



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 702**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99942074 .8**
96 Fecha de presentación : **11.08.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1112084**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2001**

54 Título: **Terapias de combinación para linfomas de células B, las cuales comprenden la administración de anti-CD20.**

30 Prioridad: **11.08.1998 US 96180 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **Biogen Idec Inc.**
14 Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US

72 Inventor/es: **Grillo-Lopez, Antonio**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 317 702 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapias de combinación para linfomas de células B, las cuales comprenden la administración de anti-CD20.

5 Campo de la invención

La invención se refiere al uso de anticuerpos anti-CD20, o de fragmentos de los mismos, en el tratamiento de linfomas de células B, particularmente al uso de tales anticuerpos y fragmentos en regímenes terapéuticos combinados.

10 Antecedentes de la invención

El uso de anticuerpos contra el antígeno CD20 como agentes diagnósticos y/o terapéuticos para el linfoma de células B se ha descrito previamente. El CD20 es un marcador o diana útil para los linfomas de células B, puesto que este antígeno se expresa en densidades muy elevadas sobre la superficie de las células B malignas, es decir, células B cuya proliferación sin disminución puede conducir a linfomas de células B.

El CD20 o Bp35 es un antígeno de diferenciación restringido a los linfocitos-B que se expresa durante el desarrollo temprano de las pre-células B, y que permanece hasta la diferenciación de las células plasmáticas. Algunos opinan que la molécula CD20 puede regular un paso en el proceso de activación de la célula B, el cual es necesario para la iniciación del ciclo celular y la diferenciación. Además, como se ha apuntado, el CD20 se expresa usualmente en niveles muy elevados sobre células B neoplásicas (“tumoraes”). El antígeno CD20 es atractivo para la terapia dirigida, porque no se desprende, modula, o internaliza.

Las terapias previas descritas que implicaban anticuerpos anti-CD20 han implicado la administración de un anticuerpo terapéutico anti-CD20, bien solo o conjuntamente con un segundo anticuerpo anti-CD20 marcado radiactivamente o con un agente quimioterapéutico.

De hecho, el Departamento de Control de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los EE.UU. ha aprobado el uso terapéutico de uno de tales anticuerpos anti-CD20, el Rituxan[®], para su uso en el linfoma no-Hodgkin (LNH) de bajo grado previamente tratado y recurrente. También se ha sugerido el uso del Rituxan[®], en combinación con un anticuerpo m^urido anti-CD20 marcado radiactivamente, para el tratamiento del linfoma de célula B.

Sin embargo, mientras que los anticuerpos anti-CD20 y, en particular, el Rituxan[®] (EE.UU.; en Gran Bretaña, MabThera[®]; en general, Rituximab), se ha descrito que son efectivos para el tratamiento de los linfomas de células B, tales como el linfoma de no-Hodgkin, los pacientes tratados a menudo experimentan una recaída de la enfermedad. Por tanto, será beneficioso si pueden desarrollarse regímenes de tratamientos más efectivos.

Más específicamente, será ventajoso si los anticuerpos anti-CD20 tienen un efecto beneficioso en combinación con otros tratamientos del linfoma, y si pueden desarrollarse nuevos regímenes terapéuticos combinados para disminuir la probabilidad o frecuencia de recaída. También será útil si se mejoran los protocolos de tratamiento actuales del linfoma de célula B, de modo que los pacientes con linfomas que son resistentes a otros procedimientos de tratamiento puedan tratarse con anticuerpos anti-CD20 quiméricos o marcados radiactivamente. También será útil si el tratamiento con anticuerpos anti-CD20, particularmente en combinación con otros tratamientos, puede usarse como terapia para otros tipos de linfomas aparte del linfoma de no-Hodgkin (LNH) folicular de bajo grado.

45 Resumen de la invención

La presente invención revela un tratamiento terapéutico combinado para los linfomas de células B, y describe los beneficios de tratar linfomas de células B recurrentes o resistentes con anticuerpos anti-CD20 quiméricos y marcados radiactivamente. En particular, se ha hallado que el tratamiento con anticuerpo anti-CD20 proporciona un efecto sinérgico beneficioso cuando se administra en combinación con citocinas, radioterapia, terapia mieloablativa, o quimioterapia. Sorprendentemente, los pacientes que tuvieron un trasplante previo de médula ósea o de células madre, tenían un incremento inesperado en la proporción de respuesta global en comparación con pacientes sin terapia previa.

La invención proporciona la materia definida por las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención se describen regímenes terapéuticos combinados para el tratamiento de linfomas de células B. En general, tales procedimientos incluyen un procedimiento para tratar el linfoma de célula B recurrente, en donde un paciente, que ha tenido un tratamiento previo del linfoma, ha experimentado una recaída y se le administra una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD20 quimérico. Tales tratamientos previos pueden incluir, por ejemplo, el tratamiento previo con anticuerpos anti-CD20, los tratamientos que incluyen un trasplante de médula ósea o de células madre, radioterapia y quimioterapia. La quimioterapia previa puede seleccionarse de entre un amplio grupo de agentes quimioterapéuticos y regímenes de combinación, incluyendo el CHOP, el ICE, la Mitozantrona, la Citarabina, el DVP, el ATRA, la Idarubicina, el régimen de quimioterapia tipo Hoelzer, el régimen de quimioterapia La La, el ABVD, el CEOP, la 2-CdA, el FLAG & IDA con o sin tratamiento subsiguiente con G-CSF, el VAD, el M & P, el “C-Weekly,” el ABCM, el MOPP y la DHAP.

ES 2 317 702 T3

También se describen procedimientos para tratar un sujeto que padece de linfoma de células B, en donde el sujeto es resistente a otros tratamientos terapéuticos, incluyendo todos los listados más arriba, es decir, el tratamiento con anticuerpo quimérico anti-CD20, los tratamientos que incluyen un trasplante de médula ósea o células madre, la radioterapia y la quimioterapia. En particular, se abarcan las composiciones para su uso en procedimientos para tratar un paciente que no ha mostrado una remisión o regresión apreciable del tumor después de la administración de un anticuerpo quimérico anti-CD20, los cuales comprenden la administración a dicho paciente de un anticuerpo anti-CD20 marcado radiactivamente.

En particular, se realizan los procedimientos para tratar un paciente con un anticuerpo marcado radiactivamente después de un anticuerpo quimérico, mediante los cuales el anticuerpo anti-CD20 marcado radiactivamente se administra desde una semana hasta aproximadamente dos semanas después de dicha administración de dicho anticuerpo quimérico anti-CD20. Más particularmente, el anticuerpo anti-CD20 marcado radiactivamente se administra desde una semana hasta aproximadamente nueve meses después de dicha administración de dicho anticuerpo quimérico anti-CD20.

Aunque puede usarse cualesquier anticuerpos anti-CD20 para la presente invención, un anticuerpo quimérico preferido es el C2B8 (IDEC Pharmaceuticals, Rituximab). Un anticuerpo marcado radiactivamente preferido es el Y2B8, el cual es un anticuerpo murino marcado con itrio-90 (⁹⁰Y). No obstante, pueden usarse otros anticuerpos con otras marcas radiactivas, particularmente aquellos marcados con un isótopo beta o alfa. También pueden usarse anticuerpos anti-CD19.

Alguien con formación en la técnica conocerá los parámetros para escoger un tipo particular de anticuerpo anti-CD20. Por ejemplo, los anticuerpos quiméricos o humanizados son beneficiosos para obtener una inmunogenicidad disminuida, y para facilitar las reacciones inmunitarias mediadas por el anticuerpo como efector a través de los dominios de la región constante humana. Por contra, los anticuerpos murinos y de otros mamíferos son beneficiosos para suministrar un anticuerpo a la célula tumoral, puesto que tales anticuerpos tienen *in vivo* una vida media disminuida.

Los tratamientos de anticuerpo realizados inicialmente, a los cuales los pacientes son resistentes o de los cuales han recaído, pueden incluir tratamientos iniciales con anticuerpos quiméricos o anticuerpos de mamíferos. Son posibles también los tratamientos iniciales con otros anticuerpos, incluyendo los anticuerpos anti-CD19 y los anticuerpos anti-Lym, y los tratamientos con anticuerpos marcados con porciones citotóxicas, tales como toxinas, y marcas radiactivas, por ejemplo, el Oncolym® (Techniclone) o el Bexxar (Coulter).

Debe quedar claro que pueden realizarse regímenes terapéuticos combinados a través de los cuales dichas terapias se administran simultáneamente, es decir, el anticuerpo anti-CD20 se administra concurrentemente o dentro del mismo intervalo de tiempo (es decir, las terapias están progresando concurrentemente, pero los agentes no se administran exactamente en el mismo momento). Los anticuerpos anti-CD20 pueden administrarse también antes o de forma subsiguiente a las otras terapias. La administración secuencial puede realizarse con independencia de si el paciente responde a la primera terapia para disminuir la posibilidad de remisión o recaída.

Las terapias combinadas incluyen un procedimiento para tratar el linfoma de células B, el cual comprende administrar al menos un anticuerpo anti-CD20 quimérico y al menos una citocina. En particular, se describe un procedimiento para tratar el linfoma de células B, el cual comprende administrar una combinación terapéutica sinérgica que comprende al menos un anticuerpo anti-CD20 y al menos una citocina, en donde el efecto terapéutico es mejor que los efectos aditivos de cualquiera de las terapias administrada sola. Las citocinas preferidas se seleccionan de entre el grupo consistente en interferón alfa, interferón gamma, IL-2, GM-CSF y G-CSF. De nuevo, el anticuerpo anti-CD20 y la citocina o citocinas pueden administrarse secuencialmente, en cualquier orden, o en combinación.

También se describe un procedimiento para tratar el linfoma de células B, el cual comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD20 quimérico antes, durante, o de forma subsiguiente a un régimen quimioterapéutico. Tal régimen de quimioterapia puede seleccionarse de entre el grupo consistente en, al menos, el CHOP, el ICE, la Mitozantrona, la Citarabina, el DVP, el ATRA, la Idarubicina, el régimen de quimioterapia tipo Hoelzer, el régimen de quimioterapia La La, el ABVD, el CEOP, la 2-CdA, el FLAG & IDA con o sin tratamiento subsiguiente con G-CSF), el VAD, el M & P, el "C-Weekly," el ABCM, el MOPP y la DHAP.

También se describen procedimientos para tratar el linfoma de células B, los cuales comprenden administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD20 quimérico antes, durante, o de forma subsiguiente a un trasplante de médula ósea o de células madre periféricas. Dicho trasplante de médula ósea puede ir acompañado también por otros regímenes terapéuticos tales como la quimioterapia. Los anticuerpos pueden usarse también en un procedimiento para reducir las células tumorales CD20+ residuales en la médula ósea o en las células madre, antes o después de la terapia mieloablativa, mediante la administración a un paciente de un anticuerpo anti-CD20 quimérico. Puede ser posible también el uso de tales anticuerpos *in vitro* para inducir la apoptosis de las células tumorales, y reducir o curar las preparaciones de médula ósea o células madre de células tumorales residuales antes de que sean infundidas de vuelta al paciente.

Debe entenderse que los trasplantes de células madre pueden ser alogénicos o autólogos. Si en trasplante es alogénico, es decir, procedente de otra persona, los regímenes terapéuticos descritos pueden incluir los tratamientos con fármacos inmunosupresores antes de la administración de los anticuerpos anti-CD20. También se contempla la co-

ES 2 317 702 T3

administración de otros fármacos diseñados para potenciar la aceptación del trasplante y estimular la producción y diferenciación de las células inmunitarias. Por ejemplo, se ha mostrado que la administración de GM-CSF a los receptores de trasplante de médula promueve el desarrollo de células específicas de la médula ósea, las cuales a su vez producen neutrófilos circulantes que luchan contra las infecciones, e incrementa la tasa de supervivencia de los receptores de trasplante de médula.

Los procedimientos pueden usarse para tratar una variedad de linfomas de células B, incluyendo el linfoma de no-Hodgkin (LNH) folicular de bajo grado, el LNH linfocítico pequeño (SL), el LNH folicular de grado intermedio, el LNH difuso de grado intermedio, el LNH inmunoblástico de grado elevado, el LNH linfoblástico de grado elevado, el LNH de célula no separada de grado elevado, el LNH de enfermedad masiva, y la macroglobulinemia de Waldenstrom. Debe estar claro para los especialistas en el campo que estos linfomas a menudo tienen nombres diferentes debido a sistemas de clasificación cambiantes, y que los pacientes que tienen linfomas clasificados bajo nombres diferentes pueden beneficiarse también de los regímenes terapéuticos combinados.

Por ejemplo, un reciente sistema de clasificación propuesto por anatomopatólogos europeos y americanos se denomina "Clasificación Revisada Europea-Americana de Linfomas (Clasificación REAL)". Este sistema de clasificación reconoce el linfoma de células de manto y el linfoma de células de zona marginal entre los neoplasmas de células B periféricas, y separa algunas clasificaciones en grado basados en la citología, es decir, células pequeñas, mezcla de células pequeñas y grandes, y células grandes. Debe entenderse que todos esos linfomas clasificados pueden beneficiarse de las terapias combinadas.

El Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los EE.UU. ha dividido a su vez algunas de las clases de REAL en las denominaciones clínicamente más útiles "indolente" o "agresiva". Los linfomas indolentes incluyen los linfomas de células foliculares, separados en "grados" citológicos, el linfoma linfocítico pequeño difuso/leucemia linfocítica crónica (LLC), el linfoma linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldenstrom, el linfoma de células de zona marginal, y la leucemia de células pilosas. Los linfomas agresivos incluyen los linfomas difusos de células grandes y de células mezcladas, el linfoma de Burkitt/linfoma difuso de células pequeñas no hendidas, el linfoma linfoblástico, el linfoma de células del manto, y el linfoma relacionado con el SIDA. Estos linfomas también pueden beneficiarse de los regímenes terapéuticos combinados.

El linfoma no-Hodgkin también se ha clasificado en base al "grado", basado en otras características de la enfermedad, incluyendo los linfomas de bajo grado, de grado intermedio, y de alto grado. El linfoma de bajo grado usualmente se presenta como una enfermedad nodular, y a menudo es indolente o de crecimiento lento. La enfermedad de grado intermedio o de alto grado usualmente se presenta como una enfermedad mucho más agresiva con grandes tumores masivos extranodulares. La enfermedad de grado intermedio y de alto grado, así como el LNH de bajo grado, pueden beneficiarse de los regímenes terapéuticos combinados.

El sistema de clasificación de Ann Arbor también se usa comúnmente para pacientes con LNH. En este sistema, los estadios I, II, III, y IV del LNH adulto pueden clasificarse en las categorías A y B dependiendo de si el paciente tiene los síntomas generalizados y bien definidos (B) y no (A). La denominación B se asigna a los pacientes con los siguientes síntomas: pérdida inexplicada de más del 10% del peso corporal en los 6 meses anteriores al diagnóstico, fiebre inexplicada con temperaturas superiores a 38°C, y sudoración nocturna abundante. Ocasionalmente, se usan sistemas de estadificación especializados:

Estadio I - implicación de una única región nodular linfática o implicación localizada de un único órgano o sitio extralinfático.

Estadio II - implicación de dos o más regiones nodulares linfáticas en el mismo lado del diafragma, o implicación localizada de un único órgano o sitio extralinfático y sus nódulos linfáticos regionales con o sin otras regiones nodulares linfáticas en el mismo lado del diafragma.

Estadio III - implicación de regiones nodulares linfáticas en ambos lados del diafragma, con el posible acompañamiento de la implicación localizada de un órgano o sitio extralinfático, la implicación del bazo, o ambos.

Estadio IV - implicación diseminada (multifocal) de 1 o más sitios extralinfáticos, con o sin implicación de nódulo linfático asociado u implicación de órgano extralinfático asociado, con implicación nodular distante (no regional). Para más detalles, consultar "The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma." New England J. Med. 329(14):987-994 (1993).

Los anticuerpos, regímenes de dosificación y combinaciones de terapia concretas preferidos se ilustrarán ahora por medio de los datos de ejemplo siguientes.

Rituximab y Y2B8

El linfoma no-Hodgkin (LNH) afecta aproximadamente a 250.000 personas en los Estados Unidos. La mayoría de los pacientes con LNH no se curan mediante quimioterapia, radioterapia, o tratamiento de dosis elevada con trasplante de médula ósea autóloga (ABMT) o apoyo de células madre de la sangre periférica (PBSC).

ES 2 317 702 T3

Aproximadamente el 80% de los linfomas no-Hodgkin son cánceres de células B, y >95% de éstas expresan el antígeno CD20 sobre la superficie celular. Este antígeno es una diana atractiva para la inmunoterapia porque se halla exclusivamente sobre células B, y no sobre células madre hematopoyéticas, células pro-B, células plasmáticas normales, u otros tejidos normales. No se desprende de la superficie celular, y no se modula a partir de la unión del anticuerpo (1).

El Rituximab es un anticuerpo de una nueva generación de anticuerpos monoclonales desarrollados para superar las limitaciones encontradas con los anticuerpos muridos, incluyendo la vida media corta, la capacidad limitada para estimular las funciones efectoras humanas, y la inmunogenicidad (2, 3).

El Rituximab es un anticuerpo monoclonal genéticamente diseñado con regiones variables de cadena ligera y pesada murida, y regiones constantes de cadena pesada de gamma y cadena ligera de kappa inmunoglobulinas humanas. El anticuerpo quimérico está compuesto por dos cadenas pesadas de 451 aminoácidos y dos cadenas ligeras de 213 aminoácidos, y tiene un peso molecular aproximado de 145 kD. El Rituximab es más efectivo que su contrapartida murida para fijar el complemento y mediar la ADCC, y media la CDC en presencia del complemento humano (4). El anticuerpo inhibe el crecimiento celular en las líneas de células B FL-18, Ramos, y Raji; sensibiliza las líneas celulares de linfoma humano quimiorresistentes a la toxina diftérica, la ricina, el CDDP, la Doxorubicina, y el Etopósido; e induce la apoptosis en la línea de linfoma de célula B DHL-4 de manera dependiente de la dosis (5). En los humanos, la vida media del anticuerpo es de aproximadamente 60 horas después de la primera infusión, e incrementa con cada dosis hasta las 174 horas después de la cuarta infusión. La inmunogenicidad del anticuerpo es baja; de 355 pacientes en estudios clínicos, sólo tres (<1%) tenían una respuesta anti-anticuerpo quimérico (HACA) detectable.

El Rituximab se diseñó genéticamente usando el anticuerpo 2B8 murido. El anticuerpo 2B8 se ha conjugado también con diferentes marcas radiactivas para propósitos diagnósticos y terapéuticos. Los conjugados anti-CD20 marcados radiactivamente pueden emplearse para la representación óptica (“imaging”) de tumores de linfoma de células B antes de la administración del anticuerpo terapéutico. El conjugado “In2B8” comprende un anticuerpo monoclonal murido, el 2B8, específico contra el antígeno CD20 humano, que está unido a Indio-[111] (¹¹¹In) a través de un quelante bifuncional, a saber, el MX-DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), el cual comprende una mezcla 1:1 de 1-isotiocianatobencil-3-metil-DTPA y 1-metil-3-isotiocianatobencil-DTPA. El Indio-[111] se selecciona como radionúcleo de diagnóstico porque emite radiación gamma y ha sido usado previamente como un agente de visualización.

Las patentes que se refieren a quelantes y conjugados de quelantes son conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, la Patente estadounidense nº 4.831.175 de Gansow se refiere a quelatos del ácido dietilentriaminopentaacético polisustituidos y a conjugados proteicos que los contienen, y a los procedimientos para su preparación. Las Patentes estadounidenses nº 5.099.069, 5.246.692, 5.286.850, y 5.124.471 de Gansow también se refieren a quelatos de DTPA polisustituidos.

El quelante bifuncional específico usado para facilitar la quelación en el MX-DPTA se seleccionó porque posee una afinidad elevada por los metales trivalentes, y proporciona mayores relaciones tumor respecto no-tumor, una menor captación ósea, y una mayor retención *in vivo* de radionúcleos en los sitios diana, es decir, en los sitios de los tumores de linfoma de células B. Sin embargo, se conocen en el campo otros quelantes bifuncionales y también pueden ser beneficiosos en la terapia tumoral.

En la Patente estadounidense nº 5.736.137 se describen también anticuerpos terapéuticos marcados radiactivamente para apuntar y destruir linfomas de células B y células tumorales. En particular, el conjugado Y2B8 comprende el mismo anticuerpo monoclonal murido, 2B8, anti-CD20 humano unido a itrio-[90] (⁹⁰Y) a través del mismo quelante bifuncional. Este radionúcleo se seleccionó para la terapia por diversas razones. La vida media de 64 horas del ⁹⁰Y es lo suficientemente larga como para permitir la acumulación del anticuerpo por el tumor y, a diferencia de, por ejemplo, el ¹³¹I, es un emisor puro de beta de elevada energía sin que la acompañe la irradiación gamma en su atenuación, con un rango de 100 a 1000 diámetros celulares. La cantidad mínima de radiación penetrante permite la administración ambulatoria de anticuerpos marcados con ⁹⁰Y. Más aún, no es necesaria la internalización de los anticuerpos marcados para matar la célula, y la emisión local de radiación ionizante debe ser letal para células tumorales adyacentes que carezcan del antígeno diana.

Puesto que el radionúcleo ⁹⁰Y se unió al mismo anticuerpo 2B8 usando la misma molécula quelante bifuncional MX-DTPA, el conjugado de Y2B8 posee las mismas ventajas discutidas más arriba, por ejemplo, una retención incrementada del radionúcleo en un sitio diana (tumor). Sin embargo, a diferencia del ¹¹¹In, no puede usarse para propósitos de visualización de forma debido a la ausencia de radiación gamma asociada con el mismo. Por tanto, un radionúcleo para la representación de imagen de diagnóstico, tal como el ¹¹¹In, puede usarse para determinar la ubicación y tamaño relativo del tumor antes y/o a continuación de la administración de anticuerpos quiméricos terapéuticos marcados con ⁹⁰Y en los regímenes combinados de la invención. Adicionalmente, el anticuerpo marcado con indio permite la realización de la evaluación dosimétrica.

Dependiendo del uso previsto para el anticuerpo, a saber, como un reactivo de diagnóstico o terapéutico, se conocen otros radionúcleos en el estado de la técnica que se han usado con propósitos similares. Por ejemplo, los radionúcleos que se han usado en el diagnóstico clínico incluyen el ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁹⁹Tc, ⁶⁷Ga, así como el ¹¹¹In. Los anticuerpos se han marcado también con una variedad de radionúcleos para un uso potencial en la inmunoterapia dirigida (Peirersz *et al.*, “The use of monoclonal antibody conjugates for the diagnosis and treatment of cancer.” *Immunol. Cell Biol.*

ES 2 317 702 T3

65:111-125 (1987)). Estos radionúcleos incluyen el ¹⁸⁸Re y el ¹⁸⁶Re, así como el ⁹⁰Y, y en menor medida el ¹⁹⁹Au y el ⁶⁷Cu. El I-(131) se ha usado también con propósitos terapéuticos. La Patente estadounidense n° 5.460.785 proporciona un listado de tales radioisótopos y se incorpora en la presente invención por referencia.

5 Como se ha descrito en la Patente estadounidense n° 5.736.137, la administración del conjugado marcado radiactivamente del Y2B8, así como del anticuerpo anti-CD20 quimérico sin marcar, resultó en una reducción significativa del tumor en ratones que albergaban un tumor linfoblástico de células B. Además, los ensayos clínicos en humanos descritos en esa invención mostraron una reducción significativa de células B en pacientes de linfoma infundidos con anticuerpo quimérico anti-CD20. De hecho, el 2B8 quimérico se ha anunciado recientemente como el primer anticuerpo monoclonal anticáncer aprobado por la FDA con el nombre de Rituxan®. Por tanto, al menos un anticuerpo quimérico anti-CD20 ha demostrado eficacia terapéutica en el tratamiento del linfoma de célula B.

10 Además, la Patente estadounidense n° 5.736.137 describe la administración secuencial del Rituxan®, un anti-CD20 quimérico, con anticuerpo monoclonal múrido marcado con ambos o con uno de indio e itrio. Aunque los anticuerpos marcados radiactivamente usados en las terapias combinadas son anticuerpos múridos, el tratamiento inicial con anti-CD20 quimérico reduce suficientemente la población de células B, de tal forma que la respuesta HAMA está disminuida, facilitándose de ese modo un régimen terapéutico y diagnóstico combinado.

15 Por tanto, en este contexto de inmunoterapia combinada, los anticuerpos múridos hallan una utilidad concreta como reactivos de diagnóstico. Además, se mostró en la Patente estadounidense n° 5.736.137 que una dosificación terapéuticamente efectiva de anticuerpo anti-CD20 marcado con itrio, a continuación de la administración de Rituxan® es suficiente para (a) eliminar cualquier resto de células B de sangre periférica no eliminada por el anticuerpo anti-CD20 quimérico; (b) iniciar la eliminación de las células B de los nódulos linfáticos; o (c) iniciar la eliminación de las células B de otros tejidos.

20 Por tanto, la conjugación de marcas radiactivas a los anticuerpos terapéuticos contra el cáncer proporciona una herramienta clínica que puede usarse para evaluar la eficacia terapéutica potencial de tales anticuerpos, crear reactivos de diagnóstico para monitorizar el progreso del tratamiento, y concebir reactivos terapéuticos adicionales, los cuales pueden usarse para potenciar el potencial de destrucción de tumores del anticuerpo quimérico. Dada la eficacia probada de un anticuerpo anti-CD20 en el tratamiento del linfoma de no-Hodgkin, y la conocida sensibilidad de los linfocitos a la radiactividad, sería muy ventajoso que semejantes anticuerpos terapéuticos quiméricos y marcados radiactivamente hallaran un uso en los regímenes terapéuticos combinados que disminuyera la frecuencia de linfomas no-Hodgkin con recaída o resistentes. Además, sería beneficioso si tales regímenes terapéuticos combinados hallaran un uso en el tratamiento de otros linfomas de células B.

25 *LNH folicular o de bajo grado*

Estudios con agente único con LNH con recaída o resistentes

30 La aprobación de la FDA del Rituximab se basó en cinco estudios con agente único, principalmente en pacientes con LNH de bajo grado o folicular. Un estudio clínico en fase I inicial de infusiones únicas de Rituximab que oscilaban entre 10-500 mg/m² demostró que no se había alcanzado la dosis máxima tolerada; sin embargo, la duración del período de infusión a la dosis más elevada no se consideró apropiada para la terapia ambulatoria. El ORR en 15 pacientes fue del 13% (Tabla 1)(6).

35

TABLA 1

Rituximab: Resumen de los resultados de eficacia

Descripción del estudio	Indicación	N*	ORR	CR	PR	Mediana del DR (meses)	Mediana del TIP (meses)	Referencias
Fase VII, dosis única, agente único	Linfoma de célula B con recaída	15	2 (13%)	0 (0%)	2 (13%)	NA†	8,1	6

40

45

TABLA 1**Rituximab: Resumen de los resultados de eficacia**

Descripción del estudio	Indicación	N*	ORR	CR	PR	Mediana del DR (meses)	Mediana del TIP (meses)	Referencias
Fase I/II, múltiples dosis, dosis variable	Linfoma de grado bajo, intermedio y elevado, con recaída	34	17 (50%)	3 (9%)	14 (41%)	8,6	10,2	7
Fase II, múltiples dosis combinadas con CHOP	Linfoma de células B folicular recién diagnosticado y con recaída	38	38 (100%)	22 (58%)	16 (42%)	35,3	36,7	21,22
Fase III, múltiples dosis, agente único	Linfoma de células B de bajo grado o folicular con recaída	151	76 (50%)	9 (6%)	67 (44%)	11,6	13,2	8,9

TABLA 1

Rituximab: Resumen de los resultados de eficacia

Descripción del estudio	Indicación	N*	ORR	CR	PR	Mediana del DR (meses)	Mediana del TIP (meses)	Referencias
Fase II, múltiples dosis, agente único	Linfoma de células B de bajo grado o folicular con recaída	35	21 (60%)	5 (14%)	16 (46%)	13,4	19,4	13
Fase II, Múltiples dosis combinadas con interferón	Linfoma de células B de bajo grado o folicular con recaída	38	17 (45%)	4 (11%)	13 (34%)	22,3	25,2+	29

TABLA 1

Rituximab: Resumen de los resultados de eficacia

Descripción del estudio	Indicación	N*	ORR	CR	PR	Mediana del DR (meses)	Mediana del TIP (meses)	Referencias
Fase II, Múltiples dosis, agente único	Enfermedad masiva, linfoma de células B de bajo grado o folicular con recaída	28	12 (43%)	1 (4%)	11 (39%)	5,9	8,1	14
Fase II, Múltiples dosis, agente único	Linfoma de células B de bajo grado o folicular con recaída, tratamiento de nuevo	57	23 (40%)	6 (11%)	17 (29%)	15,0	16,7	19,20

TABLA 1

Rituximab: Resumen de los resultados de eficacia

Descripción del estudio	Indicación	N*	ORR	CR	PR	Mediana del DR (meses)	Mediana del TIP (meses)	Referencias
Fase II, Múltiples dosis combinadas con la modalidad CHOP	Linfoma de grado intermedio o alto, previamente no tratado	30	29 (96%)	19 (63%)	10 (33%)	11+	17+	34
Fase II, Múltiples dosis alternativa	Linfoma de células B de grado intermedio o alto	54	17 (32%)	5 (9%)	12 (22%)	NA†	8,2+	33

*N = número de paciente que se pudieron evaluar
†no disponible

En la Fase I de un estudio clínico de rango de dosis de Fase I/II, los pacientes recibieron 125-375 mg/m² administrados como cuatro infusiones semanales. No se demostraron toxicidades relacionadas con la dosis, y se escogió 375 mg/m² como la dosis de la Fase II. Se observaron regresiones del tumor en 17 de 37 (46%) pacientes que recibieron esta dosis, incluyendo 3 (8%) respuestas completas (CR) y 14 (38%) respuestas parciales (PR) (7).

A continuación se llevó a cabo un estudio clave de grupo único de Rituximab infundido a 375 mg/m² cuatro veces por semana en 166 pacientes con LNH folicular o de bajo grado, con recaída o resistente (International Working Formulation [IWF] Tipos A-D, y Clasificación REAL, linfoma linfocítico pequeño, centro folicular, grados foliculares I, II, III (8)). Los pacientes con masas tumorales > 10 cm o con > 5000 linfocitos/ μ L en la sangre periférica se excluyeron de este estudio. La mediana de edad era 58 años (105 hombres y 61 mujeres), y la mediana del número de tratamientos previos era tres. La implicación de la médula ósea estaba presente en el 56% de los 149 pacientes evaluados. El cuarenta y cinco por ciento tenía ≥ 2 sitios extranodulares, y el 41% tenía una enfermedad masiva (≥ 5 cm).

La respuesta completa requería la regresión de todos los nódulos linfáticos a $< 1 \times 1$ cm², probada en dos ocasiones, al menos con 28 días de diferencia, en placas de CT del cuello, pecho, abdomen, y pelvis, con la resolución de todos los síntomas y signos del linfoma, y la normalización de la médula ósea, del hígado y del bazo. La respuesta parcial requería una disminución de $\geq 50\%$ en la suma de los productos de mediciones perpendiculares de lesiones, sin ninguna evidencia de enfermedad progresiva durante al menos 28 días. Los pacientes que no consiguieron un CR o una R se

ES 2 317 702 T3

consideraron no respondedores, incluso si se observada una disminución neta (> 50%) medible de la enfermedad. El tiempo hasta la progresión se midió desde la primera infusión hasta la progresión.

5 La tasa de respuesta global (ORR) fue del 48%, con una tasa del 6% de CR y del 42% de PR (8). La mediana del tiempo hasta la progresión (TTP) para los respondedores fue de 13,2 meses, y la mediana de la duración de la respuesta (DR) fue de 11,6 meses. Veintidós de los 80 (28%) respondedores permanecían en remisión en progreso a los 20,9+ a 32,9+ meses (9).

10 La administración de Rituximab resultó en una reducción rápida y sostenida de células B. Las células B circulantes se eliminaron con las tres primeras dosis, con una eliminación sostenida durante hasta de seis a nueve meses después del tratamiento en el 83% de los pacientes. La mediana de los niveles de células B volvió a la normalidad hacia los 12 meses después del tratamiento. Aunque la mediana del recuento de células NK permaneció inalterada, se observó una correlación positiva entre conteos mayores absolutos de células NK al inicio del estudio y la respuesta al Rituximab (10).

15 Se analizaron varios factores pronósticos iniciales para determinar su correlación con la respuesta. Significativamente, en 23 pacientes con recaída después del ABMT o PBSC, el ORR era del 78% en comparación con el 43% en pacientes que no experimentaron un terapia de dosis elevada previa ($p < 0,01$). En un análisis multivariado, el ORR era mayor en pacientes con LNH folicular en comparación con el linfoma linfocítico pequeño (58% vs. 12%, $p < 0,01$), y era mayor en pacientes con recaída quimiosensible en comparación con la recaída quimiorresistentes (53% vs. 36%, $p = 0,06$). No se asoció ningún efecto sobre la tasa de respuesta con: edad > 60 años, enfermedad extranodular, terapia previa con antraciclina, o con la implicación de la médula ósea.

20 Se halló una correlación estadísticamente significativamente entre la mediana de la concentración de anticuerpo en suero y la respuesta en múltiples puntos de verificación durante el tratamiento y el seguimiento (11).

25 Los niveles en suero del anticuerpo eran superiores en pacientes con LNH folicular en comparación con el linfoma linfocítico pequeño. El promedio del anticuerpo en suero también estaba correlacionado inversamente con las mediciones del volumen del tumor y con el número de células B circulantes al inicio del estudio. La asociación de concentraciones inferiores de anticuerpo en suero con números más elevados de células de LNH circulantes y con una mayor masa tumoral sugiere que las células tumorales son el principal modo de eliminación del anticuerpo. La asociación de concentraciones elevadas de anticuerpo en suero con la respuesta, y con una menor masa tumoral o de células circulantes, sugiere que pueden ser necesarias dosis más elevadas o más dosis de Rituximab para inducir respuestas en algunos subconjuntos de pacientes, tales como aquellos con enfermedad masiva.

30 Sin embargo, se observaron respuestas con Rituximab en el 43% de los pacientes con tumores > 5 cm y en el 35% de los pacientes con tumores > 7 cm, lo que sugiere que es factible el tratamiento con Rituximab de pacientes con enfermedad masiva. Esto es sorprendente si se considera que durante mucho tiempo se creyó que la terapia con anticuerpos no es apropiada para tratar la enfermedad masiva debido a la naturaleza compacta de los tumores.

35 En un estudio realizado en Japón (12), los pacientes con linfoma de células B con recaída se trataron con 250 mg/m² (N = 4) o 375 mg/m² (N = 8) de Rituximab cuatro veces por semana. De los 11 pacientes evaluables, 8 tenían LNH folicular, 2 tenían LNH de células grandes difuso, y uno tenía un linfoma de células de manto. Dos de los 11 tuvieron una CR y 5 tuvieron una PR para una ORR del 64%; todos los respondedores tenían histología folicular.

40 Puesto que los niveles en suero de Rituximab y la respuesta se correlacionaron positivamente en estudios previos, se realizó un estudio clínico en Fase II con ocho dosis semanales de 375 mg/m² de Rituximab, en pacientes con LNH folicular o de bajo grado. El ORR fue del 60% en los pacientes evaluables, con una tasa del 14% de CR y del 46% de PR. Los valores de la mediana del TTP en los respondedores y de la DR fueron respectivamente de 13,4+ meses y 19,4+ meses (13). Aunque la comparación entre estudios es difícil, parece ser que el TTP y la DR pueden mejorarse usando más dosis.

45 Contrariamente a las suposiciones iniciales de que la terapia de anticuerpos era útil sólo en la enfermedad micro-metastática, el Rituximab es bastante activo en la enfermedad muy masiva. En un estudio separado, 31 pacientes con LNH masivo, de grado bajo, con recaída o resistente (única lesión de > 10 cm de diámetro) recibieron 375 mg/m² de Rituximab como cuatro infusiones semanales. Doce de los 28 pacientes evaluables (43%) demostraron una CR (1, 4%) o una PR (11, 39%) (14).

Macroglobulinemia de Waldenstrom

50 La macroglobulinemia de Waldenstrom (WM) es un cáncer en el cual los linfocitos B secretan cantidades excesivas de anticuerpos IgM. La WM ocurre usualmente en personas de más de sesenta años, pero se ha detectado en adultos con treinta y pocos años. La WM se considera hoy en día como un cáncer indolente incurable raro, el cual se ha tratado en el pasado mediante plasmáforesis para reducir la viscosidad del suero. A menudo se prescriben fármacos quimioterapéuticos tales como un agente alquilantes y un corticosteroide. El fármaco más recomendado para la WM ha sido la Leustatina (2CdA).

Un informe sobre siete pacientes con macroglobulinemia de Waldenstrom, en donde los pacientes se trataron con Rituximab (375 mg/m² 4 veces por semana) (15) mencionó respuestas en 4 (57%) de los pacientes. La mediana de la supervivencia sin progresión fue de 8 meses (rango 3 - 27+ meses). Por tanto, el Rituximab debe ser útil en los protocolos terapéuticos combinados, particularmente con reactivos quimioterapéuticos tales como el 2CdA.

Leucemia linfocítica crónica (LLC)

La LLC es el equivalente líquido (leucémico) del linfoma linfocítico pequeño (LLP). Los pacientes con LLP tenían niveles en suero inferiores y una tasa de respuesta inferior con la dosis estándar de Rituximab a los pacientes con otros subtipos de LNH de bajo grado. Esto se debe probablemente a los niveles muy elevados de células tumorales circulantes en pacientes con la LLC, y porque se cree que las células cancerosas implicadas en la LLC tienen niveles reducidos de expresión del CD20 sobre la superficie celular.

No obstante, los actuales inventores han descubierto que los cánceres hematológicos tales como la LLC pueden tratarse con Rituximab. Un estudio clínico reciente evaluó el tratamiento de pacientes de la LLC con dosis más elevadas de Rituximab (16). Todos los pacientes recibieron una primera dosis de 375 mg/m³ para minimizar los efectos secundarios relacionados con la infusión. Las dosis semanales subsiguientes (3) permanecieron iguales, pero se administraron con un nivel de dosis incrementado. Dieciséis pacientes se han tratado con dosis de 500-1500 mg/m³. El promedio de edad fue de 66 años (rango, 25-78). El ochenta y uno por ciento tenían una enfermedad en el estadio final III-IV. El conteo medio de leucocitos era 40×10⁹/L (rango 4-200), la Hgb 11,6 g/dl (rango, 7,7-14,7), las plaquetas 75×10⁹/L (rango, 16-160), la mediana de la β₂ inmunoglobulina era de 4,5 mg/L (rango, 3,1-9,2). La mediana del número de terapias previas era 2,5 (rango 1-9). El sesenta por ciento de los pacientes eran resistentes al tratamiento. Dos pacientes desarrollaron una hipertensión grave con la primera dosis (375 mg/m³); otro recibió terapia adicional. La toxicidad a las dosis subsiguientes aumentadas había sido suave, aunque ningún paciente al nivel de dosis de 1500 mg/m³ ha sido completamente evaluado. Ocho pacientes han completado la terapia (4 a 500 mg/m³, 3 a 650 mg/m³, 1 a 825 mg/m³). Un paciente tratado con 560 mg/m³ alcanzó una remisión completa. Un paciente tiene una linfocitosis progresiva con el tratamiento, y todos los otros pacientes tienen una reducción de la linfocitosis de la sangre periférica, pero menos efecto sobre los nódulos linfáticos. Los estudios de escalado de la dosis se están llevando a cabo.

Otra estrategia para mejorar la respuesta en pacientes con la LLC es regular al alza el antígeno CD20 usando citocinas. En un estudio *in vitro*, se incubaron células mononucleares, procedentes de pacientes con LLC, durante 24 horas con varias citocinas. Los resultados de la citometría de flujo mostraron una regulación al alza significativa por parte de la IL-4, el GM-CSF, y el TNF-alfa (17). De hecho, datos recientes sugieren que la regulación al alza del CD20 observada en células de LLC puede estar limitada a las células tumorales (Venogopal *et al.*, Póster - PanPacific Lymphoma Meeting, June 1999. "Cytokine-induced upregulation of CD20 antigen expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells may be limited to tumor cells"). Los datos preliminares sugieren también que el interferón alfa regula al alza el CD20 en células de LLC después de sólo 24 horas cuando se aplica a una concentración de 500 a 1000 U/ml.

Por tanto, mediante la administración de ciertas citocinas a pacientes de LLC antes de o de forma concurrente a la administración del Rituximab, puede regularse al alza la expresión del CD20 sobre la superficie de las células B cancerosas, haciendo de ese modo que el CD20, así como otros marcadores de la superficie celular tales como el CD19, sea una diana más atractiva para la inmunoterapia. Se ha iniciado un estudio en colaboración para ensayar las dosis de citocina óptimas para la regulación al alza *in vivo* del CD20. El protocolo del estudio implica tratar diez paciente inicialmente con GM-CSF a 250 mcg/m² SQ QD ×3, diez pacientes con IL-4 mcg/kg SQ QD ×3, y diez pacientes con G-CSF a 5 mcg/kg SQ QD ×3. Las células mononucleares se separarán mediante centrifugación en Ficoll Hypaque para estudios de apoptosis para determinar si la regulación al alza del CD20 se traduce en una destrucción potenciada de las células tumorales por parte del Rituximab.

El tratamiento con anticuerpo de la LLC puede combinarse con otros tratamientos quimioterapéuticos convencionales que se sabe son útiles para el tratamiento de la LLC. El agente único usado más frecuentemente para la LLC es el Clorambucil (Leukeran), administrado bien a 0,1 mg/kg diariamente o de 0,4 a 1,0 mg/kg cada 4 semanas. El Clorambucil se combina a menudo con Prednisona oral (de 30 a 100 mg/m²/d), la cual es útil en la gestión de las citopenias autoinmunes. La Ciclofosfamida es una alternativa al Clorambucil, siendo la dosis usual 1-2 g/m² cada 3-4 semanas, junto con Vincristina y esteroides (por ejemplo, el régimen COP).

Varias combinaciones de fármacos se han usado para la LCC, incluyendo la COP (Ciclofosfamida, Oncovin, y Prednisona), y la CHOP (estos tres fármacos más la Doxorubicina). La Fludarabina ha mostrado un efecto en el tratamiento de la LLC, y ha dado una ORR de 50% en un grupo de pacientes tratados con 25-30 mg/m²/d cada 3-4 semanas. Aunque algunos pacientes han mostrado ser resistentes a la Fludarabina. Tales pacientes pueden ser resistentes también a la 2-CdA puesto que, a menudo, los pacientes que son resistentes a la Fludarabina son resistentes también a la 2-CdA (O'Brien *et al.*, N. Engl. J. Med. 330:319-322 (1994)).

Por tanto, la terapia con anticuerpo anti-CD20 será particularmente útil para pacientes que son resistentes o que han recaído después del tratamiento con fármacos quimioterapéuticos. En estos pacientes, la terapia con Rituximab puede combinarse también con radioterapia. La TBI con un tamaño de fracción bajo de 15 cGy para dosis totales de 75 a 150 cGy se ha mostrado que es efectiva en aproximadamente un tercio de los pacientes.

ES 2 317 702 T3

Actualmente, el CALGB (“Cancer and Leukemia Group B” del NCI) está realizando un ensayo clínico en Fase II en pacientes con LLC. El Rituximab y la Fludarabina se administran de forma concurrente, seguidos por consolidación con Rituximab, comparados con inducción con Fludarabina seguida por Rituximab.

5 *Rituximab con terapia mieloablativa*

La terapia mieloablativa ha provocado respuestas en linfomas indolentes; sin embargo, las células tumorales residuales pueden permanecer a pesar de la terapia de dosis elevada, y las PBSC reinfundidas pueden contener células tumorales. El Rituximab es está usando antes de la movilización de las células madre y después del trasplante para reducir las células tumorales CD20+ residuales y la contaminación de la médula ósea o de las células madre recolectadas. Los resultados provisionales demuestran que no había células CD20+ detectables entre las células recolectadas. Dieciocho de 24 pacientes alcanzaron un injerto funcional y el tratamiento fue bien tolerado. La PCR en reposo está en marcha para evaluar las células tumorales residuales (18).

15 *Tratamiento de nuevo de LNH de bajo grado con recaída con Rituximab*

Se ha descrito un ensayo que evaluaba el tratamiento de nuevo de 53 pacientes que habían respondido al Rituximab y más tarde habían recaído (19). Siete de 56 pacientes evaluables (13%) obtuvieron una CR y 16 una PR (29%), para una ORR de 42%. Cuatro pacientes que habían tenido una segunda respuesta recibieron un tercer tratamiento; 3 de estos respondieron.

Después del tratamiento con dos cursos de Rituximab, el tumor de un paciente, inicialmente clasificado como LNH folicular de células pequeñas hendidas, ya no expresó el antígeno CD20, y fue insensible al Rituximab en el momento de su transformación en LNH difuso de células grandes (20).

Por tanto, mientras que el tratamiento de nuevo con Rituximab es efectivo para tratar pacientes que han recaído después de un tratamiento previo con Rituximab, puede haber una incidencia incrementada de células tumorales CD20- después del tratamiento secundario. Esta observación respalda la utilidad de los regímenes de tratamiento terapéutico combinado descritos más arriba.

30 *Combinación del Rituximab y de la quimioterapia CHOP para el LNH de bajo grado*

La quimioterapia con Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, y Prednisona (CHOP) es una terapia primaria efectiva para el LNH folicular o de bajo grado. Aunque las tasas de respuesta inicial son elevadas, eventualmente se presenta la recaída, y los regímenes de quimioterapia subsiguientes producen remisiones con duraciones más cortas. Se inició un estudio clínico en Fase II para evaluar la combinación de CHOP y Rituximab (21) en LNH foliculares o de bajo grado recién diagnosticados y con recaída, porque sus mecanismos de acción no presentan resistencia cruzada, y el Rituximab presenta sinergia con ciertos fármacos citotóxicos, incluyendo la Doxorubicina (5).

Veintinueve de 38 pacientes no recibieron terapia anticáncer previa. El CHOP se administró en las dosis estándares, cada tres semanas, durante seis ciclos, con seis infusiones de Rituximab (375 mg/m²). Las infusiones de Rituximab 1 y 2 se administraron en los Días 1 y 6 antes del primer ciclo de CHOP, el cual se inició el Día 8. La infusiones de Rituximab 3 y 4 se administraron respectivamente 2 días antes del tercer y quinto ciclos de CHOP, y las infusiones 5 y 6 se administraron respectivamente los días 134 y 141, después del sexto ciclo de CHOP.

En este estudio de combinación, respondieron el 100% de los 38 pacientes tratados (CR, 58%; PR, 42%). De los 35 pacientes evaluables que completaron el tratamiento, hubieron un 63% de CR, y un 37% de PR(21). La mediana de DR es 35,3+ meses, sin que se alcanzara la mediana de la supervivencia libre de progresión transcurrida una mediana de tiempo de observación de 36,7+ meses. Veinte pacientes están todavía en remisión después de 36+ meses a 53,4+ meses (22). Esta DR es impresionante incluso para un tratamiento primario, y el 24% de esta población de ensayo había recaído después de la quimioterapia.

En un estudio a realizar por el CALGB, 40 pacientes con LNH de bajo grado recibirán Rituximab 8 veces por semana y Ciclofosfamida a diario empezando el Día 8. Veinte pacientes recibirán Rituximab solo durante 8 dosis semanales.

Un estudio clínico en Fase III, realizado por el ECOG en pacientes con LNH de bajo grado, está comparando la combinación de Ciclofosfamida y Fludarabina (Grupo A) con la terapia de CVP estándar (Grupo B). En la distribución aleatoria al Grupo A o Grupo B, los pacientes se estratifican por edad, incidencia del tumor, histología, y síntomas B. Los respondedores en ambos brazos experimentarán una segunda distribución aleatoria entre terapia de mantenimiento con Rituximab (375 mg/m² 4 veces por semana, cada 6 meses, durante 2 años (Grupo C), u observación (Grupo D).

Combinación del Rituximab con citocinas

65 *Rituximab más interferón alfa*

El interferón es una citocina implicada en la modulación del sistema inmunitario (23). Los mecanismos mediante los cuales el interferón puede incrementar la eficacia de los anticuerpos incluyen la potenciación de la expresión

del antígeno (24), un apuntamiento incrementado de los anticuerpos hacia los tumores (25, 26), y la citotoxicidad potenciada de las inmunotoxinas (27).

En un ensayo de combinación, se suministraron interferón-alfa (Roferon-A), una citocina con una actividad clínica de agente único para el LNH (28) y Rituximab a pacientes con un LNH folicular o de grado bajo con recaída. El interferón-alfa (2,5 ó 5 MIU) se administró subcutáneamente, tres veces por semana durante 12 semanas. El Rituximab se administró mediante infusión IV semanalmente durante cuatro dosis (375 mg/m²), empezando la quinta semana de tratamiento. La ORR fue del 45% (17/38 pacientes); el 11% tenía una CR y el 34% tenía una PR. Los estimados de Kaplan-Meier de la mediana de la DR y TTP en los respondedores fueron respectivamente 22,3+ y 25,2+ meses (29). Los estudios de combinación previos del interferón-alfa y los regímenes quimioterapéuticos que contenían antraciclinas rindieron un tiempo hasta la progresión incrementado, pero no incrementaron de forma consistente la respuesta o las tasas de supervivencia (30-32). Estos primeros resultados sugieren que la combinación del Rituximab y del interferón-alfa pueden prolongar el tiempo hasta la progresión en comparación con el Rituximab solo.

15 *Rituximab más G-CSF*

En un estudio separado, el Rituximab y el G-CSF se están evaluando con el LNH de bajo grado con recaída. Se ha demostrado *in vitro*, así como *in vivo*, en voluntarios sanos que el G-CSF, a través de su efecto sobre las células mieloides precursoras, induce neutrófilos FcRI-positivos que son capaces de funcionar como células efectoras en el ADCC. Por tanto, se inició un estudio clínico en Fase I/II para evaluar la toxicidad y eficacia del tratamiento combinado.

Tanto en Fase I como en Fase II, se administró a los pacientes una dosis estándar de G-CSF (5 Pg/kg/día) durante tres días, empezando 2 días antes de la administración de Rituximab. La Fase I consistía en un escalado de la dosis de Rituximab (125, 250, ó 375 mg/m² semanalmente ×4). Los resultados iniciales en 9 pacientes evaluados hasta el momento rindieron una ORR del 67% (44% de CR, 22% de PR) con una toxicidad menor en 8 de los 9 pacientes (33). Los sucesos adversos más frecuentes fueron la fiebre (4/8 pacientes), la rinitis (4/8), los resfriados (3/8) y los dolores de cabeza (3/8), los cuales eran comparables a los sucesos adversos observados previamente con la administración de Rituximab solo. Se ha iniciado la parte de la Fase II del estudio, la cual examinará la eficacia de la combinación del G-CSF y 375 mg/m² de Rituximab ×4.

30 *Rituximab más IL-2*

La terapia de dosis elevada con células madre de sangre periférica (PBSC) autólogas o rescate con médula ósea (BM) se ha usado para tratar el LNH, sin embargo, el éxito permanece limitado debido al elevado riesgo de recaída, que es del 50-80%. En un esfuerzo por mejorar las remisiones duraderas postrasplante, se ha estudiado la inmunoterapia, incluyendo la terapia de dosis elevada y dosis baja con IL-2, en un cierto número de centros de tratamiento. Tales estudios han sugerido que la terapia con IL-2 demuestra una actividad antitumor postrasplante temprana.

Inicialmente, a continuación de un trasplante autólogo, los pacientes muestran una reconstitución inmunitaria retardada, la cual potencialmente se traduce en una erradicación inmunomediada disminuida del tumor (43, 44). Además, se ha observado que el número tanto de células CDS+ T como de células CD8+ citotóxicas ha disminuido (45-49). Los ensayos *in vitro* han demostrado una supresión profunda de las respuestas citolítica y de proliferación de las células T, así como una producción disminuida de IL-2 en respuesta a mitógenos y antígenos solubles. Sin embargo, la IL-2 soluble es capaz de restablecer estas respuestas inmunitarias, lo cual sugiere que las células inmunitarias en pacientes, después del trasplante autólogo, son capaces de responder a la IL-2 exógena (47). A continuación del BMT la actividad de las NK de sangre periférica también permanece más baja respecto a los valores control, y la actividad de las NK también es aumentada por la adición de IL-2 exógena (49). Estos datos sugieren que la administración de IL-2 a pacientes poco después del trasplante de células madre puede potenciar la respuesta inmunitaria en un período crítico, cuando la incidencia del tumor es mínima y cuando se carece de respuesta inmunitaria en ausencia de la IL-2.

Por ejemplo, Caligiuru *et al.* han mostrado que la IL-2 (Hoffman-LaRoche) administrada a 0,45 × 10⁶ U/m²/día mediante CIV de 24 horas durante 12 semanas era capaz de expandir el número absoluto de células NK brillantes para CD56 (50-52). Este régimen se administró a pacientes no trasplantados, en el servicio ambulatorio, con poca toxicidad.

Los modelos animales han mostrado que dosis baja de IL-2 que no inducen LAK potencian dramáticamente la actividad antitumoral cuando se administran con células efectoras T específicas para el tumor (53). Además, Soiffer *et al.* (54) administraron dosis bajas de IL-2 a 13 receptores de BMT autólogo o de BMT alogénico desprovisto de células T, los cuales estaban en tratamiento a causa de una leucemia o linfoma con recaída. La respuesta inmunológica potenciada se demostró en el laboratorio con un incremento de 5 a 40 veces en las células NK CD3- CD16+ brillantes para CD56. Además, este régimen de dosis baja de IL-2 resultó en una destrucción *in vitro* aumentada de las dianas K562 de las NK. Cuando Soiffer *et al.* (55) actualizaron el resultado de 29 pacientes de BMT alogénicos que recibieron una dosis baja de IL-2, hallaron una supervivencia superior para esos pacientes (70%) en comparación con los controles histológicos (30%, p = 0,41).

Lauria *et al.* (56) trataron 11 pacientes con LNH de grado elevado, a una mediana de 42 días después del ABMT, con IL-2 a una dosis de 2×10⁶ IU/m² qod durante dos semanas, y a continuación 3×10⁶ IU/m² dos veces por semana

durante un año. Los análisis fenotípicos mostraron un incremento persistente y significativo ($p = 0,001$) en la proporción y número absoluto de linfocitos totales, y especialmente de células NK, tanto CD16 como CD56, después de 6 meses de terapia. Ninguno de los pacientes progresó, con una mediana de seguimiento de veintidós meses (rango 10-42 meses), después del inicio de la terapia. Además, dos pacientes con una enfermedad residual después del ABMT, uno en el hígado y el segundo en los nódulos linfáticos, obtuvieron una respuesta completa después de 7 y 10 meses de terapia con IL-2.

Vey *et al.* (57) trataron 25 paciente con HD resistente o con recaída (11 pacientes) y LNH (14 pacientes) con dosis baja de IL-2. El 48% de los pacientes tenían una enfermedad resistente al trasplante y el 84% consiguieron una CR después del ABMT. La IL-2 se inició una media de 54 días después del trasplante, y consistió en un primer ciclo de 5 días seguido por 4 ciclos de 2 días en semanas alternas. Los pacientes recibieron una media de 160×10^6 IU/m² de IL-2. Después de un seguimiento de cinco años, la probabilidad de supervivencia y la DFS son respectivamente del 72% (HD 73% y NHL 70%) y 45% (HD 36% y NHL 48%).

Un grupo del “Fred Hutchinson Cancer Research Center” (FHCRC) ha hallado recientemente que la terapia con dosis baja de IL-2 era bien tolerada en el servicio ambulatorio, y que las remisiones en los pacientes tratados con una dosis baja de IL-2 tendían a ser más duraderas que sin el tratamiento con IL-2. La terapia con IL-2 está asociada con un incremento en el número de ciertas poblaciones de células inmunitarias, incluyendo las células CD8+ CD69+; las células CD16+ CD8+; las células CD16+ CD69+; las células CD16+ CD56+; las células CD16+ CD122+; las células CD16+ Dr+; y las células CD8+ CD56+. Hubo también un incremento en la expresión de la actividad lítica contra las dianas de tumor K562 y Daudi, con una mediana de incremento de 5,9 veces y 6,5 veces respectivamente. Las recaídas, cuando ocurrían, sucedían a una mediana de 17,8 meses después del trasplante, y, por tanto, se informó que las remisiones eran característicamente más largas de lo que se había observado históricamente en receptores de trasplante sin terapia con IL-2.

A causa de los prometedores datos acumulados a partir de estudios de terapia sencilla con IL-2 en receptores de trasplantes ABMT, parecía razonable combinar la terapia con IL-2 con el Rituximab después del trasplante, dado que la actividad biológica del Rituximab parece estar mediada por el ADCC y la actividad lítica mediada por el complemento. Por tanto, se ha iniciado un estudio clínico en Fase I en colaboración con el FHCRC para evaluar la seguridad y la eficacia potencial de un régimen terapéutico combinado.

También se está llevando a cabo un estudio clínico en Fase II para evaluar la eficacia y la incidencia de la formación de HACA en pacientes receptores de IL-2 en dosis baja y Rituxan[®]. Un objetivo específico de este estudio es evaluar si la ADCC se potencia mediante la exposición *in vivo* a la IL-2, y si la actividad ADCC se correlaciona con la respuesta clínica. Los criterios de inclusión para los pacientes son, linfoma de células B folicular, de bajo grado, en estadio II-IV, o de células de manto, confirmado histológicamente. El linfoma de célula de manto, para los propósitos de este estudio, se define como CD5+, CD23- (si está disponible) y/o bc1-1+ mediante inmunohistoquímica. Los pacientes que no respondieron, o que han recaído a continuación de su primer tratamiento con una terapia estándar, es decir, quimioterapia, radioterapia, ABMT, y/o inmunoterapia, son elegibles.

Rituximab más GM-CSF para el tratamiento de linfoma de bajo grado con recaída, o folicular de células B

También se han iniciado dos ensayos clínicos en Fase II distintos para ensayar la eficacia del tratamiento combinado con Rituximab y GM-CSF. Un estudio implica 40 pacientes con linfoma de células B, de bajo grado, con recaída, y comprende administrar Rituximab a 375 mg/m² semanalmente $\times 4$ (d. 1, 8, 15, 22) y GM-CSF (Leukine, Immunex) a 250 mcg sc tres veces por semana durante 8 semanas, empezando una hora antes de la primera dosis de Rituximab. Este estudio se usará para evaluar la eficacia clínica (tasa de respuesta global (ORR), tasa de respuesta completa global, tiempo hasta la progresión, y supervivencia sin fallos) del régimen terapéutico combinado, para caracterizar la seguridad (cualitativa, cuantitativa, duración y reversibilidad de los sucesos adversos) de la terapia combinada, y para determinar los efectos de la terapia combinada sobre los subconjuntos de linfocitos y citocinas relevantes. El segundo estudio planea monitorizar también los parámetros inmunológicos para evaluar los mecanismos de destrucción (complemento C3 y C4, CH50, citometría de flujo para CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 y CD56, y ensayo de la ADCC).

Rituximab más Interferón-gamma

El interferón-gamma puede ser útil también en terapia combinada con el Rituximab para tratar pacientes con linfomas de bajo grado o de grado superior. Se ha hallado recientemente que el interferón-gamma regula al alza la expresión del CD20 en células plasmáticas de pacientes con mieloma múltiple (MM), en células B de pacientes, así como en células B de donantes normales (Treon *et al.*, Lugano, 1999). De hecho, Treon y colaboradores han mostrado que el interferón-gamma aumenta la unión de estas células al Rituximab. La inducción de la expresión de CD20 sobre las células plasmáticas ocurrió de manera dependiente de la dosis, observándose una regulación al alza con tan poco como 1 U/ml de interferón-gamma. Se alcanzó un techo a 100 U/ml a las 48 horas. Por tanto, el interferón-gamma puede ser beneficioso también cuando se administra en combinación con Rituximab.

*LNH de grado intermedio y grado elevado**Estudios con un único agente*

5 En un estudio realizado en Europa y Australia, se evaluaron pautas de dosificación alternativas en 54 pacientes con LNH de grado intermedio o elevado, resistentes o con recaída (34). El Rituximab es infundido a 375 mg/m² semanalmente para 8 dosis, o a 375 mg/m² una vez seguida por 500 mg/m² semanalmente para 7 dosis. La ORR fue del 31%; (CR 9%, PR 22%), no se observó una diferencia significativa entre los regímenes de dosificación. Los
10 pacientes con un linfoma difuso de células grandes (N = 30) tuvieron una ORR del 37%, y aquellos con linfoma de células de manto (N = 12) tuvieron una ORR del 33%.

Combinación de Rituximab y quimioterapia CHOP

15 En otro estudio, 31 pacientes con LNH de grado intermedio o elevado (19 mujeres, 12 hombres, mediana de edad 49) recibieron Rituximab el Día 1 de cada uno de los seis ciclos de 21 días de CHOP (35). De los 30 pacientes evaluables, hubo 19 CR (63%) y 10 PR (33%), para una ORR de 96%. Se consideró que este régimen era bien tolerado y puede resultar en tasas de respuesta más elevadas que con Rituximab o CHOP solos.

20 La división Tratamiento y Diagnóstico del Cáncer del NCI está colaborando con IDEC Pharmaceuticals Corporation para explorar el tratamiento con Rituximab en otras enfermedades. ECOG, CALGB y SWOG están llevando a cabo un ensayo clínico en Fase II de CHOP en comparación con CHOP y Rituximab en paciente ancianos (> 60 años) con LNH con histología mixta, difuso de células grandes y células grandes inmunoblástico (planeado N = 630). Este estudio incluye una segunda distribución aleatorio para el mantenimiento con Rituximab en comparación con sin-
25 mantenimiento.

También está en marcha, en el Dana Farber Institute, un ensayo clínico de Fase III de Rituximab y CHOP en 40
pacientes con linfoma de células de manto previamente no tratado. El Rituximab se administra el Día 1 y el CHOP se proporciona en los Días 1-3 cada 21 días, durante 6 ciclos. La acumulación para este estudio se ha completado. También se ha completado un ensayo clínico en Fase II de CHOP seguido por Rituximab en linfoma folicular recién
30 diagnosticado, realizado por SWOG. Los resultados de estos dos ensayos están siendo analizados.

Está en marcha un ensayo clínico en Fase II de CHOP y Rituximab en comparación con CHOP solo en LNH relacionado con el VIH, realizado por el AIDS Malignancy Consortium; se han planificado 120 pacientes.

Rituximab después de terapia mieloablative con recaída

35 El Rituximab ha mostrado resultados iniciales prometedores en pacientes con LNH de grado intermedio con recaída después de una terapia de dosis elevad con apoyo mediante PBSC autólogo. Seis de siete pacientes respondieron (1 CR y 5 PR), y un paciente tenía una enfermedad estable; la terapia fue bien tolerada (36).
40

Experiencia de seguridad

45 Los sucesos adversos y los datos de laboratorio clínico de 315 pacientes en los cinco estudios en EE.UU. con un único agente se combinaron para proporcionar un perfil de seguridad del Rituximab en pacientes con LNH folicular o de bajo grado. La mayoría de los efectos adversos estaban relacionados con la infusión, y ocurrieron con frecuencia decreciente después de la primera infusión. Los sucesos más comunes relacionados con la infusión fueron la fiebre (49%), los resfriados (32%), las náuseas (18%), la fatiga (16%), el dolor de cabeza (14%), el angioedema (13%), el prurito (10%), y ocasionalmente la hipotensión (10%) y el broncoespasmo (8%). Durante el período de tratamiento
50 (hasta 30 días después de la última dosis), el 10% de los pacientes experimentaron sucesos adversos de Grado 3 ó 4, los cuales estaban principalmente relacionados con la infusión o eran hematológicos. La trombocitopenia (< 50.000 plaquetas/mm³) ocurrió en el 1,3% de los pacientes, la neutropenia (< 1000/mm³) sucedió en el 1,9%, y la anemia (< 8 gm/dL) ocurrió en el 1,0%. Aunque el Rituximab indujo la eliminación de células B en el 70% - 80% de los pacientes, en una minoría de pacientes se observaron inmunoglobulinas del suero anormalmente disminuidas, y la incidencia de infecciones no parece estar incrementada.
55

La hipotensión con necesidad de interrumpir la infusión de Rituximab ocurrió en el 10% de los pacientes, y fue de Grado 3 ó 4 en el 1%. El angioedema se mencionó en el 13% de los pacientes, y se consideró serio en un paciente. El broncoespasmo ocurrió en el 8% de los pacientes; el 2% se trataron con broncodilatador. Se mencionó un único informe de broncolitis obliterante. La mayoría de los pacientes no experimentaron toxicidades adicionales relacionadas con la infusión con la segunda y subsiguientes infusiones. El porcentaje de pacientes que mencionaron sucesos adversos a partir del tratamiento de nuevo fue similar al mencionado a partir del primer curso de tratamiento (14).
60

Cuatro pacientes desarrollaron arritmias durante la infusión con Rituximab. En uno de los cuatro se interrumpió el tratamiento a causa de taquicardia ventricular y taquicardia supraventricular. Los otros tres pacientes experimentaron trigeminia (N = 1) y pulso irregular (N = 2), y no precisaron de interrupción de la terapia. Se informó de una angina durante la infusión, y cuatro días después de la infusión ocurrió un infarto de miocardio en un sujeto con una historia previa de infarto de miocardio.
65

La incidencia global de sucesos adversos y de sucesos adversos de Grado 3 y 4 fue mayor en paciente con enfermedad masiva que en pacientes con enfermedad no masiva. La incidencia de mareos, neutropenia, trombocitopenia, mialgia, anemia, y dolor torácico fue más elevada en pacientes con lesiones > 10 cm. La incidencia de neutropenia de Grado 3 ó 4, de anemia, de hipotensión, y de disnea fue también mayor en pacientes con enfermedad masiva en comparación con pacientes con lesiones de 10 cm (19).

Desde la aprobación en 1997 del Rituximab por parte de la FDA para el tratamiento de LNH de bajo grado o folicular resistente o con recaída, se han tratado un número estimado de 17.000 pacientes. En mayo de 1998, se resumieron las descripciones de ocho informes posteriores a la comercialización sobre sucesos adversos graves relacionados con la infusión, asociados con el uso de Rituximab, los cuales resultaron en desenlaces fatales cuando se resumieron. En siete de los ocho fallecidos, los síntomas graves ocurrieron durante la primera infusión de Rituximab. La causa de la muerte no se mencionó o permanece desconocida en dos de los ocho casos. Los sucesos respiratorios graves, incluyendo la hipoxia, los infiltrados pulmonares, o el síndrome de dificultad respiratoria adulta, contribuyeron a seis de las ocho muertes mencionadas. Un paciente tenía un conteo de linfocitos previo al tratamiento de 600.000/mm³; otro, tenía un nivel de creatinina de 8; un tercero, tenía una frecuencia respiratoria de 40; y un cuarto, pancitopenia. Los pacientes con una mayor incidencia de tumor, o con un número elevado de células cancerosas circulantes, pueden presentar un riesgo más elevado, y estos pacientes deben monitorizarse detenidamente a través de cada infusión.

La mayoría de los sucesos adversos descritos recientemente se habían observado previamente en los estudios clínicos del Rituximab. Una excepción notable es un síndrome relacionado con la infusión y asociado con la lisis tumoral rápida, el cual se mencionó en seis pacientes con números elevados de células tumorales circulantes (37, 38). Este síndrome se caracterizó por fiebre, rigores, broncoespasmo asociado con hipoxemia, una rápida disminución en linfocitos periféricos, la evidencia en laboratorio de la destrucción del tumor, y una trombocitopenia grave transitoria. Estos pacientes tenían diagnósticos de leucemia prolinfocítica B (N = 2), leucemia linfocítica crónica (N = 2), linfoma de células de manto (N = 1), o LNH transformado (N = 1); todos tenían una adenopatía masiva de linfocitos circulantes, y organomegalia. Aunque cinco de estos seis pacientes necesitaron hospitalización, los síntomas se resolvieron y los tratamientos subsiguientes con Rituximab fueron tolerados bien; el último paciente rechazó la terapia adicional y murió de enfermedad progresiva dos semanas más tarde.

En un informe distinto de siete pacientes con CLL y un paciente con linfoma de células de manto, el síndrome de la lisis tumoral se observó, después de la primera infusión con Rituximab, en aquellos pacientes con conteos de linfocitos > 10×10⁹L (39).

Radioinmunoterapia con anticuerpo anti-CD20 marcado con ⁹⁰itrio en combinación con rituximab

Otra estrategia terapéutica al LNH bajo evaluación es un anticuerpo anti-CD20 marcado radiactivamente (IDEC-Y2B8) en combinación con el Rituximab. El IDEC-Y2B8 (⁹⁰Y-Ibritumornab Tiuxetan) es un anticuerpo anti-CD20 de IgG1 kappa múrida, conjugado a ⁹⁰Y a través de un quelante, el MX-DTPA, es cual está unido covalentemente al anticuerpo. El Rituximab (250 mg/m²) se administra antes del IDEC-Y2B8 para eliminar los linfocitos B periféricos y mejorar la biodistribución del anticuerpo marcado radiactivamente.

En un estudio en Fase I/II recientemente descrito (40-42), se trataron pacientes con LNH de bajo grado (N = 34), LNH de grado intermedio (N = 14), o linfoma de células de manto (N = 3) con IDEC-Y2B8. La mediana de edad fue de 60, el 71% eran hombres, y el 96% eran caucásicos. De 51 pacientes con LNH resistente o con recaída, 34 (67%) respondieron a dosis únicas de 0,2, 0,3 o 0,4 mCi/kg de IDEC-Y2B8. La ORR fue del 82% (28/34) para los pacientes con LNH folicular o de grado bajo, y fue del 43% (6/14) para pacientes con linfoma de grado intermedio. No respondió ningún paciente con la enfermedad de células de manto.

Está en marcha un estudio aleatorizado en Fase III que compara el IDEC-Y2B8 con el Rituximab (375 mg/m² semanalmente ×4) para el tratamiento de pacientes con LNH folicular de bajo grado o transformado. También se está realizando otro ensayo clínico en Fase III con pacientes con NHL con recaída, los cuales son resistentes al Rituximab.

Resumen

En ausencia de una terapia curativa para el LNH, el objetivo del tratamiento es conseguir controlar la enfermedad durante una duración que tenga sentido, y proporcionar alivio de los síntomas relacionados con el tumor sin una toxicidad indebida. El tratamiento con Rituximab es una terapia breve, ambulatoria, cada 22 días, con sucesos adversos limitados en la mayoría de los pacientes. En estudios clínicos, el 50% de los pacientes evaluables con LNH folicular o de bajo grado, con recaída o resistentes a la quimioterapia, consiguieron respuestas completas o parciales. Estas respuestas eran duraderas sin terapia de mantenimiento; la mediana del TTP para los respondedores fue de 13,3 meses, y la mediana de la DR fue de 11,6 meses en el estudio clave.

El Rituximab está aprobado como un tratamiento seguro y efectivo para pacientes con LNH de células B folicular o de bajo grado, con recaída. Tiene una actividad clínica significativa, un novedoso mecanismo de acción, y se compara favorablemente con terapias alternativas es tasa de respuesta y en duración de la respuesta. La finalización de los

estudios en curso verificará el papel de los regímenes de Rituximab alternativos y del Rituximab en el tratamiento de otros cánceres de linfocitos B CD20+.

Referencias

- 5 1. **Press O, Appelbaum F, Ledbetter J, Martin P, Zarling J, Kidd P, Thomas E.** Monoclonal antibody IF5 (anti-CD20) serotherapy of human B-cell lymphomas. *Blood* 1987; 69:584-591.
- 10 2. **Dillman R.** Antibodies as cytotoxic therapy. *Journal of Clinical Oncology* 1994; 12:1497-1515.
3. **Grossbard M, Press O, Appelbaum F, Bernstein I, Nadler L.** Monoclonal antibody-based therapies of leukemia and lymphoma. *Blood* 1992; 80:863-878.
- 15 4. **Reff M, Camer K, Chambers K, Chinn P, Leonard J, Raab R, Newman R, Hanna N, Anderson D.** Depletion of B cells *in vivo* by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994; 83:435-445.
- 20 5. **Demidem A, Lam T, Alas S, Hariharan K, Hanna N, Bonavida B.** Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 1997; 12:177-186.
- 25 6. **Maloney D, Liles T, Czerwinski D, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo-López A, Levy R.** Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma, *Blood* 1994; 84:2457-2466.
- 30 7. **Maloney D, Grillo-López A, White C, Bodkin D, Schilder R, Neidhart J, Janakiraman N, Foon K, Liles T-M, Dallaire B, Wey K, Royston I, Davis T, Levy R** IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90: 2188-2195.
- 35 8. **McLaughlin P, Grillo-López A, Link B, Levy R, Czuczman M, Williams M, Heyman M, Bence-Bruckler I, White C, Cabanillas F, Jain V, Ho A, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire B.** Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a 4-dose treatment program. *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16:2825-2833.
- 40 9. **McLaughlin P, Grillo-López A, Maloney D, Link B, Levy R, Czuczman M, Cabanillas F, Dallaire B, White C.** Efficacy controls in long-term follow-up of patients treated with rituximab for relapsed or refractory, low-grade or follicular NHL. *Blood* 1998; 92:414a-415a.
- 45 10. **Janakiraman N, McLaughlin P, White C, Maloney D, Shen D, Grillo-López A.** Rituximab: Correlation between effector cells and clinical activity in NHL. *Blood* 1998; 92 (10 Suppl 1):337a.
- 50 11. **Berinstein N, Grillo-López A, White C, Bence-Bruckler I, Maloney D, Czuczman M, Green D, Rosenberg J, McLaughlin P, Shen D.** Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology* 1998; 9:995-1001.
- 55 12. **Tobinai K, Kobayashi Y, Narabayashi M, Ogura M, Kagami Y, Morishima Y, Ohtsu T, Igarashi T, Sasaki Y, Kinoshita T, Murate T.** Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) in relapsed B-cell lymphoma. *Annals of Oncology* 1998; 9:527-534.
- 60 13. **Piro L, White C, Grillo-López A, Janakiraman N, Saven A, Beck T, Varns C, Shuey S, Czuczman M, Lynch J, Koltitz J, Jain V.** Extended Rituxan (anti-CD20 monoclonal antibody) therapy for relapsed or refractory low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. 1999; Submitted.
- 65 14. **Davis T, White C, Grillo-López A, Velasquez W, Link B, Maloney D, Dillman R, Williams M, Mohrbacher A, Weaver R, Dowden S, Levy R.** Rituximab: First report of a Phase II (PII) trial in NHL patients (pts) with bulky disease. *Blood* 1998; 92 (10 Suppl 1):414a.
15. **Byrd J, White C, Thomas S, Veldsquez W, Rosenberg J, Grillo-López A.** Rituximab therapy in previously treated Waldenström's Macroglobulinemia: Preliminary evidence of activity. *Blood* 1998; 92 (IO Suppl 1): 106(a).
16. **O'Brien S, Freireich E, Andreeff M, Lemer S, Keating M.** Phase I/III Study of Rituxan in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 1998; 92:105a, #431.
17. **Venugopal P, Sivaraman S, Huang X, Chopra H, O'Brein T, Jajeh A, Preisler H.** Upregulation of CD20 expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells by *in vitro* exposure to cytokines. *Blood* 1998; 10:247a.
18. **Flinn I, O'Donnell P, Noga S, Vogelsang G, Grever M, Goodrich A, Abrams R, Marcellus D, Miller C, Jones R, Ambinder R.** *In vivo* purging and adjuvant immunotherapy with Rituximab PBSC transplant for NHL. *Blood* 1998; 92:648a, #2673.

19. **Davis T, Levy R, White C, Czuczman M, McLaughlin P, Link B, Varns C, Weaver R, Grillo-López A.** Rituximab: Phase II (PII) retreatment (ReRx) study in patients (pts) with low-grade or follicular (LG/F) NHL. *Blood* 1998; 92 (10 Suppl 1):414a.
- 5 20. **Davis T, Czerwinski D, Levy R.** Therapy of B cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: In press.
- 10 21. **Czuczman M, Grillo-López A, White C, Saleh M, Gordon L, LoBuglio F, Jonas C, Klippenstein D, Dallaire B, Varns C.** Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 1999; 17:268-276.
- 15 22. **White C, Czuczman M, Grillo-López A, White C, Saleh M, Gordon L, LoBuglio A, Jonas C, Alkuzweny B, Dowen S.** Rituximab/CHOP chemoimmunotherapy in patients (pts) with low grade lymphoma (LG/F NHL): Progression free survival (PFS) after three years (median) follow-up. *Proceedings of ASCO* 1999, In press.
23. **Wadler S, Schwartz E.** Principles in the biomodulation of cytotoxic drugs by interferons. *Seminars in Oncology* 1992; 19:45-48.
- 20 24. **Nakamura K, Kubo A, Hosokawa S, Nagaike K, Hashimoto S.** Effect of alpha-interferon on anti-alpha-fetoprotein monoclonal-antibody targeting of hepatoma. *Oncology* 1993; 50:35-40.
- 25 25. **Greiner J, Guadagni F, Noguchi P, Pestka S, Colcher D, Fisher P, Schlom J.** Recombinant interferon enhances monoclonal antibody-targeting of carcinoma lesions *in vivo*. *Science* 1987; 235:895-898.
26. **Murray J, Zukiwski A, Mujoo K, Rosenblum M.** Recombinant alpha-interferon enhances tumor targeting of an antimelanoma monoclonal antibody *in vivo*. *Journal of Biological Response Modifiers* 1990; 9:556-563.
- 30 27. **Yokota S, Hara H, Luo Y, Seon B.** Synergistic potentiation of *in vivo* antitumor activity of anti-human T-leukemia immunotoxins by recombinant alpha-interferon and daunorubicin. *Cancer Research* 1990; 50:32-37.
- 35 28. **Grillo-López A, Dallaire B, Shen C, Varns C, McClure A, Caralli V.** Treatment options for patients with relapsed low-grade or follicular lymphoma: The role of IDEC-C2B8. *Antibody Immunconjugates and Radiopharmaceuticals* 1995; 8:60.
- 40 29. **Davis T, Maloney D, White C, Grillo-López A, Williams M, Weiner G, Sklenar T, Levy R.** Combination immunotherapy of low grade or follicular (LG/F) non-Hodgkin's lymphoma (NHL) with Rituximab and alpha interferon: Interim analysis. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology* 1998; 17:11a.
- 30 30. **Smalley R, Andersen J, Hawkins M, Bhide V, O'Connell M, Oken M, Borden E.** Interferon alfa combined with cytotoxic chemotherapy for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *New England Journal of Medicine* 1992; 327: 1336-1341.
- 45 31. **Hagenbeek A, Carde P, Meerwaldt JH, Somers R, Thomas J, De Bock R, Raemaekers JM, van Hoof A, De Wolf-Peeters C, van Glabbeke M.** Maintenance of remission with human recombinant interferon alfa-2a in patients with stages In and IV low-grade malignant non-Hodgkin's lymphoma. European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group. *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16:41-47.
- 50 32. **Solal-Céligny P, Lepage E, Brousse N, Tendler C, Brice P, Haioun C, Gabarre J, Pignon B, Tertian G, Bouabdallah R, Rossi J-F, Doyen C, Coiffier B.** Doxorubicin-containing regimen with or without interferon alfa-2b for advanced follicular lymphomas: Final analysis of survival and toxicity in the groupe d'étude des lymphomes folliculaires 86 trial. *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16:2332-2338.
- 55 33. **van der Kolk L, Grillo-López A, Gerritsen W, Jonkhoff A, Baars J, van Oers M.** Chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) plus G-CSF in relapsed B-cell lymphoma: A phase I/II clinical trial. *Blood* 1998; 92:241b, #4037.
- 60 34. **Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, Engert A, Tilly H, Ma D, Johnson P, Lister A, Feuring-Buske M, Radford JA, Capdeville R, Diehl V, Reyes F.** Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase H study. *Blood* 1998; 92:1927-1932.
- 65 35. **Link B, Grossbard M, Fisher R, Czuczman M, Gilman P, Lowe A, Vose J.** Phase II pilot study of the safety and efficacy of rituximab in combination with CHOP chemotherapy in patients with previously untreated- or high-grade NHL. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology* 1998; 17:3a.
36. **Tsai, D, Moore H, Porter D, Vaughn D, Luger S, Loh R, Schuster S, Stadtmauer E.** Progressive intermediate grade non-Hodgkin's lymphoma after high dose therapy and autologous peripheral stem cell transplantation (PSCT) has a high response rate to Rituximab. *Blood* 1998; 92:415a, #1713.

37. **Byrd J, Waselenko J, Maneatis T, Murphy T, Weickum R, Ward F, White C.** Rituximab therapy in hematologic malignancy patients with circulating blood tumor cells: Association with increased infusion-related side effects and rapid tumor lysis. *Blood* 1998; 92 (IO Suppl 1): 106a.
- 5 38. **Jensen M, Winkler U, Manzke O, Diehl V, Engert A.** Rapid tumor lysis in a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia and lymphocytosis treated with an anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC- C2B8, rituximab). *Annals of Hematology* 1998; 77:89-91.
- 10 39. **Winkler U, Jensen M, Manzke O, Tesch H, Bohlen H, Diehl V, Engert A.** Severe side effects in patients with Bcell chronic lymphocytic leukemia (CLL) and lymphocytosis treated with the monoclonal antibody Rituximab. *Blood* 1998; 92:285b, #4228.
- 15 40. **Witzig T, White C, Wiseman G, Gordon L, Emmanouilides C, Raubitschek A, Janakiraman N, Gutheil J, Spies S, Silverman D, Parker E, Grillo-López A.** Phase I/II trial of IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20 positive B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 1999; Submitted.
- 20 41. **Wiseman G, White C, Witzig T, Gordon L, Emmanouilides C, Raubitschek A, Janakiraman N, Spies S, Silverman D, Gutheil J, Schilder R, Parker E, Rosenberg J, Grillo-López A.** IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy: Baseline bone marrow involvement and platelet count are better predictors of hematologic toxicity than dosimetry. *Blood* 1998; 92: 417a.
- 25 42. **Witzig T, White C, Wiseman G, Gordon L, Emmanouilides C, Raubitschek A, Janakiraman N, Spies S, Silverman D, Gutheil J, Schilder R, Ding E, Shen D, Grillo-López A.** IDEC-Y2B8 Radioimmunotherapy: Responses in patients with splenomegaly. *Blood* 1998; 92:417(a).
- 30 43. **Witherspoon RP, Lum LG, Storb R.** Immunologic reconstitution after bone marrow grafting. *Semin Hematol* 21: 2, 1984.
- 35 44. **Anderson, KC et al.** Hematological engraftment and immune reconstitution posttransplant with anti-B1 purged autologous bone marrow. *Blood* 69:597, 1987.
- 40 45. **Lum LG.** Kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* 69:369, 1987.
- 45 46. **Azogui O., Gluckman E., Fradelizi, D.,** Inhibition of IL-2 production after human allogeneic bone marrow transplantation. *J. Immunol.* 131:1205, 1983.
- 40 47. **Welte, K. et al,** Defective Interleukin-2 production in patients after bone marrow transplantation and *in vitro* restoration of defective T lymphocyte proliferation by highly purified Interleukin. *Blood* 64:380, 1984.
- 45 48. **Cayeau, S. et al.,** T-cell ontogeny after bone marrow transplantation: failure to synthesize Interleukin-2 (IL-2) and lack of CD2- and CD3-mediated proliferation by both CDE4+ and CD8+ cells even in the presence of exogenous IL-2. *Blood* 74:2270, 1989.
- 50 49. **Bosley, A. et al.,** Interleukin-2 as consolidative immuotherapy against minimal residual disease. *Nouv Rev Fr Hematol* 32:13, 1990.
- 55 50. **Caligiuri, M.A. et al,** Extended continuous infusion low-dose recombinant Interleukin-2 in advanced cancer. Prolonged immunomodulation without significant toxicity. *J Clin Oncol* 9:2110, 1991.
- 50 51. **Caligiuri, M.A. et al,** Selective immune modulation of NK cells following prolonged infusions of low dose recombinant IL-2. *J. Clin Invest* 91:123, 1993.
- 55 52. **Caligiuri, M.A.,** Low-dose reocmbinant Interleukin-2 therapy: rationale and potential clinical applications. *SEM in Oncol* 20:3, 1993.
- 50 53. **Klarnet, J.P. et al,** Antigen-driven T cell clones can proliferate *in vivo*, eradicate disseminated leukemia and provide specific immunologic memory. *J Immunol.* 138:4012, 1987.
- 60 54. **Soiffer, R.J. et al,** Clinical and immunologic effects of prolonged infusion of low-doe recombinant Interleukin-2 after autologous and T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 79:517, 1992.
- 65 55. **Soiffer, R.J. et al,** Effect of low-dose Interleukin-2 on disease relapse after T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 84:964, 1994.
- 65 56. **Lauria, F. et al,** Immunologic and clinical modifications following low-dose subcutaneous administration of rIL2 in non-Hodgkin's lymphoma patients after autologous bone marrow transplantation. *BMT* 18:79, 1996.

57. **Vey, N. et al**, A pilot study of autologous bone marrow transplantation followed by recombinant Interleukin-2 in malignant lymphomas. *Leukemia & Lymphoma* 21:107, 1996.

58. **Venugopal, P. et al**, Upregulation of CD20 expression in CLL cells by cytokines. *Submitted to ASH Meeting*, December 1998.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante sólo es para provecho del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha tenido sumo cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones, y la EPO rechaza cualquier responsabilidad en este aspecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 4831175 A [0032]
- US 5099069 A [0032]
- US 5246692 A [0032]
- US 5286850 A [0032]
- US 5124471 A [0032]
- US 5736137 A [0034] [0037] [0038] [0039]
- US 5460785 A [0036]

Literatura, aparte de las patentes, citada en la descripción

- The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *New England J. Med.*, 1993, vol. 329 (14), 987-994 [0025]
- **PEIRERSZ et al**. The use of monoclonal antibody conjugates for the diagnosis and treatment of cancer. *Immunol. Cell Biol.*, 1987, vol. 65, 111-125 [0036]
- **O'BRIEN et al**. *N. Engl. J. Med.*, 1994, vol. 330, 319-322 [0061]
- **TREON et al**. *Lugano*, 1999 [0087]
- **PRESS O; APPELBAUM F; LEDBETTER J; MARTIN P; ZARLING J; KIDD P; THOMAS E**. Monoclonal antibody IF5 (anti-CD20) serotherapy of human B-cell lymphomas. *Blood*, 1987, vol. 69, 584-591 [0106]
- **DILLMAN R**. Antibodies as cytotoxic therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 1994, vol. 12, 1497-1515 [0106]
- **GROSSBARD M; PRESS O; APPELBAUM F; BERNSTEIN I; NADLER L**. Monoclonal antibody-based therapies of leukemia and lymphoma. *Blood*, 1992, vol. 80, 863-878 [0106]
- **REFF M; CAMER K; CHAMBERS K; CHINN P; LEONARD J; RAAB R; NEWMAN R; HANNA N; ANDERSON D**. Depletion of B cells *in vivo* by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*, 1994, vol. 83, 435-445 [0106]
- **DEMIDEM A; LAM T; ALAS S; HARIHARAN K; HANNA N; BONAVIDA B**. Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 1997, vol. 12, 177-186 [0106]
- **MALONEY D; LILES T; CZERWINSKI D; WALDICHUK C; ROSENBERG J; GRILLO-LÓPEZ A; LEVY R**. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood*, 1994, vol. 84, 2457-2466 [0106]
- **MALONEY D; GRILLO-LÓPEZ A; WHITE C; BODKIN D; SCHILDER R; NEIDHART J; JANAKIRAMAN N; FOON K; LILES T-M; DALLAIRE B**. Levy R IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 1997, vol. 90, 2188-2195 [0106]

- 5 • **MCLAUGHLIN P; GRILLO-LÓPEZ A; LINK B; LEVY R; CZUCZMAN M; WILLIAMS M; HEYMAN M; BENICE-BRUCKLER I; WHITE C; CABANILLAS F.** Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a 4-dose treatment program. *Journal of Clinical Oncology*, 1998, vol. 16, 2825-2833 [0106]
- 10 • **MCLAUGHLIN P; GRILLO-LÓPEZ A; MALONEY D; LINK B; LEVY R; CZUCZMAN M; CABANILLAS F; DALLAIRE B; WHITE C.** Efficacy controls in long-term follow-up of patients treated with rituximab for relapsed or refractory, low-grade or follicular NHL. *Blood*, 1998, vol. 92, 414a-415a [0106]
- 15 • **JANAKIRAMAN N; MCLAUGHLIN P; WHITE C; MALONEY D; SHEN D; GRILLO-LÓPEZ A.** Rituximab: Correlation between effector cells and clinical activity in NHL. *Blood*, 1998, vol. 92 (1), 337a [0106]
- 20 • **BERINSTEIN N; GRILLO-LÓPEZ A; WHITE C; BENICE-BRUCKLER I; MALONEY D; CZUCZMAN M; GREEN D; ROSENBERG J; MCLAUGHLIN P; SHEN D.** Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology* 1998, vol. 9, 995-1001 [0106]
- 25 • **TOBINAI K; KOBAYASHI Y; NARABAYASHI M; OGURA M; KAGAMI Y; MORISHIMA Y; OHTSU T; IGARASHI T; SASAKI Y; KINOSHITA T.** Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) in relapsed B-cell lymphoma. *Annals of Oncology*, 1998, vol. 9, 527-534 [0106]
- 30 • **PIRO L; WHITE C; GRILLO-LÓPEZ A; JANAKIRAMAN N; SAVEN A; BECK T; VARNS C; SHUEY S; CZUCZMAN M; LYNCH J.** Extended Rituxan (anti-CD20 monoclonal antibody) therapy for relapsed or refractory low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma, 1999 [0106]
- 35 • **DAVIS T; WHITE C; GRILLO-LÓPEZ A; VELASQUEZ W; LINK B; MALONEY D; DILLMAN R; WILLIAMS M; MOHRBACHER A; WEAVER R.** Rituximab: First report of a Phase II (PII) trial in NHL patients (pts) with bulky disease. *Blood*, 1998, vol. 92 (1), 414a [0106]
- 40 • **BYRD J; WHITE C; THOMAS S; VELDSQUEZ W; ROSENBERG J; GRILLO-LÓPEZ A.** Rituximab therapy in previously treated Waldenström's Macroglobulinemia: Preliminary evidence of activity. *Blood*, 1998, vol. 92 (1), 106 [0106]
- 45 • **O'BRIEN S; FREIREICH E; ANDREEFF M; LEMER S; KEATING M.** Phase I/III Study of Rituxan in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*, 1998, vol. 92, 105a [0106]
- 50 • **VENUGOPAL P; SIVARARNAN S; HUANG X; CHOPRA H; O'BREIN T; JAJEH A; PREISLER H.** Upregulation of CD20 expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells by *in vitro* exposure to cytokines. *Blood*, 1998, vol. 10, 247a [0106]
- 55 • **FLINN I; O'DONNELL P; NOGA S; VOGELSANG G; GREVER M; GOODRICH A; ABRAMS R; MARCELLUS D; MILLER C; JONES R.** *In vivo* purging and adjuvant immunotherapy with Rituximab PBSC transplant for NHL. *Blood*, 1998, vol. 92, 648a [0106]
- 60 • **DAVIS T; LEVY R; WHITE C; CZUCZMAN M; MCLAUGHLIN P; LINK B; VARNS C; WEAVER R; GRILLO-LÓPEZ A.** Rituximab: Phase II (PII) retreatment (ReRx) study in patients (pts) with low-grade or follicular (LG/F) NHL. *Blood*, 1998, vol. 92 (1), 414a [0106]
- 65 • **DAVIS T; CZERWINSKI D; LEVY R.** Therapy of B cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clinical Cancer Research*, 1999, 5 [0106]
- **CZUCZMAN M; GRILLO-LÓPEZ A; WHITE C; SALEH M; GORDON L; LOBUGLIO F; JONAS C; KLIPPENSTEIN D; DALLAIRE B; VARNS C.** Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 1999, vol. 17, 268-276 [0106]
- **WHITE C; CZUCZMAN M; GRILLO-LÓPEZ A; WHITE C; SALEH M; GORDON L; LOBUGLIO A; JONAS C; ALKUZWENY B; DOWEN S.** Rituximab/CHOP chemoimmunotherapy in patients (pts) with low grade lymphoma (LG/F NHL): Progression free survival (PFS) after three years (median) follow-up. *Proceedings of ASCO*, 1999 [0106]
- **WADLER S; SCHWARTZ E.** Principles in the biomodulation of cytotoxic drugs by interferons. *Seminars in Oncology*, 1992, vol. 19, 45-48 [0106]

- **NAKAMURA K; KUBO A; HOSOKAWA S; NAGAIKE K; HASHIMOTO S.** Effect of alpha-interferon on anti-alpha-fetoprotein-monoclonal-antibody targeting of hepatoma. *Oncology*, 1993, vol. 50, 35-40 [0106]
- 5 • **GREINER J; GUADAGNI F; NOGUCHI P; PESTKA S; COLCHER D; FISHER P; SCHLOM J.** Recombinant interferon enhances monoclonal antibody-targeting of carcinoma lesions *in vivo*. *Science*, 1987, vol. 235, 895-898 [0106]
- 10 • **MURRAY J; ZUKIWSKI A; MUJOO K; ROSENBLUM M.** Recombinant alpha-interferon enhances tumor targeting of an antimelanoma monoclonal antibody *in vivo*. *Journal of Biological Response Modifiers*, 1990, vol. 9, 556-563
- 15 • **YOKOTA S; HARA H; LUO Y; SEON B.** Synergistic potentiation of *in vivo* antitumor activity of anti-human T-leukemia immunotoxins by recombinant alpha-interferon and daunorubicin. *Cancer Research*, 1990, vol. 50, 32-37 [0106]
- 20 • **GRILLO-LÓPEZ A; DALLAIRE B; SHEN C; VARNIS C; MCCLURE A; CARALLI V.** Treatment options for patients with relapsed low-grade or follicular lymphoma: The role of IDEC-C2B8. *Antibody Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals*, 1995, vol. 8, 60 [0106]
- 25 • **DAVIS T; MALONEY D; WHITE C; GRILLO-LÓPEZ A; WILLIAMS M; WEINER G; SKLENAR T; LEVY R.** Combination immunotherapy of low grade or follicular (LG/F) non-Hodgkin's lymphoma (NHL) with Rituximab and alpha interferon: Interim analysis. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, 1998, vol. 17, 11a [0106]
- 30 • **SMALLEY R; ANDERSEN J; HAWKINS M; BHIDE V; O'CONNELL M; OKEN M; BORDEN E.** Interferon alfa combined with cytotoxic chemotherapy for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 1992, vol. 327, 1336-1341 [0106]
- 35 • **HAGENBEEK A; CARDE P; MEERWALDT JH; SOMERS R; THOMAS J; DE BOCK R; RAEMAEKERS JM; VAN HOOFF A; DE WOLF-PEETERS C; VAN GLABBEKE M.** Maintenance of remission with human recombinant interferon alfa-2a in patients with stages In and IV low-grade malignant non-Hodgkin's lymphoma. European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group. *Journal of Clinical Oncology*, 1998, vol. 16, 41-47 [0106]
- 40 • **SOLAL-CÉLIGNY P; LEPAGE E; BROUSSE N; TENDLER C; BRICE P; HAIOUN C; GABARRE J; PIGNON B; TERTIAN G; BOUABDALLAH R.** Doxorubicin-containing regimen with or without interferon alfa-2b for advanced follicular lymphomas: Final analysis of survival and toxicity in the groupe d'étude des lymphomes folliculaires 86 trial. *Journal of Clinical Oncology*, 1998, vol. 16, 2332-2338 [0106]
- 45 • **VAN DER KOLK L; GRILLO-LÓPEZ A; GERRITSEN W; JONKHOFF A; BAARS J; VAN OERS M.** Chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) plus G-CSF in relapsed B-cell lymphoma: A phase I/II clinical trial. *Blood*, 1998, vol. 92, 241b [0106]
- 50 • **COIFFIER B; HAIOUN C; KETTERER N; ENGERT A; TILLY H; MA D; JOHNSON P; LISTER A; FEURING-BUSKE M; RADFORD JA.** Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase H study. *Blood*, 1998, vol. 92, 1927-1932 [0106]
- 55 • **LINK B; GROSSBARD M; FISHER R; CZUCZMAN M; GILMAN P; LOWE A; VOSE J.** Phase II pilot study of the safety and efficacy of rituximab in combination with CHOP chemotherapy in patients with previously untreated- or high-grade NHL. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, 1998, vol. 17, 3a [0106]
- 60 • **TSAI, D; MOORE H; PORTER D; VAUGHN D; LUGER S; LOH R; SCHUSTER S; STADTMAUER E.** Progressive intermediate grade non-Hodgkin's lymphoma after high dose therapy and autologous peripheral stem cell transplantation (PSCT) has a high response rate to Rituximab. *Blood*, 1998, vol. 92, 415a [0106]
- 65 • **BYRD J; WASELENKO J; MANEATIS T; MURPHY T; WEICKUM R; WARD F; WHITE C.** Rituximab therapy in hematologic malignancy patients with circulating blood tumor cells: Association with increased infusion-related side effects and rapid tumor lysis. *Blood*, 1998, vol. 92 (1), 106a [0106]
- **JENSEN M; WINKLER U; MANZKE O; DIEHL V; ENGERT A.** Rapid tumor lysis in a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia and lymphocytosis treated with an anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC- C2B8, rituximab). *Annals of Hematology*, 1998, vol. 77, 89-91 [0106]
- **WINKLER U; JENSEN M; MANZKE O; TESCH H; BOHLEN H; DIEHL V; ENGERT A.** Severe side effects in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) and lymphocytosis treated with the monoclonal antibody Rituximab. *Blood*, 1998, vol. 92, 285b [0106]

- **WITZIG T; WHITE C; WISEMAN G; GORDON L; EMMANOULIDES C; RAUBITSCHKEK A; JANA-KIRAMAN N; GUTHEIL J; SPIES S; SILVERMAN D.** Phase I/II trial of IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20 positive B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 1999 [0106]
- 5
- **WISEMAN G; WHITE C; WITZIG T; GORDON L; EMMANOULIDES C; RAUBITSCHKEK A; JANA-KIRAMAN N; SPIES S; SILVERMAN D; GUTHEIL J.** IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy: Baseline bone marrow involvement and platelet count are better predictors of hematologic toxicity than dosimetry. *Blood*, 1998, vol. 92, 417a [0106]
- 10
- **WITZIG T; WHITE C; WISEMAN G; GORDON L; EMMANOULIDES C; RAUBITSCHKEK A; JANA-KIRAMAN N; SPIES S; SILVERMAN D; GUTHEIL J.** IDEC-Y2B8 Radioimmunotherapy: Responses in patients with splenomegaly. *Blood*, 1998, vol. 92, 417 [0106]
- 15
- **WITHERSPOON RP; LUM LG; STORB R.** Immunologic reconstitution after bone marrow grafting. *Semin Hematol*, 1984, vol. 21, 2 [0106]
- **ANDERSON, KC et al.** Hematological engraftment and immune reconstitution posttransplant with anti-B1 purged autologous bone marrow. *Blood*, 1987, vol. 69, 597 [0106]
- 20
- **LUM LG.** Kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood*, 1987, vol. 69, 369 [0106]
- **AZOGUI O.; GLUCKMAN E.; FRADELIZI, D.** Inhibition of IL-2 production after human allogeneic bone marrow transplantation. *J. Immunol.*, 1983, vol. 131, 1205 [0106]
- 25
- **WELTE, K. et al.** Defective Interleukin-2 production in patients after bone marrow transplantation and *in vitro* restoration of defective T lymphocyte proliferation by highly purified Interleukin. *Blood*, 1984, vol. 64, 380 [0106]
- 30
- **CAYEAU, S. et al.** T-cell ontogeny after bone marrow transplantation: failure to synthesize Interleukin-2 (IL-2) and lack of CD2- and CD3-mediated proliferation by both CDE4+ and CD8+ cells even in the presence of exogenous IL-2. *Blood*, 1989, vol. 74, 2270 [0106]
- **BOSLEY, A. et al.** Interleukin-2 as consolidative immuotherapy against minimal residual disease. *Nouv Rev Fr Hematol*, 1990, vol. 32, 13 [0106]
- 35
- **CALIGIURI, M.A. et al.** Extended continuous infusion low-dose recombinant Interleukin-2 in advanced cancer. Prolonged immunomodulation without significant toxicity. *J Clin Oncol*, 1991, vol. 9, 2110 [0106]
- 40
- **CALIGIURI, M.A et al.** Selective immune modulation of NK cells following prolonged infusions of low dose recombinant IL-2. *J. Clin Invest*, 1993, vol. 91, 123 [0106]
- **CALIGIURI, M.A.** Low-dose reocmbinant Interleukin-2 therapy: rationale and potential clinical applications. *SEM in Oncol*, 1993, vol. 20, 3 [0106]
- 45
- **KLARNET, J.P et al.** Antigen-driven T cell clones can proliferate *in vivo*, eradicate disseminated leukemia and provide specific immunologic memory. *J Immunol.*, 1987, vol. 138, 4012 [0106]
- **SOIFFER, R.J. et al.** Clinical and immunologic effects of prolonged infusion of low-doe recombinant Interleukin-2 after autologous and T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 1992, vol. 79, 517 [0106]
- 50
- **SOIFFER, R.J. et al.** Effect of low-dose Interleukin-2 on disease relapse after T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 1994, vol. 84, 964 [0106]
- 55
- **LAURIA, F. et al.** Immunologic and clinical modifications following low-dose subcutaneous administration of rIL-2 in non-Hodgkin's lymphoma patients after autologous bone marrow transplantation. *BMT*, 1996, vol. 18, 79 [0106]
- **VEY, N. et al.** A pilot study of autologous bone marrow transplantation followed by recombinant Interleukin-2 in malignant lymphomas. *Leukemia & Lymphoma*, 1996, vol. 21, 107 [0106]
- 60
- **VENUGOPAL, P. et al.** Upregulation of CD20 expression in CLL cells by cytokines. *ASH Meeting*, December 1998 [0106]
- 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un anticuerpo anti-CD20 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del linfoma de células B en un paciente, en donde el anticuerpo es para ser administrado antes de, de forma subsiguiente a, o simultáneamente con la administración de interleucina-2 (IL-2) al paciente.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la cual el anticuerpo es para ser administrado antes de la IL-2.
- 10 3. Utilización según la reivindicación 1, en la cual el anticuerpo es para ser administrado de forma subsiguiente a la IL-2.
4. Utilización según la reivindicación 1, en la cual el anticuerpo es para ser administrado simultáneamente con la IL-2.
- 15 5. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo es el Rituximab.
6. Utilización de un anticuerpo anti-CD20 marcado radiactivamente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del linfoma de células B en un paciente, en donde el paciente es resistente al tratamiento con un anticuerpo quimérico anti-CD20 que no esté marcado radiactivamente.
- 20 7. Utilización según la reivindicación 6, en la cual el anticuerpo anti-CD20 marcado radiactivamente es el ⁹⁰Y-Ibritumomab Tiuxetan.
- 25 8. Anticuerpo anti-CD20 para su uso en un procedimiento para el tratamiento del linfoma de células B en un paciente, comprendiendo el procedimiento la administración del anticuerpo antes de, de forma subsiguiente a, o simultáneamente con la administración de interleucina-2 (IL-2) al paciente.
- 30 9. El anticuerpo según la reivindicación 8, en la cual el anticuerpo se administra en el procedimiento antes de la IL-2.
10. El anticuerpo según la reivindicación 8, en la cual el anticuerpo se administra en el procedimiento de forma subsiguiente a la IL-2.
- 35 11. El anticuerpo según la reivindicación 8, en la cual el anticuerpo se administra en el procedimiento simultáneamente con la IL-2.
12. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde el anticuerpo es el Rituximab.
- 40 13. Anticuerpo anti-CD20 marcado radiactivamente para su uso en un procedimiento para el tratamiento del linfoma de células B en un paciente, en donde el paciente es resistente al tratamiento con un anticuerpo quimérico anti-CD20 que no esté marcado radiactivamente.
- 45 14. Utilización según la reivindicación 13, en la cual el anticuerpo anti-CD20 marcado radiactivamente es el ⁹⁰Y-Ibritumomab Tiuxetan.

50

55

60

65