico a, ou homólogo às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma outra espécie ou pertencendo a uma outra classe ou subclasse de anticorpo, assim como fragmentos de tais anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada (patente US 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Anticorpos
15 quiméricos de interesse na presente invenção incluem anticorpos "primatizados" que compreendem sequências de ligação de antígeno de domínio variável derivadas de um primata não humano (por exemplo, Macaco do Velho Mundo, tal como babuíno, rhesus ou macaco cynomolgus) e sequências de região constante humana (patente US 5.693.780).

20 Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo, murino) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Na maior parte, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) em que resíduos de uma região hipervariável do receptor são substituídos por resíduos de uma região
25 hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho ou primata não humano tendo a desejada especificidade, afinidade e capacidade. Em alguns exemplos, resíduos da região de estrutura (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos

correspondentes não humanos. Além disto, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Estas modificações são feitas para, além disto, refinar o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado irá compreender 5 substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todos ou substancialmente todos os *loops* hipervariáveis correspondem àqueles de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FRs são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana, exceto para substituições FR como apontado acima. O anticorpo 10 humanizado opcionalmente irá também compreender pelo menos uma porção de uma região constante da imunoglobulina, tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais, ver Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

15 O termo “região hipervariável” quando usado na presente invenção refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis por ligação de antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácido de uma “região determinada por complementaridade” ou “CDR” (por exemplo, resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 20 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) e/ou aqueles resíduos de um “loop hipervariável” (por exemplo, resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 25 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). “Região de estrutura” ou resíduos “FR” são aqueles resíduos de domínio variável, exceto os resíduos de região hipervariável como definido na presente invenção.

Um "anticorpo nu" é um anticorpo (como definido na presente invenção) que não é conjugado à uma molécula heteróloga, tal como um componente citotóxico ou marca radioativa.

Um anticorpo intacto na presente invenção é aquele que 5 compreende duas regiões de ligação de antígeno, e uma região Fc. Preferivelmente, o anticorpo intacto possui uma região Fc funcional.

Um anticorpo "isolado" é aquele que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente natural. Componentes contaminantes de seu meio natural são materiais que poderiam interferir no 10 diagnóstico ou usos terapêuticos para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não-proteináceos. Em realizações preferidas, o anticorpo será purificado (1) para mais que 95% por peso de anticorpo como determinado pelo método Lowry, e mais preferivelmente mais que 99% por peso, (2) para um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de 15 N-terminal ou sequência de aminoácido interna pelo uso de um sequenciador de copo giratório, ou (3) para homogeneidade por FAGO-SDS sob condições de redução ou não redução utilizando-se Coomassie blue ou, preferivelmente, *silver stain*. Anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes, desde que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não 20 esteja presente. Normalmente, no entanto, o anticorpo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

Um anticorpo de "afinidade madura" é aquele com uma ou mais alterações em uma ou mais regiões hipervariáveis deste que resultam em um 25 aprimoramento na afinidade do anticorpo para o antígeno, comparado com um anticorpo parental que não possui aquela(s) alteração(ões). Anticorpos de afinidade madura preferidos terão afinidades nanomolar ou até afinidades picomolar para o antígeno alvo. Anticorpos de afinidade madura são produzidos por processos conhecidos na técnica. Marks *et al.* *Bio/Technology* 10:779-783

(1992) descreve a maturação da afinidade por mistura dos domínios VH e VL. Mutagênese aleatória de CDR e/ou resíduos de estrutura é descrita por: Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); e Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

5 "Tratamento" de um sujeito na presente invenção refere-se a ambos, tratamento terapêutico e profilático ou medidas preventivas. Aqueles com necessidade de tratamento incluem aqueles já com IBD assim como aqueles em que IBD será prevenida. Portanto, o paciente a ser tratado na presente invenção
10 pode ter sido diagnosticado como tendo IBD ou pode estar predisposto ou suscetível a IBD. Os termos "tratar", "tratamento" e "terapia" como usados na presente invenção referem-se à terapia preventiva (tal como, profilática), tratamento paliativo e tratamento curativo.

O termo "agente imunossupressivo" como usado na presente invenção
15 para terapia adjunta refere-se a substâncias que agem para suprimir ou mascarar o sistema imune de do sujeito sendo tratado na presente invenção. Estes agentes incluiriam substâncias que suprimem a produção de citocinas, regulam para baixo ou suprimem a auto-expressão de antígeno, ou mascaram os抗ígenos MHC. Exemplos de tais agentes incluem esteróides tais como glucocorticosteróides, por
20 exemplo, prednisona, metilprednisolona, e dexametasona; 2-amino-6-aryl-5-pirimidinas substituídas (ver patente US 4.665.077); drogas anti-inflamatórias não esteroidais (NSAIDs), ganciclovir, tacrolimus, glucocorticóides tais como cortisol ou aldosterona, agentes anti-inflamatórios tais como um inibidor ciclooxygenase, um inibidor 5-lipoxigenase, ou um antagonista do receptor leucotrieno, antagonistas de
25 purina tal como azatioprina ou micofenolato mofetil (MMF), agentes alquilantes tais como ciclofosfamida; bromocriptina; danazol; dapsona, glutaraldeído (que mascara os抗ígenos MHC, como descritos na patente US 4.120.649); anticorpos anti-idiotípicos para抗ígenos MHC e fragmentos MHC; ciclosporina; 6 mercaptopurina, esteróides

tais como corticoesteróides ou glicocorticoesteróides ou análogos de glicocorticóides, tais como, predsona, metilprednisolona, incluindo succinato de sódio de prednisolona SOLU-MEDROL®, e dexametasona, inibidores dihidrofolato redutase tal como metotrexato (oral ou subcutâneo), agentes anti-malária tais como cloroquina e hidroxicloroquina, sulfasalazina, leuflunomida, citocina ou anticorpos do receptor de citocina ou antagonistas incluindo anticorpos anti-interferon alfa, beta ou gama, anticorpos TNF-alfa do fator de necrose anti-tumor (infliximab (REMICADE®) ou adalimumab), imunoadesina anti-TNF-alfa (etanercept), anticorpos anti-TNF-beta, anticorpos anti-leucina-2 (IL-2) e anticorpos receptores anti-IL-2, e anticorpos receptores anti-interleucina-6 (IL-6) e antagonistas; anticorpos anti-LFA-1, incluindo anticorpos anti-CD11a e anti-CD18; anticorpos anti-L3T4; globulina heteróloga anti-linfócito; anticorpos pan-T, preferivelmente anticorpos anti-CD3 ou anti-CD4/CD4a; peptídeo solúvel contendo um domínio de ligação LFA-3 (documento WO 90/08187 publicado em 26 de julho de 1990); estreptoquinase; que transforma o fator de crescimento beta (TGF-beta); estreptodornase; RNA ou DNA do hospedeiro; FK506; RS-61443; clorambucil; desoxiespergualina; rapamicina; receptor de célula T (Cohen et al., patente US 5.114.721); fragmentos de receptor de célula T (Offner et al., *Science*, 251: 430-432 (1991); documento WO 90/11294; Ianeway, *Nature*, 341: 482 (1989); e documento WO 91/01133); antagonistas de BAFF tal como BAFF ou anticorpos BR3 ou imunoadesinas e antagonistas de zTNF4 (para revisão, ver Mackay e Mackay, *Trends Immunol.*, 23:113-5 (2002) e ver também definição abaixo); agentes biológicos que interferem nos sinais de células T auxiliares, tal como receptor anti-CD40 ou ligante anti-CD40 (CD154), incluindo anticorpos que bloqueiam ligação CD40-CD40 (e.g., Durie et al., *Science*, 261: 1328-30 (1993); Mohan et al., *J. Immunol.*, 154: 1470-80 (1995)) e CTLA4-Ig (Finck et al., *Science*, 265: 1225-7 (1994)); e anticorpos receptores de célula T (EP 340,109) tal como T10B9.

O termo "agente citotóxico" como usado na presente invenção refere-se a uma substância que inibe ou previne a função de células e/ou causa

destruição de células. O termo tem a intenção de incluir isótopos radioativos (por exemplo, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32 e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterápicos, e toxinas tal como toxinas de molécula pequena ou toxinas enzimáticamente ativas de origem bacteriana, 5 fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos destes.

Um "agente quimioterápico" é um componente químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem agentes alquiladores tais como tiotepa e ciclosfosfamida CYTOXAN®; alquil sulfonados tais como busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridinas tais como benzodopa, 10 carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosforamida e trimetilololmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacin e bulatacinona); delta-9-tetraidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; uma camptotecina (incluindo a sintética análoga topotecan 15 (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, scopolectina, e 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo suas análogas adozelesina, carzelesina e bizelesina sintética); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo as sintéticas análogas, KW- 20 2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictina; espongistatina; mostardas de nitrogênio tais como clorambucila, clornafazina, clolofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquin, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracil; nitrosureas tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, 25 nimustina, e ranimnustina; antibióticos tais como os antibióticos enedina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma1I e caliqueamicina ômega I1 (ver, por exemplo, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluindo dinemicina A; uma esperamicina; assim como

cromóforos de neocarzinostatina e cromóforos de antiobióticos enedina cromoproteínas relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-5 norleucina, doxorubicina (incluindo ADRIAMYCIN® morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, injeção de lipossoma HC1 doxorubicina (DOXIL®) e deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tal como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, 10 rodonubicina, streptonigrina, streptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabólitos tais como metotrexato, gencitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), uma epotilona, e 5-fluorouracil (5-FU); ácido fólico análogos tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos purina tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, 15 tioguanina; análogos de pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; anti-adrenais tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; ácido fólico restabelecedor tais como ácido folínico; aceglatona; glicosídeo de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina; bestrabucila; bisantrena; edatraxato; 20 defofamina; demecolcina; diaziquona; el fornitina; acetato de eliptinio; etoglucideo; nitrato de gálio; hidroxiurea; lentinan; ionidainina; maitansinoides tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; moidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etil hidrazida; procarbazina; complexos polissacarídeos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; 25 rizoxina; sizofirana; spirogermanio; ácido tenuazonico; triaziquona; 2,2',2"-tricloro trietyl amina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazine; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromana; gacitosina; arabinosida ("Ara-

C"); tiotepa; taxóides, por exemplo, paclitaxel (TAXOL[®]), formulação de paclitaxel de nanopartículas de albumina engenherada (ABRAXANETM), e doxetaxel (TAXOTERE[®]); cloranbucila; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos da platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina (VELBAN[®]); platina; 5 etoposide (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN[®]); oxaliplatina; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE[®]); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inibidor topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinóides tais como ácido retinóico; sais farmaceuticamente aceitáveis, ácidos ou derivados de qualquer dos acima; assim como combinações de dois ou 10 mais dos acima tais como CHOP, uma abreviação para uma terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisolona, e FOLFOX, uma abreviação para um regime de tratamento com oxaliplatina (ELOXATINTM) combinado com 5-FU e leucovorina.

Também incluídos nesta definição estão os agentes anti-hormonais 15 que agem para regular, reduzir, bloquear, ou inibir os efeitos de hormônios que podem promover o crescimento de câncer, e estão frequentemente na forma de sistêmico, ou tratamento do corpo inteiro. Eles podem ser os próprios hormônios. Exemplos incluem anti-estrógenos e moduladores seletivos do receptor de estrógeno (SERMs), incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo tamoxifen 20 NOLVADEX[®]), raloxifeno (EVISTA[®]), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, e toremifene (FARESTON[®]); anti-progesteronas; baixos reguladores de receptores de estrógeno (ERDs); antagonistas de receptores do estrógeno tal como fulvestrante (FASLODEX[®]); agentes de função de supressão ou fechamento dos ovários, por exemplo, 25 hormônio luteinizante que libera hormônios agonistas (LHRH) tais como acetato de leuprorelin (LUPRON[®] e ELIGARD[®]), acetato de goserelina, acetato de buserelina e triptorelin; outros anti-androgênicos tais como flutamida, nilutamida e bicalutamida; e inibidores aromatase que inibem a enzima aromatase, a qual

regula a produção de estrógeno na glândula adrenal, tais como, por exemplo, 4(5)-imidazolas, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MEGASE[®]), exemestano (AROMASIN[®]), formestano, fadrozola, vorozola (RIVISOR[®]), letrozola (FEMARA[®]), e anastrozola (ARIMIDEX[®]). Além disto, tal definição de agentes quimioterápicos inclui bisfosfonatos tais como clodronato (por exemplo, BONEFOS[®] ou OSTAC[®]), etidronato (DIDROCAL[®]), NE-58095, ácido zoledrônico/zoledronato (ZOMETA[®]), alendronato (FOSAMAX[®]), pamidronato (AREDIA[®]), tiludronato (SKELID[®]), ou risedronato (ACTONEL[®]); assim como troxacicatina (uma 1,3-dioxolana nucleosídeo citosina análoga); oligonucleotídeos anti-sentido, em específico aqueles que inibem expressão de genes nas vias de sinalização implicadas na proliferação celular anormal, tais como, por exemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, e receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R); vacinas tais como vacina THERATOPE[®] e vacinas de terapia de gene, por exemplo, vacina ALLOVECTIN[®], vacina LEUVECTIN[®], e vacina VAXID[®]; inibidor topoisomerase 1 (por exemplo, LURTOTECAN[®]); rmRH (por exemplo, ABARELIX[®]); lapatinib ditosilato (uma ErbB-2 e inibidor de molécula pequena de tirosina quinase EGFR duplo também conhecido como GW572016); e sais farmaceuticamente aceitáveis, ácidos ou derivados de qualquer um dos acima.

O termo “citocina” é um termo genérico para proteínas liberadas por uma população de células que agem em outra célula como mediadoras intercelulares. Exemplos de tais citocinas são linfocinas, monocinas; interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, incluindo PROLEUKIN[®] rIL-2 e IL-4 humana e mutantes de IL-4 humana, tais como, por exemplo, um mutante que contém uma mutação na região de IL-4 que está envolvida na ligação com IL-2R gamma, por exemplo, Arg 21 é trocada por um resíduo Glu; fator de necrose tumoral tal como TNF-α ou TNF-β; e outros fatores polipeptídicos incluindo LIF e kit ligante (KL). Como usado na presente invenção, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura celular

recombinante e equivalentes ativos biologicamente de citocinas de sequência nativa, incluindo entidades de molécula pequena produzidas sinteticamente e sais e derivados destes farmaceuticamente aceitáveis.

O termo "hormônio" refere-se a hormônios polipeptídicos, que são

5 geralmente secretados por órgãos glandulares com dutos.. Incluídos entre os hormônios estão, por exemplo, hormônios de crescimento tais como hormônios de crescimento humano, hormônio de crescimento humano N-metionil, hormônios de crescimento bovino; hormônio da paratireóide, tiroxina; insulina; pró-insulina; relaxina; estradiol; terapia de reposição hormonal; andrógenos tais como
10 calusterona, propionate de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, ou testolactona; prorelaxina; hormônios glicoproteína tais como hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio estimulante da tireóide (TSH), e hormônio luteinizante (LH); prolactina, lactogênio placentário, peptídeo associado a gonadotrofina de camundongo, hormônio de liberação de gonadotrofina; inibina;
15 activina; substância de inibição mulleriana; e trombopoietina. Como usado na presente invenção, o termo hormônio inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura celular recombinante e equivalentes ativos biologicamente de hormônios de sequência nativa, incluindo entidades de molécula pequena produzidas sinteticamente e sais e derivados destes farmaceuticamente aceitáveis.

20 O termo "fator de crescimento" refere-se a proteínas que promovem crescimento, e incluem, por exemplo, fator de crescimento hepático; fator de crescimento do fibroblasto, fator de crescimento endotelial vascular; fator de crescimento do nervo tal como NGF-β; fator de crescimento derivado de plaqueta; fatores de crescimento de transformação (TGFs) tais como TGF-α e TGF-β; fator
25 de crescimento I e II similar a insulina; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferons tais como interferon α, β e γ; e fatores que estimulam colônias (CSFs) tais como macrófagos CSF (M-CSF); granulócito-macrófago-CSF (GM-CSF); e granulócito-CSF (G-CSF). Como usado na presente invenção, o termo fator de

crescimento inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura celular recombinante e equivalentes ativos biologicamente de fator de crescimento de sequência nativa, incluindo entidades de molécula pequena produzidas sinteticamente e sais e derivados destes farmaceuticamente aceitáveis.

5 O termo "integrina" refere-se a uma proteína receptora que permite às células tanto se ligarem como responderem à matriz extracelular e está envolvida em uma variedade de funções celulares tais como cicatrização, diferenciação celular, correção de rumo de células tumorais e apoptose. Elas são parte de um grande família de receptores celulares adesina que estão envolvidos
10 na matriz extracelular e interações célula-célula. Integrinas funcionais consistem de duas sub-unidades de glicoproteína de transmembrana, chamadas alfa e beta, que não são ligadas covalentemente. Todas as sub-unidades alfa compartilham alguma homologia entre si, como também as sub-unidades beta. Os receptores sempre contêm uma cadeia alfa e uma cadeia beta. Exemplos
15 incluem Alfa6beta1, Alfa3beta1, Alfa7beta1, LFA-1 etc. Como usado na presente invenção, o termo "integrina" inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura celular recombinante e equivalentes ativos biologicamente de integrinas de sequência nativa, incluindo entidades de molécula pequena produzidas sinteticamente e sais e derivados destes farmaceuticamente aceitáveis.

20 Para os propósitos da presente invenção, "fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa)" refere-se a uma molécula TNF-alfa que compreende a sequência de aminoácido como descrito em Pennica *et al.*, *Nature*, 312:721 (1984) ou Aggarwal *et al.*, *JBC*, 260:2345 (1985). O "inibidor de TNF-alfa" na presente invenção é um agente que inibe, de certa forma, uma função biológica de TNF-
25 alfa, geralmente através de ligação a TNF-alfa e neutralizando sua atividade. Exemplos de inibidores TNF especificamente contemplados na presente invenção são etanercept (ENBREL®), infliximab (REMICADE®) e adalimumab (HUMIRA™).

Exemplos de "drogas anti-reumáticas modificadoras de doença" ou

"DMARDs" incluem hidroxicloroquina, sulfasalazina, metotrexato, leflunomida, etanercept, infliximab, azatioprina, D-penicilamina, sais de ouro (oral), sais de ouro (intramuscular), minociclina, ciclosporina incluindo ciclosporina A e ciclosporina tópica, Proteína A stafilocóccia., (Goodyear e Silverman, *J. Exp. Med.*, 197, (9), p1125-39 (2003)), incluindo sais e derivados destes, etc.

Exemplos de "drogas anti-inflamatórias não esteroidais " ou "NSAIDs" incluem aspirina, ácido acetil salicílico, ibuprofen, naproxen, indometacina, sulindac, tolmetina, inibidores de COX-2 tais como celecoxib (CELEBREX®; 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il) benzenesulfonamida e valdecoxib (BEXTRA®), e meloxicam (MOBIC®), incluindo sais e derivados destes, etc.

Exemplos de "anticorpos ou antagonistas de integrina" na presente invenção incluem um anticorpo LFA-1, tal como efalizumab (RAPTIVA®) comercialmente disponível por meio da Genentech, ou um anticorpo integrina alfa 4 tal como natalizumab (ANTEGREN®) disponível por meio da Biogen, ou derivados de fenilalanina diazacíclica (documento WO 2003/89410), derivados de fenilalanina (documento WO 2003/70709, documento WO 2002/28830, documento WO 2002/16329 e documento WO 2003/53926), derivados do ácido fenilpropiónico (documento WO 2003/10135), derivados de enamina (documento WO 2001/79173), derivados do ácido propanóico(WO 2000/37444), derivados do ácido (documento WO 2000/32575), derivados fenil substituídos (patente US 6.677.339 e 6.348.463), derivados amina aromáticas (patente US 6.369.229), polipeptídeos do domínio disintegrina ADAM (patente US 2002/0042368), anticorpos para alfavbeta3 integrina (patente EP 633945), derivados do aminoácido bicíclico com pontes aza (documento WO 2002/02556), etc.

"Corticoesteróides" referem-se a qualquer uma de diversas substâncias sintéticas ou que ocorrem naturalmente com a estrutura química geral de esteróides que imitam ou aumentam os efeitos dos corticoesteróides que

ocorrem naturalmente. Exemplos de corticoesteróides sintéticos incluem prednisona, prednisolona (incluindo metilprednisolona, tal como SOLU-MEDROL® succinato de sódio de metilprednisolona), dexametasona ou dexametasona triancinolona, hidrocortisona, e betametasona. Os corticoesteróides preferidos da 5 presente invenção são prednisona, metilprednisolona, hidrocortisona ou dexametasona.

Como usado na presente invenção, o termo "quantidade eficaz" tem a intenção de se referir a uma quantidade de anticorpo ou antagonista que é eficaz para tratar IBD. Quantidades eficazes são tipicamente determinadas pelo 10 efeito que elas possuem comparado ao efeito observado quando uma composição que não inclui ingrediente ativo (isto é, um controle) é administrada a um indivíduo em situação similar.

Uma "bula" refe-se a instruções incluídas como de costume em embalagens comerciais de produtos terapêuticos que contêm informações sobre 15 as indicações, uso, dosagem, administração, contra indicações, outros produtos terapêuticos a serem combinados com o produto embalado, e/ou advertências referentes ao uso de tais produtos terapêuticos, etc.

Um "medicamento" é uma droga ativa para tratar IBD ou seus sintomas ou efeitos colaterais.

20 **II. TERAPIA DE IBD**

A presente invenção fornece um método para tratar IBD em um sujeito humano que compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um anticorpo (ou antagonista) que se liga a um marcador de superfície de célula B, tal como CD20.

25 Em particular, a invenção fornece um método para tratar doença inflamatória do intestino moderada-severa (IBD) em um sujeito humano que compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um anticorpo CD20 (ou antagonista), em que a administração do anticorpo (ou antagonista) resulta

em uma resposta clínica ou remissão da doença.

Tal administração pode também reduzir células B na mucosa colônica, placas de Peyer, tecidos linfóides secundários ou órgãos tais como linfonodos e baço, e sangue, mas especialmente a mucosa colônica do sujeito.

5 A IBD pode ser colite ulcerativa (UC), ou doença de Crohn, mas preferivelmente UC. O sujeito tratado na presente invenção pode ter IBD ativa, UC ativa ou doença de Crohn ativa. Geralmente, o sujeito tratado terá IBD moderada-severa, UC moderada-severa ou doença de Crohn moderada-severa.

Além disso, o sujeito pode ter IBD refratária a esteróide e/ou 10 dependente de esteróide, UC refratária a esteróide e/ou dependente de esteróide ou doença de Crohn refratária a esteróide e/ou dependente de esteróide.

Sujeitos tratados na presente invenção podem: ter tido diagnose de IBD ≥ 6 meses na seleção; ter ≥ 20 cm de doença ativa na seleção de sigmoidoscopia; ter doença ativa como definido por uma pontuação DAI entre ≥ 6 15 e ≤ 11 , com ≥ 2 para sangramento retal e ≥ 2 sigmoidoscopiaflexível; ter sido tratado com corticoesteróides oral para UC dentro de 2 anos antes da seleção; ter sido tratado com uma intensidade maior que uma dose equivalente de prednisona de 20 mg/dia por pelo menos 2 semanas de duração; ser resistente ou refratário a etanercept, infliximab ou adalimumab; ter sido tratado com uma dose estável de 20 20 aminosalicilato por ≥ 3 semanas; ter sido tratado com doses estáveis de corticoesteróide oral por ≥ 2 semanas; ter sido tratado com 6-MP par um período de 3 meses, e com uma dose estável deste por ≥ 4 semanas; ter sido tratado com azatioprina por um período de 3 meses, com um dose estável por ≥ 4 semanas.

O padrão de tratamento para sujeitos com UC ativa moderada- 25 severa envolve terapia com doses padrão de: um aminosalicilato, um corticoesteróide oral, 6-mercaptopurina (6-MP) e/ou azatioprina. A terapia com um anticorpo CD20 como divulgado na presente invenção irá resulatr em uma melhora na remissão da doença (rápido controle da doença e/ou remissão

prolongada), e/ou resposta clínica, superior àquela alcançada com a padrão de tratamento para tais sujeitos.

A administração do anticorpo pode resultar na remissão da doença, por exemplo, onde a remissão da doença é alcançada em aproximadamente 8 semanas. Preferivelmente, o tempo de remissão da doença é menor do que aquele alcançado em um sujeito que não é tratado com o anticorpo CD20. Além disso, preferivelmente, o tempo de duração de remissão da doença é maior do que aquele alcançado em um sujeito que não é tratado com o anticorpo CD20. Por exemplo, a duração de remissão da doença pode ser por pelo menos 24 semanas, e preferivelmente por pelo menos 48 semanas, e mais preferivelmente por pelo menos aproximadamente 2 anos, do tratamento inicial ou a partir do alcance de remissão. Remissão pode ser definida como uma pontuação de sigmoidoscopia de 0 a 1, e/ou pontuação de sangramento retal de 0.

A administração do anticorpo pode resultar em uma resposta clínica, por exemplo, onde a resposta clínica é alcançada em aproximadamente 8 semanas. A resposta clínica na presente invenção pode ser definida como uma redução na pontuação do índice de atividade da doença (DAI), por exemplo, redução de tal pontuação maior ou igual a 3 pontos.

Em uma realização, o sujeito nunca foi tratado anteriormente com um anticorpo CD20. Preferivelmente, o sujeito não está sofrendo de uma malignidade de célula B. O sujeito é também preferivelmente aquele que não está sofrendo de uma doença auto-imune, exceto IBD, UC ou doença de Crohn.

É também fornecido um método para redução de uma pontuação do índice de atividade da doença (DAI) em um sujeito humano com colite ulcerativa ativa (UC) que compreende administrar um anticorpo CD20 ao sujeito em uma quantidade eficaz para reduzir a pontuação DAI. Preferivelmente, o sistema de pontuação DAI é como na Tabela 2 na presente invenção, e a administração do anticorpo CD20 reduz tal pontuação DAI para mais ou igual a 3 pontos.

Além disso, o método envolve tratamento de doença inflamatória do intestino ativa (IBD) em um sujeito humano com anticorpo citoplasmático antineutrófilo perinuclear (p-ANCA) e /ou nível(is) de auto-anticorpo isoforma 5 tropomiosina anti-humana (hTM5) A administração de um anticorpo CD20 para o 5 sujeito reduz eficazmente p-ANCA e /ou nível(is) do anticorpo anti-hTM5 no sujeito.

A dose exata será determinada pelo médico de acordo com os padrões aceitos, levando em conta a natureza e severidade da condição a ser tratada, o tipo de antagonista ou anticorpo, as características do sujeito, etc. A 10 determinação da dose está dentro do nível dos técnicos no assunto. Preferivelmente o anticorpo é administrado sistematicamente, intravenosamente ou subcutaneamente. Dependendo da rota e método de administração, o antagonista ou anticorpo pode ser administrado em uma dose única, como uma infusão prolongada, ou intermitentemente por um período de tempo. A 15 administração intravenosa será geralmente por injeção de *bolus* ou infusão por um período típico de uma a várias horas. Formulações de liberação contínua podem ser empregadas.

Em uma realização preferida, o método compreende administração de uma ou mais doses na faixa de aproximadamente 200 mg a 2000 mg, 20 preferivelmente aproximadamente 500 mg a 1500 mg, e mais preferivelmente aproximadamente 750 mg a 1200 mg. Por exemplo, uma a quatro doses, ou somente uma ou duas doses podem ser administradas. De acordo com esta realização, o anticorpo pode ser administrado dentro de um período de aproximadamente um mês, preferivelmente dentro de um período de 25 aproximadamente 2 a 3 semanas, e mais preferivelmente dentro de um período de aproximadamente duas semanas.

Onde mais do que uma dose é administrada, a última dose (por exemplo, segunda ou terceira dose) é preferivelmente administrada de

aproximadamente 1 a 20 dias, mais preferivelmente de aproximadamente 6 a 16 dias, e mais preferivelmente de aproximadamente 14 a 16 dias a partir do tempo em que a dose anterior foi administrada. As doses separadas são preferivelmente administradas dentro de um período total entre aproximadamente 1 dia a 4

5 semanas, mais preferivelmente entre aproximadamente 1 a 20 dias (por exemplo, dentro de um período de 6-18 dias). Cada dose separada do anticorpo é preferivelmente aproximadamente 200 mg a 2000 mg, preferivelmente aproximadamente 500 mg a 1500 mg, e mais preferivelmente aproximadamente 750 mg a 1200 mg.

10 Como apontado acima, no entanto, estas quantidades sugeridas de antagonista ou anticorpo estão sujeitas a uma quantidade maior de discrição terapêutica. O fator chave na seleção de uma dose apropriada e programação é o resultado obtido, como indicado acima. Por exemplo, doses relativamente mais altas podem ser necessárias inicialmente para o tratamento de IBD ativa. Uma

15 dose subsequente pode ser maior que uma dose anterior. Para se obter resultados mais eficazes, o antagonista ou anticorpo é geralmente administrado tão próximo quanto possível do primeiro sinal, diagnóstico, aparência ou ocorrência da doença ou disfunção ou durante remissões da doença ou disfunção.

20 Portanto, a invenção fornece um método para tratar doença inflamatória do intestino (IBD) em um sujeito humano com IBD ativa que compreende administrar somente uma ou duas doses de um anticorpo CD20 ao sujeito, em que a remissão da doença ou resposta é alcançada pela administração de uma ou duas doses do anticorpo CD20. Preferivelmente tais

25 uma ou duas doses são administradas intravenosamente (IV), ou subcutaneamente (SQ). Onde as duas doses intravenosas são administradas, preferivelmente cada uma das duas doses está na faixa de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 2000 mg.

O antagonista ou anticorpo da invenção é administrado por qualquer meio adequado, incluindo parenteral, subcutâneo, intraperitoneal, inalação, intratecal, intra-articular e intranasal, e se desejado para tratamento local imunosupressivo, administração intralesional. Infusões parenterais incluem 5 intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou administração subcutânea. Além disso, o antagonista ou anticorpo pode adequadamente ser administrado por infusão de pulso, por exemplo, com declínio de doses do antagonista ou anticorpo. Preferivelmente, a dosagem é dada por injeções, mais preferivelmente injeções intravenosas ou sub-cutâneas, dependendo em parte se 10 a administração é breve ou crônica.

O sujeito pode ser tratado novamente com o antagonista ou anticorpo, como sendo dado mais do que uma exposição ou conjunto de doses, tal que pelo menos aproximadamente duas exposições do antagonista ou anticorpo, por exemplo, de aproximadamente 2 a 60 exposições, e mais 15 particularmente aproximadamente 2 a 40 exposições, mais particularmente aproximadamente, 2 a 20 exposições.

Em uma realização, qualquer retratamento pode ser dado quando sinais ou sintomas da doença retornam, quando o sujeito não está mais em remissão, e/ou quando p-ANCA ou os níveis do auto-anticorpo anti-hTM5 20 aumentam, etc.

Em outra realização, qualquer retratamento pode ser dado em intervalos definidos. Por exemplo, exposições subsequentes podem ser administradas em vários intervalos, tal como, por exemplo, aproximadamente 24-28 semanas ou 48-56 semanas ou mais. Preferivelmente, tais exposições são 25 administradas em intervalos de aproximadamente 24-26 semanas ou aproximadamente 38-42 semanas, ou aproximadamente 50-54 semanas.

Em uma realização, cada exposição de antagonista ou anticorpo é fornecida como uma dose única do antagonista ou anticorpo. Em uma realização

alternativa, cada exposição de antagonista ou anticorpo é fornecida como uma dose separada do anticorpo. No entanto, nem toda exposição de antagonista ou anticorpo precisa ser fornecida como uma dose única ou como doses separadas.

O antagonista preferido é um anticorpo. Nos métodos apresentados

- 5 na presente invenção, o anticorpo CD20 pode ser um anticorpo nu ou pode ser conjugado com outra molécula tal como um agente citotóxico ou citocina. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo intacto nú. O anticorpo CD20 preferido na presente invenção é um anticorpo CD20 quimérico, humanizados ou humano, mais preferivelmente rituximab, 2H7 humanizado, 2F2 (Hu-Max-CD20)
- 10 anticorpo CD20 humano (Genmab), e anticorpo A20 humanizado (Immunomedics). Ainda mais preferido é rituximab ou 2H7 humanizado.

Em uma realização adicional de todos os métodos da presente invenção, o sujeito nunca foi previamente tratado com droga(s), tal como um agente que trata IBD, e/ou nunca foi previamente tratado com um antagonista ou 15 anticorpo para um marcador de superfície de célula B (por exemplo, nunca foi previamente tratado com um anticorpo CD20).

Em qualquer um dos métodos da presente invenção, pode ser administrado ao sujeito junto com o antagonista ou anticorpo que se liga a um marcador de superfície de célula B, uma quantidade eficaz de um segundo 20 medicamento (onde o antagonista ou anticorpo que se liga a um marcador de superfície de célula B (por exemplo, o anticorpo CD20) é um primeiro medicamento). O tipo de tal segundo medicamento depende de vários fatores, incluindo o tipo de IBD, a severidade de IBD, a condição e idade do sujeito, o tipo e dose do primeiro medicamento empregado, etc.

25 Exemplos de tais medicamentos adicionais ou outras terapias incluem outros agentes que tratam IBD, como um agente quimioterápico, uma droga da classe interferon tal como interferon-alfa (por exemplo, da Amarillo Biosciences, Inc.), IFN-beta-1a (REBIF® e AVONEX®) ou IFN-beta-1b

(BETASERON[®]), um oligopeptídeo tal como acetato de glatiramer (COPAXONE[®]), um agente de bloqueio de ligação CD40-CD40, um agente citotóxico (tal como mitoxantrona (NOVANTRONE[®]), metotrexato, ciclofosfamida, clorambucil, leflunomida, e azatioprina), um ou mais agentes imunosupressivos (por exemplo, 5 azatioprina, 6-mercaptopurina, ciclosporina), imunoglobulina intravenosa (gama globulina), terapia de depleção de linfócito (por exemplo, mitoxantrona, ciclofosfamida, anticorpos CAMPATHTM, anti-CD4, cladribina), uma construção de polipeptídeo com pelo menos dois domínios que compreendem um antígeno de-imunizado auto-reactivo ou seu fragmento que é especificamente reconhecido 10 pelos receptores Ig de células B auto-reactivas (documento WO 2003/68822), irradiação total do corpo, transplante de medulla óssea, antagonista ou anticorpo integrina (por exemplo, um anticorpo LFA-1 tal como efalizumab (RAPTIVA[®]) comercialmente disponível pela Genentech, ou um anticorpo alfa 4 integrina tal como natalizumab (ANTEGREN[®]) disponível pela Biogen Idec, ou outros como 15 apontado acima), esteróide tal como corticoesteróide (por exemplo, metilprednisolona tal como SOLU-MEDROLTM succinato de sódio de metilprednisolona para injeção, prednisona tal como baixa dose de prednisona, dexametasona, ou glucocorticóides, incluindo terapia de corticoesteróide sistêmica), terapia imunosupressiva de depleção de não linfócitos (tal como, MMF 20 ou ciclosporina), drogas que abaixam o colesterol da classe "estatina" (que incluem cerivastatina (BAYCOLTM), fluvastatina (LESCOLTM), atorvastatina (LIPITORTM), lovastatina (MEVACORTM), pravastatina (PRAVACHOLTM), e simvastatina (ZOCORTM)), estradiol, testosterona (opcionalmente em doses elevadas; Stuve *et al.* *Neurology* 8:290–301 (2002)), andrógeno, terapia de 25 reposição hormonal, um inibidor de TNF tal como etanercept (ENBREL[®]), infliximab (REMICADE[®]), e adalimumab (HUMIRATM), droga anti-reumática modificadora da doença (DMARD), droga anti-inflamatória não esteroidal (NSAID), plasmaferese ou troca plasmática, trimetoprim-sulfametoxazola (BACTRIMTM,

SEPTRATM), mcofenolato mofetil, bloqueadores de H2 ou inibidores de bomba de próton (durante o uso da terapia imunosupressiva potencialmente ulcerogênica), levotiroxina, ciclosporina A (por exemplo, SANDIMMUNE®), análogo de somatostatina, citocina, citocina ou anticorpo receptor de citocina ou antagonista, 5 anti-metabólito, cirurgia ou colectomia para reabilitação, radio iodo, tireoidectomia, antagonista de BAFF tal como BAFF ou anticorpos BR3 ou imunoadesinas, receptor anti-CD40 ou ligante anti-CD40 (CD154), antagonista ou anticorpo receptor anti-IL-6, anticorpo anti-IL-2 tal como daclizumab, outro antagonista ou anticorpo de superfície de célula B tal como um 2H7 humanizado ou outro 10 anticorpo CD20 humano ou humanizado com rituximab, corticoesteróide oral (por exemplo, dentro de 2 anos antes do tratamento inicial com o anticorpo ou antagonista CD20), prednisona (por exemplo, dose equivalente de prednisona de 20 mg/dia por pelo menos 2 semanas de duração), etanercept, infliximab, adalimumab, aminosalicilato (por exemplo, doses estáveis para ≥3 weeks), 15 corticoesteróides orais (por exemplo, doses estáveis para ≥2 weeks), 6-MP (por exemplo, tratamento para um período de 3 meses, com uma dose estável para ≥4 weeks), azatioprina (por exemplo, tratamento para um período de 3 meses, com uma dose estável para ≥4 semanas), inibidor de calcineurin, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, metotrexato, micofenolato mofetil, preparação retal tópica, 20 terapia de depleção de célula não biológica tal como ADACOLUMN®, antibiótico, antidiarréico, ligante de ácido biliar tal como colestiramina, 5-ASA oral e/ou tópico, esteróide oral e/ou tópico, MLN-02, mesalamina, creme de cortisona, enema de hidrocortisona, sulfasalazina, alsalazina, balsalazida metilprednisolona, hidrocortisona, ACTH, corticoesteróides intravenosos, GELTEX™ (Genzyme), 25 anticorpo anti-CD3 tal como visilizumab (NUVION®), OPC-6535, CBP 1011, talidomida, ISIS 2302, BXT-51072, um fator de crescimento tal como fator-2 de crescimento de queratinócito (KGF-2; REPIFERMIN™), RPD-58, antegren, FK-506, etc.

Medicamentos secundários preferidos incluem, um, dois, três ou quatro de: um aminosalicilato, um corticoesteróide oral, 6-mercaptopurina (6-MP) e/ou azatioprina.

Em um método preferido de "combinação de terapia" na presente invenção, a invenção relaciona-se a um método para tratar doença inflamatória do intestino (IBD) em um sujeito humano com IBD ativa que compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um anticorpo CD20 e também compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um segundo medicamento selecionado do grupo que consiste de um aminosalicilato, um corticoesteróide oral, 6-mercaptopurina (6-MP) e azatioprina.

Todos estes medicamentos secundários podem ser usados em combinação entre si ou com o primeiro medicamento, de modo que a expressão "segundo medicamento" como usado na presente invenção não significa que é o único medicamento além do primeiro medicamento, respectivamente. Dessa forma, o segundo medicamento precisa ser um medicamento, mas pode constituir ou compreender mais do que tal droga.

Estes medicamentos secundários como apresentados na presente invenção são geralmente usados na mesma dose e com rotas de administração como usado anteriormente ou cerca de 1 a 99% das doses até agora empregadas. Se tais medicamentos secundários são usados, opcionalmente eles são usados em baixas quantidades como se o primeiro medicamento não estivesse presente, especialmente nas doses subsequentes depois da dose inicial com o primeiro medicamento, de modo que elimine ou reduza os efeitos colaterais causados pela terapia. Por exemplo, a terapia com um anticorpo CD20 na presente invenção permite administração diminuída ou descontinuada do esteróide.

A administração combinada na presente invenção inclui co-administração, usando-se formulações separadas ou uma formulação

farmacêutica única, e a administração consecutiva em qualquer ordem, em que preferivelmente exista um período de tempo enquanto ambos (ou todos) os agentes ativos simultaneamente exerçam suas atividades biológicas.

Para o método de retratamento na presente invenção, onde um segundo medicamento é administrado em uma quantidade eficaz com um conjunto de dose de anticorpo, pode ser administrado com qualquer conjunto de dose, por exemplo, somente com um conjunto de doses, ou com mais do que um conjunto de doses. Em uma realização, o segundo medicamento é administrado com o conjunto inicial de doses. Em outra realização, o segundo medicamento é administrado com o conjunto inicial e secundário de doses. Em ainda uma realização adicional, o segundo medicamento é administrado com todos os conjuntos de doses.

A administração combinada de um segundo medicamento inclui co-administração (administração simultânea), usando-se formulações separadas ou uma formulação farmacêutica única, e a administração consecutiva em qualquer ordem, em que preferivelmente exista um período de tempo enquanto ambos (ou todos) os agentes ativos (medicamentos) simultaneamente exerçam suas atividades biológicas.

O anticorpo ou antagonista na presente invenção é administrado por qualquer meio adequado, incluindo parenteral, tópico, subcutâneo, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal e/ou administração intralesional. Infusões parenterais incluem intramuscular, intravenosa (i.v), intra-arterial, intraperitoneal ou administração subcutânea. Administração intratecal é também contemplada (ver, por exemplo, patente US 2002/0009444, Grillo-Lopez, *A conceming intrathecal delivery of a CD20 antibody*). Além disso, o anticorpo ou antagonista pode adequadamente ser administrado por infusão de pulso, por exemplo, com declínio de doses do anticorpo ou antagonista. Preferivelmente, a dose é dada intravenosamente ou subcutaneamente e mais preferivelmente por infusão intravenosa.

Se múltiplos conjuntos de dose de anticorpo são fornecidos, cada conjunto de dose pode ser fornecido usando-se o mesmo ou diferente meio de administração. Em uma realização, cada conjunto de doses é por administração intravenosa. Em outra realização, cada conjunto de doses é dado por 5 administração subcutânea. Em ainda outra realização, os conjuntos de doses são dados tanto por administração intravenosa como subcutânea, e os anticorpos podem ser o mesmo ou diferentes.

Segue uma discussão de métodos de produção, modificação e formulação de tais antagonistas e anticorpos.

10

III. PRODUÇÃO DE ANTAGONISTAS E ANTICORPOS

Os métodos e artigos de fabricação da presente invenção usam, ou incorporam um antagonista ou anticorpo que se liga a um marcador de superfície de célula B. Consequentemente, métodos para gerar tais antagonistas ou anticorpos serão descritos aqui.

15

O marcador de superfície de célula B a ser usado para a produção ou seleção de anticorpos pode ser, por exemplo, uma forma solúvel do antígeno ou uma porção deste, que contém o epitopo desejado. Alternativamente ou adicionalmente, células que expressam o marcador de superfície de célula B em sua superfície celular são usadas para gerar ou selecionar antagonistas ou 20 anticorpos. Outras formas de marcador de superfície de célula B úteis para geração de antagonistas ou anticorpos serão aparente para aqueles técnicos no assunto. Preferivelmente, o marcador de superfície de célula B é o antígeno CD20.

25

Enquanto o antagonista preferido é um anticorpo, antagonistas exceto anticorpos estão contemplados na presente invenção. Por exemplo, o antagonista pode compreender uma molécula pequena antagonista opcionalmente ligada ou conjugada a um agente citotóxico (tal como aquele descrito na presente invenção). Bibliotecas de moléculas pequenas podem ser

selecionadas contra o marcador de superfície de célula B de interesse na presente invenção, com o objetivo de identificar uma molécula pequena que se liga a esse antígeno. A molécula pequena pode também ser selecionada para suas propriedades antagonísticas e/ou conjugada com um agente citotóxico.

O antagonista pode também ser um peptídeo gerado pelo projeto racional ou por exposição por fago (ver, por exemplo, documento WO 98/35036 publicado em 13 de agosto de 1998). Em uma realização, a molécula de escolha pode ser uma "CDR mímica" ou anticorpo análogo projetado baseado nas CDRs de um anticorpo. Enquanto tais peptídeos podem ser antagonísticos por si mesmos, o peptídeo pode opcionalmente ser ligado a um agente citotóxico tal que adicione ou aumente as propriedades antagonísticas do peptídeo.

Segue uma descrição como técnicas exemplares para a produção dos anticorpos usados de acordo com a presente invenção.

(I) ANTICORPOS POLICLONAS

Anticorpos policlonais são preferivelmente cultivados em animais por múltiplas injeções subcutânea (sc) ou intraperitoneal (ip) do antígeno relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antígeno relevante a uma proteína que é imunogênica na espécie a ser imunizada, por exemplo, hemocianina keyhole limpet, soro de albumina, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina de soja utilizando-se um agente bifuncional ou de derivação, por exemplo, éster sulfosuccinimida maleimidobenzoil (conjugação através de resíduos cisteína), N-hidroxysuccinimida (através de resíduos lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl₂, ou R¹N=C=NR, onde R e R¹ são grupos alquil diferentes.

Os animais são imunizados contra o antígeno, conjugados imunogênicos, ou derivados por combinação, por exemplo, 100 µg ou 5 µg de proteína ou conjugado (para coelhos ou camundongos, respectivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injetando a solução por via intradérmica em múltiplos locais. Um mês depois os animais são estimulados

com 1/5 a 1/10 da quantidade original do peptídeo ou conjugado em adjuvante completo de Freund por injeção subcutânea em múltiplos locais. Sete a 14 dias depois os animais são sangrados e o soro é analisado por titulação de anticorpo. Animais são estimulados até a titulação platô. Preferivelmente, o animal é estimulado com o conjugado do mesmo antígeno, mas conjugado com uma proteína diferente e/ou através de um reagente de interligação diferente. Conjugados também podem ser feitos na cultura celular recombinante como proteína de fusão. Também, agentes de agregação tal como álumen são adequadamente usados para aprimorar a resposta imune.

10 **(II) ANTICORPOS MONOCLONais**

Anticorpos monoclonais são obtidos de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos exceto pela possível ocorrência natural de mutações que podem estar presentes em menores quantidades. Dessa forma, 15 o modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos distintos.

Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser feitos usando-se o método de hibridoma primeiro descrito por Kohler *et al.* *Nature*, 256:495 (1975), ou podem ser feitos por métodos de DNA recombinante (patente US. 4.816.567).

20 No método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como hamster, é imunizado na forma descrita acima para gerar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que irão ligar-se especificamente à proteína utilizada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Linfócitos são então 25 fundidos com uma linhagem de células de mieloma, utilizando-se um agente de fusão apropriado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas. 59-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma preparadas desta forma são semeadas e cultivadas em meio de cultura apropriado que contém preferivelmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais não contêm a enzima hipoxantino guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura selecionado para os hibridomas irá incluir tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que evitam o crescimento de células com deficiência de HGPRT.

Células de mieloma preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, apóiam a produção de anticorpos estáveis em alto nível pelas células produtoras de anticorpos selecionadas e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. Entre estas, linhagens celulares de mieloma preferidas são linhagens de mieloma murino, tais como aquelas derivadas de tumores de camundongos MOPC-21 e MPC-11 disponíveis por meio do Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia, Estados Unidos, e SP-2 ou células X63-Ag8-653 disponíveis por meio da Coleção Americana de Tipos de Cultura, Manassas, Virgínia, Estados Unidos. Linhagens celulares de mieloma humano e heteromieloma humano de camundongos também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova York, 1987)).

O meio de cultura no qual as células de hibridoma estão crescendo é testado para determinar a produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno. Preferivelmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por meio de imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado por enzimas (ELISA).

A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo,

ser determinada por meio da análise Scatchard de Munson *et al.*, *Anal.Biochem.*, 107:220 (1980).

Após células de hibridoma serem identificadas para produção de anticorpos de especificidade desejada, afinidade e/ou atividade, os clones podem 5 ser subclonados por procedimentos de diluição limitantes e cultivados por métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas. 59-103 (Academic Press, 1986)). Meio de cultura adequado para este propósito inclui, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores de ascite em um animal.

10 Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascite ou soro por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencional, tais como, por exemplo, proteína A sefarose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálises ou cromatografia de afinidade.

15 Os anticorpos monoclonais também podem ser produzidos de forma recombinante. O DNA que codifica os anticorpos monoclonais é facilmente isolado e sequenciado utilizando-se procedimentos convencionais (por exemplo, pelo uso de sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligar especificamente aos genes que codificam as cadeias leve e pesada de anticorpos 20 murinos). As células de hibridoma servem como uma fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são transfetados em seguida em células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células de COS de símios, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) ou células de mieloma que, de outra forma, não produzem proteína de imunoglobulina, para 25 obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Os artigos de revisão sobre expressão recombinante em bactérias de DNA que codificam o anticorpo incluem Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) e Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

Em uma realização adicional, anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fagos geradas usando-se técnicas descritas em McCafferty *et al.* *Nature* 348:552-554 (1990). Clackson *et al.* *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos murinos e humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fago. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (variação nM) pela mistura de cadeia (Marks *et al.* *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), assim como infecções combinatórias e recombinação *in vivo*, como uma estratégia para a construção de bibliotecas de fago muito grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Desta forma, essas técnicas são alternativas viáveis para técnicas de hibridoma de anticorpos monoclonais tradicionais para o isolamento de anticorpos monoclonais.

O DNA pode ser também modificado, por exemplo, pela substituição das sequências de codificação de domínios constantes de cadeia leve e cadeia pesada humana no lugar das sequências de murino homólogas (patente US 4.816.567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)) ou por ligação covalente para toda ou parte da sequência codificadora de imunoglobulina a um polipeptídeo não imunoglobulina.

Tipicamente tais polipeptídeos de não-imunoglobulina são substituídos pelo domínio constante de um anticorpo, ou eles são substituídos pelo domínio variável de um sítio de combinação de um anticorpo para criar um anticorpo bivalente quimérico que compreende um sítio de combinação de antígeno que tem especificidade para um antígeno e outro sítio de combinação de antígeno que tem especificidade para um antígeno diferente.

(III) ANTICORPOS HUMANIZADOS

Métodos para humanização de anticorpos não humanos foram descritos na técnica. Preferivelmente, um anticorpo humanizado possui um ou

mais resíduos de aminoácidos nele introduzidos a partir de uma fonte que não é humana. Estes resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente referidos como resíduos "importados", que são tipicamente retirados de um domínio variável "importado". A humanização pode ser essencialmente 5 apresentada seguindo o método de Winter e colaboradores (*Jones et al. Nature*, 321:522-525 (1986); *Riechmann et al. Nature*, 332:323-327 (1988); *Verhoeyen et al. Science* 239:1534-1536 (1988)), pela substituição de sequências de região hipervariável para as sequências correspondentes de um anticorpo humano. Consequentemente, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos 10 (patente US 4.816.567) em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos de região hipervariável e possivelmente alguns resíduos FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de 15 roedores.

A escolha de domínios variáveis humano, tanto leve como pesado, para serem usados na fabricação de anticorpos humanizados é muito importante para reduzir antigenicidade. De acordo com o método também conhecido como "melhor ajuste", a sequência de domínio variável de um anticorpo de roedor é 20 selecionada em relação à completa biblioteca das sequências de domínio variável humana conhecida. A sequência humana que é a mais próxima daquela de roedor é então aceita como a região de estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (*Sims et al., J. Immunol.*, 151:2296 (1993); *Chothia et al., J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Outro método utiliza uma região de estrutura específica 25 derivada da sequência consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo específico de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser utilizada para vários anticorpos humanizados diferentes (*Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 4285 (1992); *Presta et al., J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

É, além disto, importante que anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com um método preferido, anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das 5 seqüências parentais e vários produtos humanizados conceituais que usam modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Modelos de imunoglobulina tridimensional estão comumente disponíveis e são familiares para aqueles técnicos no assunto. Programas de computador estão disponíveis, os quais ilustram e exibem possíveis estruturas de conformação tridimensional das 10 sequências de imunoglobulina candidata selecionada. A inspeção destas exibições permite a análise do papel provável no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que influenciam na habilidade da imunoglobulina candidata ligar-se ao seu antígeno. Desta maneira, resíduos FR podem ser selecionados e combinados das sequências do receptor e 15 importada de forma que a característica do anticorpo desejada, tal como aumento de afinidade para o antígeno(s) alvo, é atingida. Em geral, resíduos de região hipervariável são diretamente e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação do antígeno.

(IV) ANTICORPOS HUMANOS

20 Como uma alternativa para humanização, podem ser gerados anticorpos humanos. Por exemplo, agora é possível produzir animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, mediante imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência da produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito 25 que a deleção homozigótica do gene (J_H) da região de ligação da cadeia pesada do anticorpo em camundongos de linhagem de origem mutante e quimérico resulta na inibição completa da produção de anticorpo endógeno. A transferência da linhagem de origem humana do conjunto de gene de imunoglobulina em tal

camundongo de linhagem de origem mutante irá resultar na produção de anticorpos humanos mediante desafio com抗ígenos. Ver, por exemplo, Jakobovits *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.* *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.* *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); e patentes US 5.591.669, 5.589.369 e 5.545.807. Alternativamente, tecnologia de exibição por fago (McCafferty *et al.* pode ser utilizada para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpos *in vitro* a partir de repertórios de genes de domínio variável (V) de imunoglobulina de doadores não imunizados. De acordo com esta técnica, os genes do domínio V do anticorpo são clonados em quadro tanto em um gene de proteína de revestimento maior como menor de um bacteriófago filamento, tal como M13 ou fd, e exibidos na forma de fragmentos de anticorpos funcionais sobre a superfície da partícula de fago. Como a partícula filamentosa contém uma cópia de DNA de fita simples do genoma de fago, as seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam na seleção do gene que codifica o anticorpo que exibe aquelas propriedades. Dessa forma, o fago imita algumas das propriedades da célula B. A exibição por fago pode ser realizada em uma série de formatos; para sua revisão, ver, por exemplo, Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Diversas fontes de segmentos de gene V podem ser utilizadas para exibição por fago. Clackson *et al.* *Nature*, 352:624-628 (1991) isolaram um conjunto diverso de anticorpos anti-oxazolona a partir de uma pequena biblioteca combinatória aleatória de genes V derivados de baços de camundongos imunizados. Um repertório de genes V de doadores humanos não imunizados pode ser construído e anticorpos para um conjunto diverso de抗ígenos (incluindo auto-抗ígenos) podem ser isolados seguindo-se essencialmente as técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), ou Griffith *et al.* *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Ver, também, patentes US 5.565.332 e 5.573.905.

Anticorpos humanos podem também ser gerados por células B

ativadas *in vitro* (ver patentes US 5.567.610 e 5.229.275).

(v) FRAGMENTOS DE ANTICORPOS

Foram desenvolvidas várias técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados via digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, por exemplo, Morimoto *et al.* *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); e Brennan *et al.* *Science*, 229:81 (1985)). Entretanto, esses fragmentos podem ser agora produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fago discutidas acima. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH podem ser recuperados diretamente de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.* *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, fragmentos de F(ab')₂ podem ser isolados diretamente a partir da cultura de células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos serão evidentes para os técnicos no assunto. Em outras realizações, o anticorpo da seleção é um fragmento Fv de cadeia única (scFv). Ver documento WO 93/16185; Patente US 5.571.894; e Patente US 5.587.458. O fragmento de anticorpo pode também ser um "anticorpo linear", por exemplo, como descrito na patente US 5.641.870, por exemplo. Tais fragmentos de anticorpo linear podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

(vi) ANTICORPOS BIESPECÍFICOS

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois epitopos diferentes. Anticorpos biespecíficos exemplares podem se ligar a dois epítópos diferentes do marcador de superfície de célula B. Outros tais anticorpos podem se ligar a um primeiro marcador e também se ligar a um segundo marcador de superfície de célula B. Alternativamente, um braço do marcador de superfície de célula B pode ser combinado com um braço que se liga a uma molécula acionadora em um

leucócito como uma molécula receptora de célula T (por exemplo, CD2 ou CD3), ou receptores Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16) assim como focalizar o mecanismo de defesa celular para a célula

- B. Anticorpos biespecíficos podem também ser usados para localizar agentes
5 citotóxicos para a célula B. Estes anticorpos possuem um braço que se liga ao marcador de célula B e um braço que se liga ao agente citotóxico (por exemplo, saporina, anti-interferon- α , alcalóide da vinca, ricina de cadeia A, metotrexato ou hapteno de isótopo radioativo). Anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpos (por exemplo,
10 anticorpos biespecíficos F(ab')₂).

Métodos de fabricação de anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. A produção tradicional de anticorpos biespecíficos de comprimento total é baseada na co-expressão de dois pares de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina, em que as duas cadeias possuem especificidades diferentes
15 (Millstein *et al.* *Nature* 305:537-539 (1983)). Devido à seleção aleatória de cadeias leve e pesada de imunoglobulina, esses hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de dez moléculas de anticorpos diferentes, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta, que é normalmente realizada por meio de etapas de cromatografia de afinidade, é
20 um tanto problemática, e os rendimentos de produto são baixos. Procedimentos similares são divulgados no documento WO 93/08829 e em Traunecker *et al.* *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991).

De acordo com uma abordagem diferente, domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação de
25 anticorpos e抗原) são fundidos a sequências de domínio constante de imunoglobulina. Preferencialmente, a fusão é com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, que compreende pelo menos parte das regiões de dobradiça, CH2 e CH3. É preferível ter a primeira região constante de cadeia

pesada (CH_1) contendo o sítio necessário para a ligação de cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. Os DNAs que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados, e são co-transfetados em um 5 organismo hospedeiro adequado. Isso fornece grande flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos de polipeptídeo em realizações quando razões desiguais das três cadeias de polipeptídeo utilizadas na construção fornecerem os rendimentos ótimos. É, no entanto, possível inserir as sequências de codificação para duas ou todas as três cadeias de polipeptídeos em um vetor 10 de expressão único quando a expressão de pelo menos duas cadeias de polipeptídeo em razões iguais resultarem em altos rendimentos ou quando as razões não forem de significância específica.

Em uma realização preferida desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos de uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com 15 uma primeira especificidade de ligação em um braço e um par de cadeias leve e cadeia pesada de imunoglobulina híbrida (que fornece uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Concluiu-se que essa estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado de combinações de cadeia de imunoglobulina indesejadas, pois a presença de cadeia leve de imunoglobulina em 20 apenas uma metade da molécula biespecífica fornece uma maneira fácil de separação. Esta abordagem é descrita no documento WO 94/04690. Para maiores detalhes de geração de anticorpos biespecíficos, ver, por exemplo, Suresh *et al.* *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acordo com outra abordagem descrita na Patente US 5.731.168, 25 a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser engenheirada para maximizar a porcentagem de heterodímeros que são recuperados da cultura celular recombinante. A interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio $\text{C}_\text{H}3$ de um domínio constante do anticorpo. Neste método, uma ou mais

cadeias laterais de aminoácidos pequenos da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas com cadeias laterais maiores (por exemplo, tirosina ou triptofano). “Cavidades” compensatórias de tamanho idêntico ou similar à(s) cadeia(s) lateral(is) grande(s) são criadas sobre a interface da segunda molécula 5 de anticorpo, pela substituição de grandes cadeias laterais de aminoácidos com cadeias menores (por exemplo, alanina ou treonina). Isso fornece um mecanismo de aumento do rendimento do heterodímero sobre outros produtos finais indesejados, tais como homodímeros.

Anticorpos biespecíficos incluem anticorpos interligados ou 10 “heteroconjugados”. Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado à avidina e o outro à biotina. Tais anticorpos, por exemplo, foram propostos para atingir células do sistema imunológico a células indesejadas (Patente US 4.676.980), e para o tratamento de infecções por HIV (documento WO 91/00360, documento WO 92/200373 e patente EP 03089). Anticorpos 15 heteroconjugados podem ser fabricados utilizando-se qualquer método de interligação conveniente. Os agentes de interligação apropriados são bem conhecidos na técnica e estão descritos na patente US 4.676.980, juntamente com uma série de técnicas de interligação.

As técnicas de geração de anticorpos biespecíficos a partir de 20 fragmentos de anticorpos também foram descritas na literatura. Por exemplo, anticorpos biespecíficos podem ser preparados utilizando-se ligações químicas. Brennan *et al.* *Science* 229: 81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intactos são proteolicamente clivados para gerar fragmentos F(ab')₂. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante ditiol 25 arsenato de sódio para estabilizar ditióis próximos e prevenir formação bissulfeto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados são então convertidos para derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados do Fab'-TNB é então reconvertido para o Fab'-tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado

com uma quantidade equimolar do outro derivado do Fab'-TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser usados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

Recente progresso facilitou a recuperação direta de fragmentos de 5 Fab'-SH de *E. coli*, que podem ser acoplados quimicamente para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) descreve a produção de uma molécula completa do anticorpo biespecífico humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' foi separadamente secretado de *E. coli* e sujeito a acoplamento químico direcionado *in vitro* para formar o anticorpo 10 biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de ligar-se a células que superexpressam o receptor ErbB2 e células T humanas normais, assim como acionar a atividade lítica dos linfócitos citotóxicos humanos contra 15 alvos de tumor de mama humano.

Diversas técnicas de fabricação e isolamento de fragmentos de 15 anticorpos biespecíficos diretamente de cultura celular recombinante também foram descritas. Por exemplo, anticorpos biespecíficos foram produzidos utilizando-se Zíper de Leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Os peptídeos de zíper de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados 20 às porções Fab' de dois anticorpos diferentes por fusão de gene. Os homodímeros de anticorpos foram reduzidos na região de dobradiça para formarem monômeros e então reoxidados para formarem os heterodímeros de anticorpo. Este método também pode ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia de "diacorpos" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) forneceu um mecanismo 25 alternativo para fabricação de fragmentos de anticorpos biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) por um ligante que é muito curto para permitir o pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia.

Consequentemente, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a parear-se com os domínios V_L e V_H complementares de outro fragmento, através disto, formando dois sítios de ligação de抗ígenos. Outra estratégia de fabricação de fragmentos de anticorpos biespecíficos pelo uso de dímeros Fv de cadeia única

5 (sFv) também foi relatada. Ver Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Anticorpos com mais de duas valências são contemplados. Por exemplo, anticorpos triespecíficos podem ser preparados. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

IV. CONJUGADOS E OUTRAS MODIFICAÇÕES DO ANTAGONISTA OU ANTICORPO

10 O antagonista ou anticorpo usado nos métodos ou incluídos nos artigos de fabricação da presente invenção é opcionalmente conjugado ao agente citotóxico, tal como um agente citotóxico ou citocina (por exemplo, IL2, ver por exemplo, documento WO 2005/016969).

A conjugação irá normalmente ser alcançada através de uma ligação covalente, a natureza precisa desta irá ser determinada pela molécula alvo e o sítio de ligação no antagonista CD20 ou anticorpo polipeptídico. Tipicamente, um agente não peptídico é modificado pela adição de um ligante que permite conjugação ao antagonista ou anticorpo CD20 através de suas cadeias laterais de aminoácidos, cadeias de carboidratos, ou grupos reativos introduzidos no antagonista de CD20 ou anticorpo pela modificação química. Por exemplo, uma droga pode ser anexada através do grupo ϵ -amino de um resíduo lisina, através de um grupo α -amino livre, por troca de bissulfeto para um resíduo cisteína, ou pela oxidação de 1,2- diols em uma cadeia de carboidrato com ácido periódico para permitir junção de drogas que contêm vários nucleófilos através de uma ligação Schiff-base. Ver, por exemplo, patente U.S.4.256.833. Agentes que modificam proteína incluem reagentes amino-reativos (por exemplo, ésteres reativos, isotiocianatos, aldeídos, e sulfonil halidos), reagentes tiol-reativos (por exemplo, derivados de haloacetil e maleimidas), e reagentes ácido carboxílico e

aldeído-reativos. Polipeptídeos antagonistas de CD20 ou anticorpos podem ser ligados covalentemente aos agentes peptídicos através do uso de reagentes de interligação bifuncionais. Reagentes heterobifuncionais são mais comumente utilizados e permitem o acoplamento controlado de duas proteínas diferentes

5 através do uso de dois componentes reativos diferentes (por exemplo, amino-reativo mais tiol, iodoacetamida ou meleimida). O uso de tais agentes de ligação é bem conhecido na técnica. Ver, por exemplo, Brinkley, acima, e patente US 4.671.958. Ligantes peptídicos podem também ser empregados. Como alternativa, um polipeptídeo antagonista de CD20 ou anticorpo pode ser ligado a

10 um componente peptídico através da preparação de um polipeptídeo de fusão.

Exemplos de agentes de acoplamento de proteína de bifuncionais tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados de imidoésteres bifuncionais (tal como dimetil adipimidato HCl), ésteres ativos (tal como disuccinimidil suberato), aldeídos (tal como glutaraldeído), bis-azido combinados (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanediamina), derivados de bis-diazônio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6-diisocianato), e compostos de flúor bis-ativo (tal como 1,5-diflúor-2,4-dinitrobenzeno).

20 Alternativamente, uma proteína de fusão que compreende o antagonista ou anticorpo e agente citotóxico pode ser feita, por exemplo, por técnicas recombinantes ou síntese de pepitídeo.

Outras modificações do antagonista ou anticorpo estão contempladas na presente invenção. Por exemplo, o antagonista ou anticorpo pode ser ligado a um de uma variedade de polímeros não proteináceos, por exemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol, polioxialquilenos, ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol.

Os antagonistas ou anticorpos divulgados na presente invenção

também podem ser formulados como imunolipossomos. Lipossomos que contêm o antagonista ou anticorpo são preparados pelos métodos conhecidos na técnica, tal como descrito em Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); patentes US. 5 4.485.045 e 4.544.545; e documento WO 97/38731 publicado em 23 de outubro de 1997. Lipossomos com tempo de circulação aumentada estão divulgados na patente US 5.013.556.

Lipossomos particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídeo que compreende fosfatidicolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Lipossomos são retirados através de filtros com tamanho de poro definido para produzir lipossomos com o diâmetro desejado. Fragmentos Fab' do anticorpo da presente invenção podem ser conjugados aos lipossomos como descrito em Martin *et al.* *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) através de uma reação de intecâmbio de bissulfeto. Um agente quimioterápico está opcionalmente contido dentro do lipossomo. Ver Gabizon *et al.* *J. National Cancer Inst.* 81(19)1484 (1989).

Modificações da sequência de aminoácido de proteínas ou peptídeos antagonistas ou anticorpos descritos na presente invenção são contempladas. Por exemplo, pode ser desejável aprimorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do antagonista ou anticorpo. Sequências de amino ácidos variantes do antagonista ou anticorpo são preparadas pela introdução apropriada de trocas de nucleotídeos no ácido nucléico do antagonista ou anticorpo ou por síntese de pepitídeo. Tais modificações incluem, por exemplo, deleções dos resíduos, e/ou inserções e/ou substituições nas sequências de aminoácido do antagonista ou anticorpo. Qualquer combinação de deleção, inserção, e substituição são feitas para se chegar à construção final, provendo que a construção final possua as características desejadas. As trocas de aminoácido também podem alterar processos pós-tradução do antagonista ou anticorpo, tal

como troca do número ou posição dos sítios de glicolisação.

Um método útil para identificação de certos resíduos ou regiões do antagonista ou anticorpo que estão em localizações preferidas para mutagênese é chamado “mutagênese de varredura de alanina” como descrito por Cunningham e 5 Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos alvos são identificados (por exemplo, resíduos carregados tais como arg, asp, his, lys, e glu) e substituídos por um aminoácido carregado negativamente ou neutro (mais preferivelmente alanina ou polialanina) para afetar a interação de 10 aminoácidos com antígeno. Essas localizações de aminoácidos que demonstram sensibilidade funcional para as substituições então são refinadas pela introdução, além disto, ou outras variantes no, ou para, os sítios de substituições. Consequentemente, enquanto o sítio para a introdução da variação de sequência 15 de aminoácido é pré-determinado, a natureza da mutação por si mesma não precisa ser pré-determinada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação em um dado sítio, varredura de ala ou mutagênese aleatória é conduzida no códon ou região alvo e os antagonistas ou anticorpos variantes expressados são selecionados para a atividade desejada.

Inserções de sequência de aminoácidos incluem fusões amino e/ou carboxi-terminal variando em comprimento de um resíduo para polipeptídeos que 20 contêm uma centena ou mais de resíduos, assim como inserções intrasequência de simples ou múltiplos resíduos de aminoácido. Exemplos de inserções terminais incluem um antagonista ou anticorpo com um resíduo metionil N-terminal ou o antagonista ou anticorpo fundido a um polipeptídeo citotóxico. Outras inserções 25 variantes da molécula do antagonista ou anticorpo incluem a fusão para o N ou C-terminal do anticorpo de uma enzima, ou um polipeptídeo que aumenta a meia-vida do soro do antagonista ou anticorpo.

Outro tipo de variante é uma variante de substituição do aminoácido. Estas variantes têm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula do

antagonista ou anticorpo substituído por um resíduo diferente. Os sítios de maior interesse para mutagênese substitucional dos anticorpos antagonistas incluem as regiões hipervariáveis, mas alterações FR também são contempladas. Substituições conservativas são mostradas na Tabela 4 sob o título de "substituições preferidas". Se tais substituições resultam em uma troca na atividade biológica, então mais trocas substanciais, denominadas "substituições exemplares" na Tabela 4 ou também como descritas abaixo na referência para classes de aminoácido, podem ser introduzidas e os produtos selecionados.

TABELA 4

Resíduo Original	Substituições Exemplares	Substituições 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)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; Norleucina	leu

Modificações substanciais nas propriedades biológicas do antagonista ou anticorpo são realizadas por seleções de substituições que diferem significantemente em seus efeitos na manutenção (a) da estrutura do esqueleto do polipeptídeo na área de substituição, por exemplo, como uma conformação folha ou helicoidal (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo ou (c) da massa da cadeia lateral. Resíduos que ocorrem naturalmente podem ser divididos em grupos baseados em propriedades comuns das cadeias laterais:

- (1) hidrofóbica: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílica neutra: cys, ser, thr;
- (3) acídica: asp, glu;
- (4) básica: asn; gln; his, lys; arg;
- (5) resíduos que influenciam na orientação da cadeia: gly, pro; e
- (6) aromática: trp, tyr, phe.

Substituições não conservativas irão conferir troca de um membro de uma destas classes por outra classe.

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação apropriada do antagonista ou anticorpo também pode ser substituído, geralmente com serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e prevenir interligação anormal. De modo oposto, cisteína(s) ligada(s) pode ser adicionada ao antagonista ou anticorpo para melhorar sua estabilidade (particularmente onde o antagonista ou anticorpo é um fragmento de anticorpo tal como um fragmento Fv).

Um tipo de variante substitucional particularmente preferida envolve substituição de um ou mais resíduos de região hipervariável de um anticorpo parental. Geralmente, a variante(s) resultante(s) selecionada(s) para posterior desenvolvimento terá propriedades biológicas melhoradas relativas ao anticorpo parental a partir do qual elas são geradas. Uma maneira conveniente para gerar tais variantes substitucionais é maturação de afinidade usando-se exibição por

fago. Resumidamente, diversos sítios de região hipervariável (por exemplo, sítios 6-7) são mutados para gerar todas as possíveis substituições de aminoácido em cada sítio. Os anticorpos variantes dessa forma gerados são exibidos em uma forma monovalente a partir de partículas de fago filamentoso como fusões para o 5 gene III produto de M13 empacotado no interior de cada partícula. As variantes de fago exibidas são então selecionadas para suas atividades biológicas (por exemplo, afinidade de ligação) como divulgado na presente invenção. Com o objetivo de identificar candidatos para sítios de região hipervariável para modificações, pode ser realizada mutagênese de varredura de alanina para 10 identificar resíduos de região hipervariável que contribuem significantemente para ligação do antígeno. Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar uma estrutura cristalina do complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e o antígeno. Tais resíduos de contato e 15 resíduos vizinhos são candidatos para substituições de acordo com as técnicas elaboradas na presente invenção. Uma vez que tais variantes são geradas, as variantes do painel são sujeitas à seleção como descrito na presente invenção e anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes podem ser selecionados para posterior desenvolvimento.

Outro tipo de aminoácido variante do antagonista ou anticorpo altera 20 o padrão de glicosilação original do antagonista ou anticorpo. Pela alteração é intencionado deletar um ou mais componentes carboidratos encontrados no antagonista ou anticorpo, e/ou adicionar um ou mais sítios de glicosilação que não estão presentes no antagonista ou anticorpo.

Glicosilação de polipeptídeos é tipicamente tanto N-ligado como O- 25 ligado. N-ligado refere-se à conexão do componente carboidrato à cadeia lateral de um resíduo asparagina. As sequências de tripeptídeo asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, são sequências de reconhecimento para conexão enzimática do componente

carboidrato para a cadeia lateral asparagina. Dessa forma, a presença de ambas sequências de tripeptídeos em um polipeptídeo cria um sítio de glicosilação potencial. Glicosilação O-ligado refere-se à conexão de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose, ou xilose a um hidroxi-aminoácido, mais 5 comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina podem também ser usadas.

A adição de sítios de glicosilação ao antagonista ou anticorpo é convenientemente realizada por alteração da sequência de aminoácido, tal como aquela que contém um ou mais das sequências de tripeptídeos descritas acima (para 10 sítios de glicosilação N-ligado). A alteração pode também ser feita por adição de, ou substituição de, um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do antagonista ou anticorpo original (para sítios de glicosilação O-ligado).

Onde o antagonista ou anticorpo compreende uma região Fc, o carboidrato conectado a este pode ser alterado. Por exemplo, anticorpos com 15 uma estrutura de carboidrato madura que é desprovida de fucose conectada a uma região Fc do anticorpo estão descritos no pedido de patente US 2003/0157108 A1, Presta, L. Ver também patente US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Anticorpos com uma N-acetylglucosamina dividida (GlcNAc) no carboidrato conectado a uma região Fc do anticorpo estão referidos 20 no documento WO 03/011878, Jean-Mairet *et al.* e patente US 6.602.684 Umana *et al.* Anticorpos com pelo menos um resíduo galactose no oligossacarídeo conectado a uma região Fc do anticorpo estão relatados no documento WO 97/30087, Patel *et al.* Ver, também, documento WO 98/58964 (Raju, S.) e documento WO 99/22764 (Raju, S.) que relaciona anticorpos com carboidrato 25 alterado inserido à região Fc deste.

A variante de glicosilação preferida da presente invenção compreende uma região Fc, em que uma estrutura de carboidrato ligada à região Fc desprovida de fucose. Tais variantes possuem função ADCC melhorada.

Opcionalmente, a região Fc também compreende uma ou mais substituições de aminoácidos que também melhoram ADCC, por exemplo, substituições nas posições 298, 333 e/ou 334 da região Fc (numeração de resíduos Eu). Exemplos de tais publicações relacionadas a anticorpos "defucosilados" ou "deficientes em fucose" incluem: pedido de patente US 2003/0157108 A1, Presta, L; documento WO 00/61739A1; documento WO01/29246A1; patente US 2003/0115614A1; patente US 2002/0164328A1; patente US 2004/0093621A1; patente US 2004/0132140A1; patente US 2004/0110704A1; patente US 2004/0110282A1; patente US 2004/0109865A1; documento WO 03/085119A1; documento WO 10 03/084570A1; Okazaki *et al.* *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Exemplos de linhagens celulares que produzem anticorpos defucosilados incluem células Lec13 CHO deficientes em proteína de defucosilação (Ripka *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); pedido de patente US 2003/0157108 A1, Presta, L; e documento WO 15 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente no Exemplo 11), e linhagens celulares knockout, tal como gene alfa-1,6-fucosiltransferase, *FUT8*, células CHO knockout (Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Moléculas de ácido nucléico que codificam sequências variantes do antagonista ou anticorpo são preparadas por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, mas não são limitados a, isolamento de uma fonte natural (no caso de ocorrer sequência variante de aminoácido naturalmente) ou preparação por mutagênese de oligonucleotídeo mediada (ou sítio-dirigida), mutagênese de PCR e mutagênese cassette de uma variante preparada anteriormente ou uma versão não-variante do antagonista ou 20 anticorpo.

Pode ser desejável modificar o antagonista ou anticorpo da invenção com relação à função efetora, por exemplo, para aumentar citotoxicidade mediada por célula dependente de antígeno (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de

complemento (CDC) do antagonista ou anticorpo. Isto pode ser alcançado pela introdução de uma ou mais substituições em uma região Fc de um anticorpo antagonista ou anticorpo. Alternativamente ou adicionalmente, resíduo(s) de cisteína pode ser introduzido na região Fc, através disso permitindo formação de 5 ponte bisulfeto entre cadeias nesta região. O anticorpo homodimérico dessa forma gerado pode ter melhorado a capacidade de internalização e/ou aumento de morte celular mediada por complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Ver Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) e Shope, B. J. *Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Anticorpos homodiméricos com atividade 10 anti-tumor aumentada podem também ser preparados usando-se interligantes heterobifuncionais como descrito em Wolff *et al.* *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, um anticorpo que possui regiões Fc dupla pode ser engenheirado e pode através disso ter aumento de capacidades de lise de complemento e de ADCC. Ver Stevenson *et al.* *Anti-Cancer Drug Design* 3:219- 15 230 (1989).

Documento WO 00/42072 (Presta, L.) descreve anticorpos com função ADCC melhorada na presença de células efetoras humanas, onde os anticorpos compreendem substituições de aminoácidos na região Fc deste. Preferivelmente, o anticorpo com ADCC melhorada compreende substituições 20 nas posições 298, 333 e/ou 334 da região Fc (numeração de resíduos Eu). Preferivelmente, a região Fc alterada é uma região Fc IgG1 humana que compreende ou que consiste de substituições em uma, duas ou três destas posições. Tais substituições são opcionalmente combinadas com substituições que aumentam ligação C1q e/ou CDC.

Anticorpos com ligação C1q alterada e/ou citotoxicidade dependente 25 de complemento (CDC) estão descritos no documento WO 99/51642, patente US 6.194.551B1, patente US 6.242.195B1, patente US 6.528.624B1 e patente US 6.538.124 (Idusogie *et al.*). Os anticorpos compreendem uma substituição de

aminoácido em uma ou mais das posições do aminoácido 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 e/ou 334 da região Fc destes (numeração de resíduos Eu). Substituições de um ou mais resíduos nas posições 326, 327, 333 e/ou 334 podem melhorar ligação C1q e/ou função CDC.

5 Para aumentar a meia vida do soro do anticorpo, alguém pode incorporar um epitopo de ligação do receptor de resgate no anticorpo (especialmente um fragmento de anticorpo) como descrito na Patente US 5.739.277, por exemplo. Como usado na presente invenção, o termo "epitopo de ligação do receptor de resgate" refere-se a um epitopo da região Fc de uma 10 molécula IgG (por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, ou IgG₄) que é responsável por aumentar *in vivo* a meia vida do soro da molécula de IgG.

Anticorpos com ligação melhorada para o receptor Fc neonatal (FcRn), e meia vida do soro aumentada estão também descritos no documento WO 00/42072 (Presta, L.) e patente US 2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estes 15 anticorpos compreendem uma região Fc com uma ou mais substituições neste que melhoraram ligação da região Fc a FcRn. Por exemplo, a região Fc pode ter substituições em uma ou mais posições 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 or 434 (numeração de resíduos Eu). O anticorpo variante que compreende a região 20 Fc preferida com ligação FcRn melhorada compreende substituições de aminoácidos em uma, duas ou três das posições 307, 380 e/ou 434 da região Fc (numeração de resíduos Eu).

Anticorpos engenheirados com três ou mais (preferivelmente quatro) 25 sítios de ligação antígeno funcional estão também contemplados (pedido US 2002/0004587 A1, Miller *et al.*).

V. FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Formulações terapêuticas dos antagonistas ou anticorpos usados de acordo com a presente invenção são preparadas para armazenamento pela

mistura do antagonista ou anticorpo que tem o grau desejado de purificação com veículos opcionais farmaceuticamente aceitáveis, excipientes ou estabilizantes, (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos aceitáveis, excipientes ou estabilizantes não tóxicos para receptores nas dosagens e concentrações empregadas, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tal como octadecildimetilbenzil cloreto de amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, butil ou álcool benzil; alcila parabenos tais como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos que aproximadamente 10 resíduos); proteínas, tais como soro de albumina, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; formação de sais de contra íons tais como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexo proteína Zn); e/ou surfactantes não-iônicos tais como TWEENTM, PLURONICSTM ou polietileno glicol (PEG).

Formulações de anicorpo anti-CD20 exemplares estão descritas no documento WO 1998/56418. Esta publicação descreve uma formulação líquida multidose que compreende 40 mg/ml d rituximab, 25 mM de acetato, 150 mM de trealose, 0,9% de álcool benzil, 0,02% de polisorbato 20 em pH 5,0 que tem uma vida mínima de armazenamento em prateleira de dois anos a 2-8°C. Outra formulação de anticorpo anti-CD20 de interesse compreende 10mg/ml de rituximab em 9,0 mg/ml de cloreto de sódio, 7,35 mg/ml de diidrato citrato de sódio, 0,7 mg/ml de polisorbato 80 e água estéril para injeção, pH 6,5.

Formulações liofilizadas adaptadas para administração subcutânea

estão descritos na patente US 6.267.958 (Andya et.al). Tais formulações liofilizadas podem ser reconstituídas com um diluente adequado para uma alta concentração de proteína e a formulação reconstituída pode ser administrada subcutaneamente para o sujeito a ser tratado na presente invenção.

5 A formulação da presente invenção pode também conter mais que um componente ativo (como segundo medicamento como apontado acima) como necessário, preferivelmente aqueles com atividades complementares que não afetem contrariamente um ao outro. O tipo e quantidades eficazes de tais medicamentos dependem, por exemplo, da quantidade de antagonista ou
10 anticorpo presente na formulação, e parâmetros clínicos dos sujeitos sendo tratados. Tais medicamentos preferidos estão apontados abaixo.

Os ingredientes ativos podem também ser colocados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de acumulação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de
15 gelatina e microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de distribuição coloidal de droga (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas estão divulgadas em *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a edição, Osol, A. Ed. (1980).

20 Preparações de liberação contínua podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação contínua incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contêm o antagonista ou anticorpo, cujas matrizes estão na forma de artigos modelados, por exemplo, filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação contínua incluem
25 poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(vinilálcool)), polilactídeos (patente US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinil não degradável, copolímeros de ácido lático-ácido glicólico degradáveis tal como o LUPRON

DEPOTJTMTM (microesferas injetáveis compostas de copolímeros ácido lático-ácido glicólico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D-(-)- 3-hidroxibutírico.

As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é facilmente realizado por filtração através de membrana de 5 filtração estéril.

VI. ARTIGOS DE FABRICAÇÃO

Em outra realização da invenção, são fornecidos artigos de fabricação que contêm materiais úteis para o tratamento de IBD descrita acima.

Em um aspecto, o artigo de fabricação compreende (a) um recipiente que 10 compreende um antagonista (por exemplo, um anticorpo) que se liga a um marcador de superfície de célula B (por exemplo, CD20), opcionalmente em um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável, e (b) uma bula com instruções para tratar IBD em um sujeito humano.

Em todos estes aspectos, a bula está no recipiente ou associada a este. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, etc. Os recipientes podem ser formados de uma variedade de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente inclui ou contém uma composição que é eficaz para tratar IBD e pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco que possui 20 uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). Pelo menos um agente ativo na composição é o antagonista ou anticorpo da invenção. O rótulo ou bula indicam que a composição é usada para o tratamento de um sujeito elegível para tratamento, por exemplo, aquele que tem ou está pré-disposto a IBD, incluindo IBD ou UC moderada-severa, com guias específicos com respeito às 25 quantidades e intervalos de dosagem do anticorpo e qualquer outro medicamento sendo fornecido. O artigo de fabricação pode, além disso, compreender um recipiente adicional que compreende um tampão diluente farmaceuticamente aceitável, tal como água bacteriostática para injeção (BWFI), fosfato salino

tamponado, solução de Ringer e/ou solução de dextrose. O artigo de fabricação pode, além disso, incluir outros materiais desejáveis a partir de um ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas.

5 O artigo de fabricação da presente invenção opcionalmente também compreende um recipiente que compreende um segundo medicamento, em que o anticorpo é um primeiro medicamento, e cujo artigo também compreende instruções na bula para tratamento do sujeito com um segundo medicamento, em uma quantidade eficaz. O segundo medicamento pode ser qualquer um daqueles estabelecidos acima, com um segundo medicamento exemplar sendo um aminosalicilato, um corticoesteróide oral, 6-mercaptopurina (6-MP) e/ou azatioprina.

10

15

Detalhes adicionais da invenção estão ilustrados pelos seguintes Exemplos não limitantes. As divulgações de todas as citações na especificação estão expressamente incorporadas na presente invenção pela referência.

EXEMPLO 1

TERAPIA DE IBD

Esta é uma avaliação de rituximab em sujeitos humanos com UC ativa como definido nos critérios de inclusão. Dados de microarranjo de gene demonstraram que genes de célula B e expressão de CD20 são regulados para cima em UC humana. Este exemplo fornece um protocolo para terapia de sujeitos com UC.

Esquema de estudo para este protocolo descrito na Fig.4.

A terapia da presente invenção inclui um período de seleção de aproximadamente 2 semanas, um período de estudo de aproximadamente 24 semanas, e um período de *follow-up* de 24 semanas. Avaliações rigorosas de segurança serão realizadas por todo o estudo. O período de seleção do Dia 14 ao Dia 0 inclui um histórico médico, exame físico, avaliações laboratoriais, coleção de

dados diários, e uma sigmoidoscopia flexível com biópsias para confirmar a doença ativa e determinar a pontuação do índice de Atividade da Doença (DAI). A pontuação DAI é usada para identificar sujeitos potenciais para cadastramento no estudo e para avaliar a atividade clínica de rituximab.

5 Sujeitos irão receber 1 grama de infusão intravenosa (IV) de rituximab (ou placebo) nos Dias 1 e 15. Todos os sujeitos irão continuar em doses estáveis de uma ou mais das seguintes por pelo menos Semana 8: um aminosalicilato, um corticoesteróide oral, 6 MP e/ou azatioprina. O monitoramento de segurança com exames laboratoriais e avaliações físicas serão realizados em 10 todas as visitas do estudo. Após as visitas do Dia 1 e 15, os sujeitos terão um programa de visita cada 4 semanas a 24 semanas e então cada 3 meses a 48 semanas. Além disso, os sujeitos irão retornar no Dia 2 e Dia 16 somente para amostras faramacocinéticas (PK). A repetição de sigmoidoscopia flexível com biópsias pode ser realizada na Semana 8 para histologia, avaliação da doença e 15 avaliação da depleção de célula B da mucosa. Uma sigmoidoscopia adicional com biópsias pode ser realizada na Semana 24 para avaliação do estado da doença e recuperação de depleção de célula B na mucosa colônica. A avaliação histológica de inflamação nas espécimes de biópsia serão pontuadas de acordo com uma escala padrão (Geboes et al., *Gut* 47:404-409 (2000)).

20 Uma pontuação DAI será calculada na Semana 8 para determinar a proporção de sujeitos que alcançaram remissão da doença. A pontuação DAI também será calculada na visita da Semana 24. Uma avaliação será realizada nas visitas quando uma sigmoidoscopia flexível não for realizada (isto é, nos Dias 1 e 15 e Semanas 4, 12, 16, 20, 36 e 48). Os sujeitos irão ser acompanhados pelo 25 investigador e pelo patrocinador até a Semana 48 ou até a recuperação de célula B, qualquer que seja o tempo. A recuperação de célula B é definida como níveis de célula B que retornaram aos parâmetros iniciais (Dia 1) ou ao mais baixo limite do normal.

Este exemplo fornece uma avaliação da segurança e tolerância de rituximab em sujeitos adultos com UC ativa. A medida do resultado de segurança primária é a frequência de eventos alcançados de exacerbações de UC definidas no protocolo (agravamento da doença).

5 A avaliação de célula B irá continuar até a semana 48 ou recuperação de célula B, qualquer que seja o tempo.

Este exemplo também avalia a atividade clínica terapêutica de rituximab em UC usando-se o sistema de pontuação DAI como definido abaixo. O sistema de pontuação DAI para avaliação da atividade UC foi usado em 10 pesquisas clínicas centrais (Schroeder *et al.*, *N Engl J Med* 317:1625-1629 (1987)). A remissão dos sinais e sintomas da doença ativa, como evidenciado pelo cessamento do sangramento retal e cicatrização da mucosa frágil, foi escolhido como um ponto final secundário para a atividade clínica. A duração da remissão também será medida. Os resultados de sigmoidoscopia flexível e 15 pontuação DAI da Semana 24 e *follow-up* clínico até Semana 48 irão permitir a avaliação da duração dos efeitos terapêuticos.

MEDIDAS DE RESULTADOS

MEDIDA DE RESULTADO DE SEGURANÇA PRIMÁRIA

A medida do resultado de segurança primária é a frequência de 20 eventos alcançados de exacerbações de UC definidas no protocolo que ocorrem durante o período de estudo (Dia 1 até Semana 24).

Uma exacerbação de UC definida no protocolo deve satisfazer um ou mais dos seguintes critérios:

- Um aumento ≥ 3 na pontuação DAI
- Megacôlon tóxico suspeito ou iminente
- Necessidade de hospitalização por uma exacerbação de UC
- No julgamento clínico do investigador, agravamento significante do ponto de 25 vista médica da doença

MEDIDAS DE RESULTADOS SECUNDÁRIOS

Medidas de resultados secundários são as seguintes:

- Outra medida de resultado de segurança
- Incidência de infecções sérias, definidas como infecções que requerem hospitalização ou antibióticos IV
- Incidência de todos os eventos adversos (sérios e não sérios) graduados de acordo com o Critério de Toxicidade Comum de Eventos Adversos Istituto do Câncer (NCI-CTCAE), versão 3.0
- Incidência de anormalidades clínicas laboratorias
- Proporção de sujeitos que alcançaram remissão da doença na Semana 8.
- Remissão da doença é definida como uma pontuação de sigmoidoscopia de 0 a 1 (sem fragilidade) e pontuação de sangramento retal de 0.
- Proporção de sujeitos que alcançaram resposta clínica na Semana 8.
- Resposta clínica é definida como uma redução de ≥ 3 pontos na pontuação DAI.
- Tempo de remissão da doença
- Duração da remissão da doença como determinado pelo investigador
- Mudança nos parâmetros durante o período de estudo nos resultados do Questionário de Doença Inflamatória do Intestino (IBDQ).

Os efeitos de rituximab em diversos marcadores celulares serão examinados pela comparação do sangue, soro e amostras de tecidos no parâmetro inicial e durante o tratamento. As avaliações são como segue:

- Painel de linfócitos no sangue com contagem de célula B (CD19+ e outros subgrupos de célula B).
- Níveis de Ig no soro (IGA, IgG e IgM total)
- Anticorpos específicos para UC (p-ANCA)
- Depleção de célula B em biópsias colônicas, como medido por imunohistoquímica (IHC)

SUJEITOS**CRITÉRIO DE INCLUSÃO**

Os sujeitos devem apresentar os seguintes critérios para serem elegíveis para entrada no estudo

- 5 • Consentimento informado por escrito
- Idade entre 18-75 anos e capaz de entender os procedimentos do estudo
- Diagnóstico de UC ≥ 6 meses na seleção
- ≥ 20 cm de doença ativa na seleção de sigmoidoscopia
- Doença ativa, como definido por uma pontuação DAI entre ≥ 6 e ≤ 11 , com sangramento retal ≥ 2 e sigmoidoscopia flexível ≥ 2 na seleção
- 10 • Tratamento com corticoesteróides oral para UC dentro de 2 anos antes da seleção
- A intensidade do tratamento deve ter sido igual ou maior que uma dose equivalente de prednisona de 20 mg/dia por pelo menos 2 semanas de duração
- 15 • Colonoscopia dentro dos 2 anos anteriores para extensão da doença e para excluir pólipos
- Colonoscopia com biópsia apropriada para excluir displasia dentro de 1 ano antes da seleção se a doença UC > 10 anos
- 20 • Para sujeitos com potencial reprodutivo (homens e mulheres), o uso de um meio confiável de contracepção (por exemplo, hormônio contraceptivo, adesivo, anel vaginal, dispositivo intrauterino, barreira física) durante o estudo do tratamento e por 1 ano seguindo a última dose do estudo.
- Retirada de todas as terapias biológicas investigativas prévias (por exemplo, etanercept, infliximab, adalimumab, rituximab) em pelo menos 15 semanas antes da randomização
- 25 • Tratamento atual com uma ou mais das seguintes terapias em uma dose estável para o período indicado antes do parâmetro inicial (Dia 1).

Aminosalicilato, dose estável por ≥ 3 semanas

Corticoesteróides orais, dose estável por ≥ 2 semanas

Tratamento com 6-MP para um período de 3 meses, com uma dose estável por ≥ 4 semanas

5 Tratamento com azatioprina por um período de 3 meses, com uma dose estável por ≥ 4 semanas

- Para as terapias listadas acima que foram usadas anteriormente, mas não atualmente no Dia 1, os sujeitos precisam ter descontinuidade de aminosalicilatos por ≥ 2 semanas e ter descontinuidade no tratamento com azatioprina, 6-MP ou corticoesteróides orais por ≥ 4 semanas antes do parâmetro inicial.

CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

Os sujeitos que apresentam os seguintes critérios serão excluídos da entrada no estudo:

- 15 • Colite severa como evidenciado pelo julgamento do investigador de que é provável que o sujeito necessite de uma colectomia ou instituição de um inibidor de calcineurina com 12 semanas do parâmetro inicial (Dia 1)
- Suspeita clínica ou evidência por radiografia de perfuração colônica ou Megacôlon tóxico
- 20 • Histórico de colangite esclerosante primária
- Histórico de displasia colônica e/ou pólipos adenomatosos no cólon
- Tratamento com ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, metotrexato ou micofenolato mofetil dentro de 8 semanas antes da seleção
- Tratamento com uma preparação retal tópica dentro de 2 semanas antes da seleção
- 25 • Uso de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (NSAIDs) exceto baixas doses de aspirina dentro de 4 semanas antes do parâmetro inicial
- Fezes positivas para ovos ou parasitas, fezes positivas para cultura de

patógenos, ou fezes positivas para toxina de *Clostridium difficile* na seleção

- Receita/tratamento com qualquer vacina viva dentro de 4 semanas antes da randomização
- Tratamento prévio com qualquer terapia não biológica de depleção de célula tal como ADACOLUMN®
- Histórico de obstrução ou cirurgia colônica ou do intestino delgado
- Uso de agentes antidiarréicos durante o período de seleção
- Histórico de hepatite B ou C

EXCLUSÕES PARA SEGURANÇA GERAL

- Histórico de reações alérgicas severas ou anafiláticas para anticorpos inteiros, químéricos ou humanizados ou anticorpos monoclonais murinos.
- Doença cardíaca ou pulmonar significante (incluindo doença pulmonar obstrutiva)
- Evidência de doenças concomitantes significantes não controladas, tais como doença cardiovascular ou do sistema nervoso, disfunção pulmonar, renal, hepática, endócrina ou gástrica

- Infecções ativas bacterianas, virais, micobacterianas ou outras (incluindo tuberculose ou doença micobacteriana atípica, mas excluindo infecções fúngicas de unha) ou qualquer episódio importante que requer hospitalização ou tratamento com antibióticos IV dentro de 4 semanas da seleção ou antibióticos orais dentro de 2 semanas da seleção

- Histórico de infecção recorrente significante ou infecções bacterianas recorrentes
- Imunodeficiência primária ou secundária (histórico ou atualmente ativa), incluindo HIV

- Histórico de câncer, incluindo tumores sólidos e malignidades hematológicas (exceto célula basal e carcinomas escamosos da pele que foram retirados e curados)

- Mulheres grávidas ou mães amamentando (alimentação do peito)
- Histórico de álcool, droga ou abuso químico dentro de 6 meses antes da seleção
- Falta de acesso venoso periférico

5 **CRITÉRIO DE EXCLUSÃO LABORATORIAL (NA SELEÇÃO)**

- Creatinina do soro $>1,4$ mg/dl para mulheres ou $\geq 1,6$ mg/dl para homens
- Aspartato aminotransferase (AST) ou alanina aminotransferase (ALT)
 $>2,5$ vezes acima do limite normal
- Contagem de plaqueta $<100.000/\mu\text{l}$
- 10 • Hemoglobina $<8,5$ g/dl
- Neutrófilos $<1500/\mu\text{l}$
- Contagem de linfócito $<100/\mu\text{l}$
- Hepatite B positiva ou sorologia C
- IgG $<5,65$ mg/ml
- 15 • IgM $<0,55$ mg/ml
- Contagem de célula B $\leq 1,1\%$
- Electrocardiograma (ECG) mostrando uma anormalidade cardíaca que o Investigador Principal determina que pode comprometer a saúde do sujeito pela participação neste estudo.

20 **ESTUDO DO TRATAMENTO**

FORMULAÇÃO

Rituximab é formulado para administração IV como um produto estéril em 9,0 mg/ml de cloreto de sódio, 0,7 mg/ml de polisorbato 80, 7,35 mg/ml de diidrato citrato de sódio e Água Estéril para Injeção (pH 6,5). O anticorpo é fornecido para uso mercadológico em frascos de 10 ml e 50 ml a uma concentração de 10,0 mg/ml. Os frascos de 10 ml contêm 100 mg do anticorpo Os frascos de 50 ml contêm 500 mg do anticorpo Não é usado conservante porque o frasco é projetado para dose única. Serão fornecidos aos locais de estudo frascos

de 50 ml de 500 mg de rituximab e frascos de 50 ml de mistura placebo.

DOSAGEM, ADMINISTRAÇÃO E ARMAZENAMENTO

O estudo do tratamento irá consistir de 1g de rituximab ou placebo equivalente administrado IV nos Dias 1 e 15. Os sujeitos irão receber tratamento 5 profilático com acetaminofeno (1 g) e difenidramina HCl (50 mg), ou seus equivalentes, por mês 30–60 minutos antes do início de cada infusão. Os sujeitos podem ser hospitalizados para observação, particularmente para sua primeira infusão, a critério do investigador. Rituximab deve ser administrado sob atenta supervisão, e os aparelhos de ressuscitação total devem estar imediatamente 10 disponíveis. Se uma exacerbação de UC definida no protocolo ocorre antes da segunda infusão, a segunda infusão será contida.

Soluções de rituximab para infusão são estáveis a 2°C–8°C (36°F–46°F) por 24 horas e em temperatura ambiente por 24 horas adicionais. Não utilizar depois da data de validade impressa na caixa. Nenhuma incompatibilidade 15 entre rituximab e cloreto de polivinil ou bolsas de polietileno foram observadas.

TERAPIAS CONCOMITANTES E EXCLUÍDAS

Antes do parâmetro inicial (Dia 1), todos os sujeitos estarão em doses estáveis de um aminosalicilato, um corticoesteróide oral, 6-MP, e/ou azatioprina por períodos variáveis antes do parâmetro inicial. Por todo o estudo e 20 períodos de *follow-up*, os sujeitos devem manter suas doses constantes de aminosalicilato, 6-MP e/ou azatioprina. Doses de corticoesteróides orais devem permanecer estáveis até após a Semana 8, se aceitável sob o ponto de vista médico. A diminuição deve ser instituída se indicado sob o ponto de vista médico 25 após a semana 8.

Terapias para condições da doença exceto UC podem ser continuadas, exceto como apontado acima. O uso de vírus vivo ou vacinas de bactérias é proibido do Dia-28 até o final do período de estudo. Estas vacinas podem incluir, mas não estão limitadas para, sarampo, caxumba, rubéola, pólio,

bacilo de Calmette-Guerin, febre amarela e TY21a tifóide. Vacinas que não contêm organismos vivos (por exemplo, influenza, Pneumovax®, tétano) não são proibidas, mas podem não ser eficazes. É recomendável que um registro de vacinação no sujeito e possíveis requisitos sejam revisados, e, se necessário,

5 qualquer vacinação/reforço necessário seja dado em pelo menos 28 dias antes do início do estudo do tratamento da droga.

O tratamento com ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, metotrexato ou micofenolato mofetil é proibido dentro de 8 semanas da seleção e durante o estudo. Ciclosporina em qualquer formulação pode ser usada de acordo com o

10 critério do investigador como uma medicação de resgate para uma exacerbação de UC definida no protocolo. Se a medicação de resgate é necessária antes da Semana 8, o sujeito será considerado um não responsivo, mas deve continuar com as visitas de estudo programadas.

Outras medicações excluídas durante o período de estudo são como

15 segue:

- Antibióticos para tratar UC
 - Antibióticos podem ser usados para tratar infecções como indicadas de acordo com critérios médicos, mas não como uma terapia de UC.
- NSAIDs, com exceção de aspirina em dose baixa para profilaxia

20 cardiovascular.

- Terapias retais tópicas para UC
- Antidiarréicos
- Laxantes
- Ligantes de ácido biliar tal como colestiramina
- Drogas ou tratamentos de investigação são proibidos

MÉTODOS DO TESTE

Amostras de soro serão obtidas para análise PK e HACA em períodos de tempo de acordo com o cronograma de avaliação.

O teste imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) PK de rituximab será usado para medir o nível de rituximab em amostras de soro humanas.

O rituximab HACA ELISA é um teste de ligação, que utiliza rituximab como o reagente de captura e rituximab biotinilado e estreptavidina–HRP para 5 deleção. O teste usa um calibrador de curva preparado com anticorpos policlonais de cabra purificados para afinidade a rituximab, então, os resultados deste teste são relatados relativos a este anticorpo polyclonal em termos de unidades relativas.

Todas as análises p-ANCA serão realizadas por um laboratório 10 central. Imunfluorescência indireta será usada para determinar a presença de ANCAs. Além disso, testes ELISA podem ser usados para determinar a especificidade de ANCA para mieloperoxidase ou outros抗ígenos relevantes como determinado pelo laboratório central.

ANÁLISE DA ATIVIDADE CLÍNICA

A atividade clínica de rituximab em UC será avaliada. As proporções 15 de sujeitos que sentem remissão da doença e as proporções de sujeitos que respondem clinicamente na Semana 8 serão estimadas e intervalos de confiança que correspondem a 95% serão gerados para cada braço de tratamento. As diferenças de tratamento e intervalos de confiança de 95% serão fornecidos.

A duração da remissão da doença será resumida pelo braço de tratamento. O tempo médio de resposta para remissão da doença sera resumido para cada braço de tratamento usando-se o método Kaplan-Meier somente para propósitos descritivos.

Sujeitos com UC ativa tratados com anticorpo rituximab como 25 descrito acima, irão sentir uma melhora nos sinais e sintomas de UC, incluindo remissão da doença e/ou resposta clínica (atingida pela semana 8), a obtenção de uma pontuação de sigmoidoscopia de 0 ou 1, e pontuação de sangramento retal de 0, uma redução na pontuação DAI (para mais ou igual a 3 pontos), uma

redução na células na mucosa colônica, e/ou uma redução no nível do anticorpo p-ANCA.

A partir do aqui descrito, será apreciado que, embora realizações específicas da invenção tenham sido descritas na presente invenção para 5 propósitos de ilustração, várias modificações podem ser feitas sem se afastar do escopo e espírito da invenção. Consequentemente, a invenção não está limitada exceto pelas reivindicações anexas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Sheila Gujrathi

<120> TRATAMENTO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA DO INTESTINO (IBD)

<130> P2211R1

<141> 13-04-2006

<150> US 60/671,902

<151> 15-04-2005

<160> 24

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Lys Arg

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 2

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

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

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

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105

Lys Arg

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 3

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

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

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 4

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 5

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
5

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 7

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105

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

Ser Ser

<210> 8

<211> 122

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

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

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

<220>
<223> Sequência é Sintetizada

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

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
 5 10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 11

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

Lys Gly

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 12

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

<210> 13

<211> 213

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 13

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

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

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

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105

 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 110 115 120

 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 125 130 135

 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 140 145 150

 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 155 160 165

 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 170 175 180

 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 185 190 195

 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 200 205 210

 Gly Glu Cys

<210> 14

<211> 452

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 14

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5				10			15		

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
20					25						30			

Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
35								40				45		

Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr
50						55					60			

Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser
65						70						75		

Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
80						85						90		

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser
95								100				105		

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

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420

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

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly Lys

<210> 15

<211> 213

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 15

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

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

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

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90

Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 110 115 120

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 125 130 135

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 140 145 150

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 155 160 165

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 170 175 180

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 185 190 195

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 200 205 210

Gly Glu Cys

<210> 16

<211> 452

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
 50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
 95 100 105

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly Lys

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

<220>
 <223> Sequência é Sintetizada

<400> 17
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
 95 100 105

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly

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

<220>
 <223> Sequência é Sintetizada

<400> 18
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

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

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

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90

Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105

Lys Arg

```

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

<220>
<223> Sequência é Sintetizada

<400> 19
  Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
    1           5           10          15

  Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
    20          25          30          35

  Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    35          40          45          50

  Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
    50          55          60          65

  Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
    65          70          75          80

  Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
    80          85          90          95

  Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
    95         100         105         110

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

```

Ser Ser

```

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

<220>
<223> Sequência é Sintetizada

<400> 20
  Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
    1           5           10          15

  Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
    20          25          30          35

  Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    35          40          45          50

  Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
    50          55          60

```

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

Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
														375
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
														390
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
														405
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
														420
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
														435
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
														450
Gly														

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

<220>
<223> Sequência é Sintetizada

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

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

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

<220>
<223> Sequência é Sintetizada

<220>
<221> Xaa
<222> 4
<223> Xaa is S or A

<400> 22
Gln Gln Trp Xaa Phe Asn Pro Pro Thr
5

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<220>

<221> Xaa

<222> 8

<223> Xaa is D or A

<400> 23

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

Lys Gly

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<220>

<221> Xaa

<222> 6

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

<220>

<221> Xaa

<222> 7

<223> Xaa is S or R

<400> 24

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

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE TRATAMENTO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA

DO INTESTINO (IBD) moderada a severa em um sujeito humano, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um anticorpo CD20, em que a administração do anticorpo resulta em uma resposta clínica ou remissão da doença.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a IBD é colite ulcerativa (UC).

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a IBD é doença de Crohn.

4. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o sujeito possui IBD ativa.

5. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a administração do anticorpo resulta em remissão da doença.

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a remissão é alcançada aproximadamente na semana 8.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a administração do anticorpo resulta em uma pontuação de sigmoidoscopia de 0 a 1 e pontuação de sangramento retal de 0.

8. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a administração do anticorpo resulta em uma resposta clínica.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a resposta clínica é alcançada aproximadamente na semana 8.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que a administração do anticorpo reduz a pontuação do índice de atividade da doença (DAI).

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a pontuação DAI, pontuada usando-se o sistema de pontuação conforme descrito na Tabela 2, é reduzida para mais ou igual a 3 pontos.

12. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 11,
5 caracterizado pelo fato de que a administração do anticorpo reduz células B na mucosa colônica.

13. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico, humano ou humanizado.

10 14. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende rituximab.

15 15. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende 2H7 humanizado.

16. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 13,
15 caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende 2F2 (huMax-CD20).

17. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo nu.

18. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é conjugado com outra molécula.

20 19. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é administrado como uma dose na faixa de cerca de 200 mg a 2000 mg em uma frequência de cerca de uma a quatro doses dentro de um período de cerca de um mês.

25 20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a dose está na faixa de cerca de 500 mg a 1500 mg.

21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que a dose está na faixa de cerca de 750 mg a 1.200 mg.

22. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 19 a 21, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é administrado em uma ou duas doses.

23. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 19 a 22, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é administrado dentro de um período 5 de cerca de 2 a 3 semanas.

24. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o período é de cerca de duas semanas.

25. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é administrado intravenosamente.

10 26. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é administrado subcutaneamente.

27. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 26, caracterizado pelo fato de que um segundo medicamento é administrado em uma quantidade eficaz, em que o anticorpo CD20 é um primeiro medicamento.

15 28. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o segundo medicamento é mais do que um medicamento.

29. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 27 ou 28, caracterizado pelo fato de que o segundo medicamento é selecionado do grupo que consiste de aminosalicilato, um corticoesteróide oral, 6-mercaptopurina (6-MP) e azatioprina.

30. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 27 a 29, caracterizado pelo fato de que o segundo medicamento é administrado em uma quantidade mais baixa do que é usada se o anticorpo CD20 não é administrado a um sujeito tratado com o segundo medicamento.

25 31. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 30, caracterizado pelo fato de que o sujeito nunca foi previamente tratado com um anticorpo CD20.

32. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 31,

caracterizado pelo fato de que o sujeito não está sofrendo de uma malignidade de célula B.

33. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 32, caracterizado pelo fato de que o sujeito não está sofrendo de uma doença autoimune, diferente de IBD.

34. MÉTODO DE TRATAMENTO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA DO INTESTINO (IBD), em um sujeito humano com IBD ativa, caracterizado pelo fato de que compreende administrar somente uma ou duas doses de um anticorpo CD20 ao sujeito, em que a remissão da doença ou resposta clínica é alcançada pela administração de uma ou duas doses do anticorpo CD20.

35. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que uma ou duas doses são administradas intravenosamente (IV).

36. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que uma ou duas doses são administradas subcutaneamente (SQ).

37. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que duas doses intravenosas são administradas, em que cada uma das duas doses está na faixa de cerca de 200 mg a cerca de 2000 mg.

38. MÉTODO DE TRATAMENTO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA DO INTESTINO (IBD), em um sujeito humano com IBD ativa, caracterizado pelo fato de compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um anticorpo CD20 e também compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um segundo medicamento selecionado do grupo que consiste de um aminosalicilato, um corticoesteróide oral, 6-mercaptopurina (6-MP) e azatioprina.

39. MÉTODO DE REDUÇÃO DE UMA PONTUAÇÃO DO ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA (DAI), em um sujeito humano com colite ulcerativa ativa (UC), caracterizado pelo fato de compreende administrar um anticorpo CD20 ao sujeito em uma quantidade eficaz para reduzir a pontuação DAI.

40. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado

pelo fato de que a pontuação DAI, pontuada usando-se o sistema de pontuação conforme descrito na Tabela 2, é reduzida para mais ou igual a 3 pontos.

41. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 40, caracterizado pelo fato de que o sujeito possui um nível atípico de anticorpo 5 citoplasmático anti-neutrófilo perinuclear (p-ANCA) ou auto-anticorpo isoforma 5 tropomiosina anti-humana (hTM5).

42. ARTIGO DE FABRICAÇÃO, caracterizado pelo fato de que compreende:

- i. um recipiente que compreende um anticorpo CD20; e
- 10 ii. uma bula com instruções de uso para tratar doença inflamatória do intestino (IBD) em um sujeito humano, em que as instruções indicam que uma quantidade eficaz do anticorpo CD20 é administrada ao sujeito humano.

43. USO DE UM ANTICORPO CD20, caracterizado pelo fato de 15 ser na fabricação de um medicamento para tratar uma doença inflamatória do intestino (IBD) moderada a severa em um sujeito.

44. USO, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a IBD é colite ulcerativa (UC).

45. USO, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo 20 fato de que a IBD é doença de Crohn.

46. USO, de acordo com uma das reivindicações 43 a 45, caracterizado pelo fato de que o sujeito possui IBD ativa.

47. USO, de acordo com uma das reivindicações 43 a 46, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico, humano ou 25 humanizado.

48. USO, de acordo com uma das reivindicações 43 a 47, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende rituximab.

49. USO, de acordo com uma das reivindicações 43 a 47,

caracterizado pelo fato de que o anticorpo comprehende 2H7 humanizado.

50. USO, de acordo com uma das reivindicações 43 a 47, caracterizado pelo fato de que o anticorpo comprehende 2F2 (huMax-CD20).

51. USO, de acordo com uma das reivindicações 43 a 50, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo nu.

52. USO, de acordo com uma das reivindicações 43 a 50, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é conjugado com outra molécula.

53. USO, de acordo com uma das reivindicações 43 a 52, caracterizado pelo fato de que o sujeito nunca foi previamente tratado com um anticorpo CD20.

54. USO, de acordo com uma das reivindicações 43 a 53, caracterizado pelo fato de que o sujeito não está sofrendo de uma malignidade de célula B.

55. USO DE UM ANTICORPO CD20, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para reduzir uma pontuação do índice de atividade da doença (DAI) em um sujeito humano com colite ulcerativa ativa (UC).

56. USO, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que a pontuação DAI, pontuada usando-se o sistema de pontuação conforme descrito na Tabela 2, é reduzida para mais ou igual a 3 pontos.

20 57. USO, de acordo com uma das reivindicações 43 a 56, caracterizado pelo fato de que o sujeito possui um nível atípico de anticorpo citoplasmático anti-neutrófilo perinuclear (p-ANCA) ou auto-anticorpo isoforma 5 tropomiosina anti-humana (hTM5).

Alinhamento da Seqüência de Domínios Variáveis Leves

	FR1				CDR1			
	10	20	30	40				
2H7	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC [RASSSVS-YMH] WYQQKP							
	*	***	**	* *	*			
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC [RASSSVS-YMH] WYQQKP							
					*	***	*	
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC [RASQSISNYLA] WYQQKP							
	FR2		CDR2	FR3				
	50	60	70	80				
2H7	GSSPKPWIY [APSNLAS] GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEA							
	**	*		*		***	****	
hu2H7.v16	GKAPKPLIY [APSNLAS] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP							
	*		***					
hum KI	GKAPKLLIY [AASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP							
	CDR3			FR4				
	90	100						
2H7	EDAATYYC [QQWSFNPPT] FGAGTKLELKR							
	*			*	***			
hu2H7.v16	EDFATYYC [QQWSFNPPT] FGQGTKVEIKR							
			****	*				
hum KI	EDFATYYC [QQYNSLPWT] FGQGTKVEIKR							

Fig. 1A

Alinhamento da Seqüência de Domínios Variáveis Pesados

	FR1				CDR1				
	10	20			30	40			
2H7	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS [GYTFTSYNMH]				WVKQT				
	***	**	*	*	***	*		**	
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPAGGSLRLSCAAS [GYTFTSYNMH]				WVRQA				
					*	*	*	*	
hum III	EVQLVESGGGLVQPAGGSLRLSCAAS [GFTFSSYAMS]				WVRQA				
	FR2			CDR2			FR3		
	50	a	60		70	80			
2H7	PRQGLEWIG [AIYPNGDTSYNQKFKG]				KATLTVDKSSSTAYM				
	**	*			**	**	**	**	
hu2H7.v16	PGKGLEWVG [AIYPNGDTSYNQKFKG]				RFTISVDKSKNTLYL				
	*	*	*****	*	*****		*	*	
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]				RFTISRDNSKNTLTL				
	CDR3				FR4				
	abc	90	100	abcde		110			
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR [VVYYSNSYWYFDV]				WGTGTTVTVSS				
	**	**	*	*		*			
hu2H7.v16	QMNSLRAEDTAVYYCAR [VVYYSNSYWYFDV]				WGQGTLVTVSS				
					*****	***	*		
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLY---DY]				WGQGTLVTVSS				

Fig. 1B

Alinhamento de Cadeia Leve

hu2H7.v16	1	32
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
hu2H7.v511	*****	

hu2H7.v16	52	
	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPFGQG	
hu2H7.v511	*****	

hu2H7.v16	102	
	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
hu2H7.v511	*****	

hu2H7.v16	152	
	NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
hu2H7.v511	*****	

hu2H7.v16	202	214
	SSPVTKSFNRGEC	
hu2H7.v511	*****	
	SSPVTKSFNRGEC	

Fig. 2

Alinhamento de Cadeia Pesada

hu2H7.v16	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW *****	
hu2H7.v511		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW	
	37	VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNLTYLQMNSL *****	82abc
hu2H7.v16		VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNLTYLQMNSL	
hu2H7.v511			
	83	RAEDTAVYYCARVYYYNSYWYFDVWGQGTLTVSS *****	100abcde 113
hu2H7.v16		RAEDTAVYYCARVYYYNSYWYFDVWGQGTLTVSS	
hu2H7.v511			
	118	ASTKGPSVFPPLAPS *****	
hu2H7.v16		ASTKGPSVFPPLAPS	
hu2H7.v511			
	132	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS *****	
hu2H7.v16		SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS	
hu2H7.v511			
	182	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPA *****	
hu2H7.v16		LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPA	
hu2H7.v511			
	232	PELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDG *****	
hu2H7.v16		PELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDG	
hu2H7.v511			
	282	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP *****	
hu2H7.v16		VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAP	
hu2H7.v511			
	332	IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW *****	
hu2H7.v16		IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
hu2H7.v511			
	382	ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEA *****	
hu2H7.v16		ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEA	
hu2H7.v511			
	432	LHNHYTQKSLSLSPGK *****	447
hu2H7.v16		LHNHYTQKSLSLSPGK	
hu2H7.v511			

Fig. 3

Esquema de Estudo

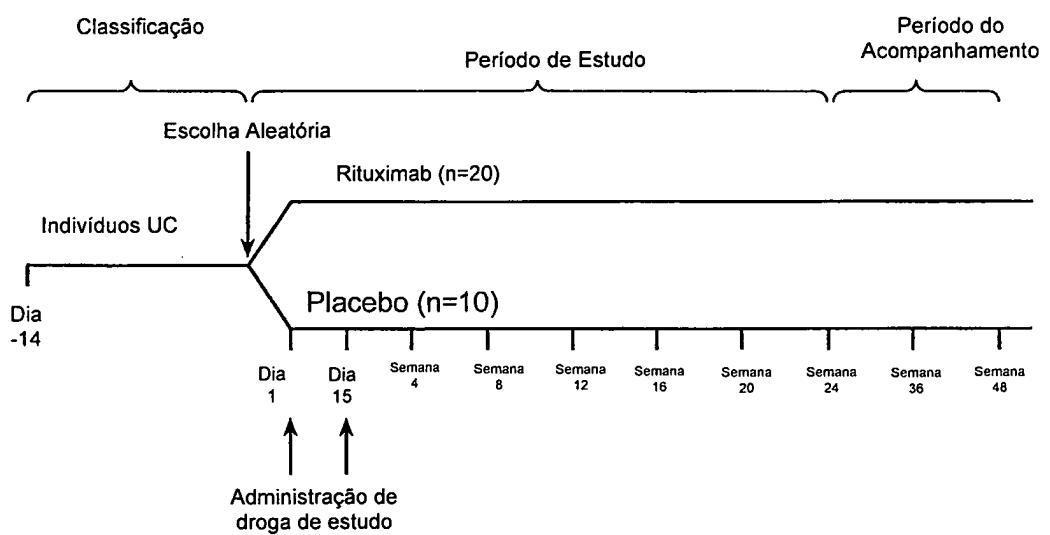


Fig. 4

RESUMO

**“MÉTODOS DE TRATAMENTO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA DO
INTESTINO (IBD), MÉTODO PARA REDUÇÃO DE UMA PONTUAÇÃO DO
ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA (DAI), ARTIGO DE FABRICAÇÃO E
USOS DE UM ANTICORPO CD20”**

A presente invenção refere-se ao tratamento de IBD, especialmente colite ulcerativa (UC) com um anticorpo que se liga a CD20.