

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 070**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2008 E 08785642 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 2197918**

54 Título: **Terapia de combinación con anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II**

30 Prioridad:

**05.09.2007 EP 07017337**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**18.03.2014**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH y**  
**ROCHE GLYCART AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FRIESS, THOMAS;**  
**KLEIN, CHRISTIAN y**  
**UMANA, PABLO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 449 070 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

Terapia de combinación con anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II

5 La invención está relacionada con la utilización de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa el CD20, que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo humanizado B-Ly1, al menos un 40% o más de los oligosacáridos de la región Fc de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II no están fucosilados y dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL), y en el que dicho anticuerpo humanizado B-Ly1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) de Id. de Sec. N° 7 y una región variable de la cadena ligera (VL) de Id. de Sec. N° 20. La descripción generalmente está relacionada con la utilización de dos anticuerpos anti-CD20 diferentes para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer, especialmente de un cáncer que expresa los CD20.

15 Antecedentes de la invención

20 La molécula de CD20 (también denominada antígeno de diferenciación restringido a linfocito B humano o Bp35) es una proteína transmembrana hidrofóbica con un peso molecular de aproximadamente 35 kD, que se localiza en los linfocitos pre-B y B maduros (Valentine, M.A., et al. J. Biol. Chem. 264(19) (1989) 11282-11287; y Einfield, D.A., et al. EMBO J. 7(3) (1988) 711-717). CD20 se encuentra en la superficie de más del 90% de las células B de la sangre periférica o los órganos linfoides, se expresa durante el desarrollo temprano de las células pre-B y permanece hasta la diferenciación de la célula plasmática. CD20 está presente tanto en las células B normales como en las células B malignas. En particular, CD20 se expresa en más del 90% de los linfomas de células B no de Hodgkin (NHL) (Anderson, K.C., et al., Blood 63(6) (1984) 1424-1433) pero no se encuentra en las células madre hematopoyéticas, células pro-B, células plasmáticas normales u otros tejidos normales (Tedder, T.F., et al., J. Immunol. 135 (2) (1985) 973- 979).

30 La región del extremo carboxilo de 85 aminoácidos de la proteína CD20 está localizada en el citoplasma. La longitud de esta región contrasta con la de otras estructuras de superficie específicas de las células B, como las cadenas pesadas de la IgM, IgD e IgG o los antígenos de histocompatibilidad de clase I1 a o cadenas  $\beta$ , que poseen regiones intracitoplasmáticas relativamente cortas de 3, 3, 28, 15 y 16 aminoácidos, respectivamente (Komaromy, M., et al., NAR 11 (1983) 6775-6785). De los últimos 61 aminoácidos del extremo carboxilo, 21 son residuos ácidos, mientras sólo 2 son básicos, lo que indica que esta región posee una fuerte carga negativa neta. El número de registro de GenBank es el NP-690605. Se cree que CD20 podría estar involucrado en la regulación de un(os) paso(s) temprano (s) en el proceso de activación y diferenciación de células B (Tedder et al., Eur. J. Immunol. 25 Vol. 16 (1986) 881-887) y podría funcionar como un canal de ion calcio (Tedder, T.F., et al., J. Cell. Biochem. 14D (1990)195).

40 Existen dos tipos diferentes de anticuerpos anti-CD20 que difieren de forma significativa en su forma de unión a CD20 y sus actividades biológicas (Cragg, M.S., et al, Blood, 103 (2004) 2738-2743; y Cragg, M.S., et al, Blood, 101 (2003) 1045-1052). Los anticuerpos de tipo I, como el Rituximab, son potentes en la citotoxicidad mediada por complemento, mientras los anticuerpos tipo II, como el Tositumomab (B1), 11B8 y AT80 o anticuerpos humanizados B-Ly1, inician de forma efectiva la muerte de la célula diana a través de una apoptosis independiente de caspasa con exposición concomitante de fosfatidilserina.

45 Las características comunes que comparten los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II se resumen en la Tabla 1:

Tabla 1: Propiedades de los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II

| Anticuerpos anti-CD20 de tipo I              | Anticuerpos anti-CD20 de tipo II                      |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Epítipo CD20 de tipo I                       | Epítipo CD20 de tipo II                               |
| Localiza el CD20 en balsas lipídicas         | No localiza el CD20 en balsas lipídicas               |
| Aumenta la CDC (si es de isotipo IgG1)       | Disminuye la CDC (si es de isotipo IgG1)              |
| Actividad CCDA (si es de isotipo IgG1)       | Actividad CCDA (si es de isotipo IgG1)                |
| Capacidad de unión completa                  | Capacidad de unión reducida                           |
| Agregación homotípica                        | Agregación homotípica más fuerte                      |
| Inducción de la apoptosis tras unión cruzada | Potente inducción de muerte celular sin unión cruzada |

50 La WO2004035607 está relacionada con los anticuerpos monoclonales humanos contra CD20 y su utilización para el tratamiento de enfermedades asociadas con las células que expresan CD20.

Resumen de la invención

La invención está relacionada con la siguiente terapia de combinación con los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II:

5 [1]. Utilización de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa el CD20, que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo humanizado B-Ly1, al menos el 40% o más de los oligosacáridos de la región Fc de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II son no fucosilados y dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL), y en el que  
10 dicho anticuerpo humanizado B-Ly1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) de Id. de Sec. N° 7 y una región variable de la cadena ligera (VL) de Id. de Sec. N° 20.

15 [2]. Utilización de acuerdo con [1], que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II posee una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) aumentada.

[3]. Un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para su utilización en el tratamiento de un cáncer que expresa CD20 que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo humanizado B-Ly1, al menos el 40% o más de los oligosacáridos de la  
20 región Fc de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II son no fucosilados y dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL), y en el que dicho anticuerpo humanizado B-Ly1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) de Id. de Sec. N° 7 y una región variable de la cadena ligera (VL) de Id. de Sec. N° 20.

25 [4]. El anticuerpo anti-CD20 de tipo I de acuerdo con [3] para su utilización en el tratamiento de un cáncer que expresa CD20 de acuerdo con [3], que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II posee una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) aumentada.

30 La descripción generalmente comprende la utilización de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa el CD20, que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II.

35 La descripción además comprende la utilización de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I como primer anticuerpo anti-CD20 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa CD20 y que se caracteriza porque

a) dicho primer anticuerpo anti-CD20 posee una proporción de capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho primer anticuerpo anti-CD20 comparado con rituximab de 0,8 a 1,2,

40 b) dicho primer anticuerpo anti-CD20 se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II como segundo anticuerpo anti-CD20,

45 c) dicho segundo anticuerpo anti-CD20 posee una proporción de capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho segundo anticuerpo anti-CD20 comparado con el rituximab de 0,3 a 0,6.

La descripción comprende la utilización de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un paciente que sufre un cáncer que expresa CD20 y que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II.

50 La descripción además comprende la utilización de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I como primer anticuerpo anti-CD20 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un paciente que sufre un cáncer que expresa CD20 que se caracteriza porque

55 a) dicho primer anticuerpo anti-CD20 muestra una proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho primer anticuerpo anti-CD20 comparado con rituximab de 0,8 a 1,2,

b) dicho primer anticuerpo anti-CD20 se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II como segundo anticuerpo anti-CD20,

60 c) dicho segundo anticuerpo anti-CD20 muestra una proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho segundo anticuerpo anti-CD20 comparado con rituximab de 0,3 a 0,6.

La descripción además comprende un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para el tratamiento de un cáncer que expresa CD20 y que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II.

5 La descripción además comprende un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para el tratamiento de un paciente que sufre un cáncer que expresa CD20 que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II.

Preferiblemente, el cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL).

10 Preferiblemente, dicho primer y segundo anticuerpo anti-CD20 (tipo I y tipo II) son anticuerpos monoclonales.

Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab.

15 Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo humanizado B-Ly1.

Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II posee una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) aumentada.

20 Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I muestra una proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho primer anticuerpo anti-CD20 comparado con rituximab de 0,9 a 1,1.

25 Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II muestra una proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho segundo anticuerpo anti-CD20 comparado con rituximab de 0,35 a 0,55, más preferiblemente de 0,4 a 0,5.

En una realización preferible de la descripción, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo humanizado B-Ly1 y dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL).

30 La descripción además comprende un equipo que comprende un anticuerpo anti-CD20 de tipo II y un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para el tratamiento de combinación de un paciente que sufre un cáncer que expresa CD20.

35 Preferiblemente, el equipo se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo humanizado B-Ly1 y dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL).

Descripción detallada de la invención

40 El término "anticuerpo" incluye varias formas de anticuerpos lo que incluye pero no se limita a los anticuerpos completos, los anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos diseñados mediante ingeniería genética, como los anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos o anticuerpos recombinantes así como los fragmentos de tales anticuerpos siempre que se mantengan las propiedades características de acuerdo con la descripción.

45 Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se utiliza aquí se refiere a la preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos. De acuerdo con ello, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a los anticuerpos que muestran una única especificidad de unión y que poseen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de la línea germinal de las inmunoglobulinas humanas. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen mediante hibridoma, lo que incluye una célula B obtenida a partir de un animal transgénico no humano, por ejemplo un ratón transgénico, con un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera humana fusionado a una célula inmortalizada.

55 Preferiblemente, dichos primer y segundo anticuerpo anti-CD20 (tipo I y tipo II) son anticuerpos monoclonales.

60 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de un origen o especie y al menos una porción de una región constante derivada de un origen o especie diferente, que normalmente se prepara mediante técnicas de DNA recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana son especialmente preferibles. Tales anticuerpos quiméricos murinos/humanos son el producto de los genes de inmunoglobulina expresados, que comprenden segmentos de DNA que codifican regiones variables de la inmunoglobulina murina y segmentos de DNA que codifican las regiones constantes de la inmunoglobulina humana. Otras formas de

"anticuerpos quiméricos" que se incluyen aquí son aquellas en la que la clase o subclase se ha modificado o cambiado respecto a la del anticuerpo original. Tales anticuerpos "quiméricos" también se denominan "anticuerpos con cambio de clase". Los métodos para producir anticuerpos quiméricos involucran las técnicas convencionales de DNA recombinante y transfección génica ahora bien conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; la US 5.202.238 y US 5.204.244.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a los anticuerpos en los que la región marco o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) se han modificado para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente comparado con la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferible, una CDR murina se injerta en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véase, por ejemplo, Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Las CDR particularmente preferibles corresponden a aquellas que representan las secuencias que reconocen los antígenos indicados anteriormente para los anticuerpos quiméricos y bifuncionales.

El término "anticuerpo humano", como se utiliza aquí, pretende incluir anticuerpos con las regiones variable y constante derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la materia (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. in Chemical Biology. 5 (2001) 368-374). En base a tal tecnología, pueden producirse anticuerpos humanos contra una gran variedad de dianas. Ejemplos de anticuerpos humanos se describen por ejemplo en Kellermann, S. A., et al., Curr Opin Biotechnol. 13 (2002) 593-597.

El término " anticuerpo humano recombinante", como se utiliza aquí, pretende incluir todos los anticuerpo humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante métodos recombinantes, como los anticuerpos aislados a partir de una célula huésped como las células NS0 o CHO o a partir de un animal (por ejemplo un ratón) que es transgénico para los genes o anticuerpos de inmunoglobulina humana que se expresan utilizando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped. Tales anticuerpos recombinantes humanos poseen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana en una forma reorganizada. Los anticuerpos recombinantes humanos aquí descritos se han sometido a hipermutación somática in vivo. Por lo tanto, las secuencias de aminoácido de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se deriven y estén relacionadas con las secuencias VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir en la naturaleza en el repertorio de anticuerpos de línea germinal humana in vivo.

Como se utiliza aquí, "unión específica" o "unión específica a" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD20. Preferiblemente, la afinidad de unión es de un valor de KD de  $10^{-8}$  mol/l o inferior, preferiblemente  $10^{-9}$  mol/l o inferior (por ejemplo  $10^{-10}$  mol/l), más preferiblemente con un valor de KD de  $10^{-10}$  mol/l o inferior (por ejemplo  $10^{-12}$  mol/l). La afinidad de unión se determina mediante un ensayo de unión estándar, como la técnica de resonancia del plasmón en superficie (por ejemplo Biacore®) en las células que expresan CD20.

El término "molécula de ácido nucleico", como se utiliza aquí, pretende incluir moléculas de DNA y moléculas de RNA. Una molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, pero preferiblemente es DNA de doble cadena.

Los "dominios constantes" no están directamente involucrados en la unión de los anticuerpos a un antígeno sino que están involucrados en las funciones efectoras (CCDA, unión al complemento y CDC).

La "región variable" (región variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) como se utiliza aquí indica cada uno de los pares de cadenas ligeras y pesadas que está involucrado directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de las cadenas ligera y pesada humanas poseen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de la complementariedad, CDR). Las regiones marco adoptan una conformación de lámina beta y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de lámina beta. Las CDR en cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional mediante las regiones marco y forman junto con las CDR de la otra cadena el sitio de unión al antígeno. Las regiones CDR3 de la cadena ligera y pesada del anticuerpo juegan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos aquí descritos y por lo tanto proporcionan un objeto adicional de la descripción.

Los términos "región hipervariable" o "porción de unión al antígeno de un anticuerpo" cuando se utiliza aquí se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácido de las "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Las regiones "Framework" o "FR" son aquellas regiones del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable como se han definido aquí. Por lo tanto, las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden de N-terminal a C-terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Especialmente, la

CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión al antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición estándar de Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable".

Los términos "CD20" y "antígeno CD20" se utilizan aquí de forma intercambiable e incluyen cualquier variante, isoforma y especie homóloga del CD20 humano que se exprese de forma natural en las células o se exprese en células transfectadas con el gen CD20. La unión de un anticuerpo de la invención al antígeno CD20 media la muerte de las células que expresan CD20 (por ejemplo, una célula tumoral) al inactivar CD20. La muerte de las células que expresan CD20 puede ocurrir mediante uno o más de los siguientes mecanismos: inducción de muerte celular/apoptosis, CCDA y/o CDC.

Sinónimos de CD20, que se reconocen en la materia, incluyen antígeno CD20 de linfocito B, antígeno B1 de superficie de linfocito B, Leu-16, Bp35, BM5 y LF5.

El término "anticuerpo anti-CD20" de acuerdo con la invención es un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD20. Dependiendo de las propiedades de unión y actividades biológicas de los anticuerpos anti-CD20 al antígeno CD20, pueden distinguirse dos tipos de anticuerpo anti-CD20 (anticuerpos anti-CD20 de tipo I y de tipo II) de acuerdo con Cragg, M.S., et al, Blood 103 (2004) 2738-2743; y Cragg, M.S., et al Blood 101 (2003) 1045-1052, véase la Tabla 2.

Tabla 2: Propiedades de los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y de tipo II

| Anticuerpos anti-CD20 de tipo I                 | Anticuerpos anti-CD20 de tipo II                        |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| epítopo CD20 de tipo I                          | epítopo CD20 de tipo II                                 |
| localiza CD20 en las balsas lipídicas           | No localiza CD20 en las balsas lipídicas                |
| CDC aumentada (si es de isotipo IgG1)           | CDC reducida (si es de isotipo IgG1)                    |
| actividad CCDA (si es de isotipo IgG1)          | actividad CCDA (si es de isotipo IgG1)                  |
| capacidad de unión completa                     | capacidad de unión reducida                             |
| agregación homotípica                           | agregación homotípica más fuerte                        |
| inducción de apoptosis tras el entrecruzamiento | fuerte inducción de muerte celular sin entrecruzamiento |

Una propiedad esencial de los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y de tipo II es su modo de unión. Así, los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y de tipo II pueden clasificarse mediante la proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 comparado con el rituximab.

Los anticuerpos anti-CD20 de tipo I poseen una proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 comparado con el rituximab de 0,8 a 1,2, preferiblemente de 0,9 a 1,1. Ejemplos de tales anticuerpos anti-CD20 de tipo I incluyen por ejemplo el rituximab, IF5 IgG2a (ECACC, hibridoma; Press, O.W., et al., Blood 69/2 (1987) 584-591), HI47 IgG3 (ECACC, hibridoma), 2C6 IgG1 (como se describe en la WO 2005/103081), 2F2 IgG1 (como se describe en la WO 2004/035607 y WO 2005/103081) y 2H7 IgG1 (como se describe en la WO 2004/056312). Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítopo que el rituximab.

Los anticuerpos anti-CD20 de tipo II poseen una proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 comparado con el rituximab de 0,3 a 0,6, preferiblemente de 0,35 a 0,55, más preferiblemente de 0,4 a 0,5. Ejemplos de tales anticuerpos anti-CD20 de tipo II incluyen por ejemplo tositumomab (IgG2a B1), anticuerpo IgG1 humanizado B-Ly1 (anticuerpo IgG1 quimérico humanizado como el que se describe en la WO 2005/044859), IgG1 11B8 (como se describe en la WO 2004/035607), y IgG1 AT80. Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítopo que el anticuerpo humanizado B-Ly1 (como se describe en la WO 2005/044859).

La "proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de los anticuerpos anti-CD20 comparado con rituximab" se determina mediante una medida de inmunofluorescencia directa (se mide la intensidad de fluorescencia promedio (MFI)) utilizando dicho anticuerpo anti-CD20 conjugado con Cy5 y rituximab conjugado con Cy5 en un FACSArray (Becton Dickinson) con células Raji (ATCC N° CCL-86), como se describe en el ejemplo N° 2, y se calcula como sigue:

Proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) =

$$\frac{\text{MFI (anticuerpo anti-CD20 - Cy5)}}{\text{MFI (rituximab - Cy5)}} \times \frac{\text{proporción de marcado con Cy5 (rituximab - Cy5)}}{\text{proporción de marcado con Cy5 (anticuerpo anti-CD20 - Cy5)}}$$

MFI es la intensidad de fluorescencia promedio. La "proporción de marcado con Cy5" como se utiliza aquí significa el número de moléculas de marcaje Cy5 por molécula de anticuerpo.

5 Normalmente dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I muestra una proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho primer anticuerpo anti-CD20 comparado con el rituximab de 0,8 a 1,2, preferiblemente de 0,9 a 1,1.

10 Normalmente dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II muestra una proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho segundo anticuerpo anti-CD20 comparado con el rituximab de 0,3 a 0,6, preferiblemente de 0,35 a 0,55, más preferiblemente de 0,4 a 0,5.

En una realización preferible dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II, preferiblemente un anticuerpo humanizado B-Ly1, posee una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) aumentada.

15 Por "anticuerpo con una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) aumentada" se entenderá un anticuerpo, tal y como se define aquí ese término, con CCDA aumentada según la determinación realizada mediante cualquier método adecuado conocido para el experto en la materia. Un ensayo in vitro de CCDA aceptado es como sigue:

20 1) el ensayo utiliza células diana que se sabe expresan el antígeno diana reconocido por la región de unión al antígeno del anticuerpo;

25 2) el ensayo utiliza células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), aisladas a partir de la sangre de un donante sano escogido al azar, como células efectoras;

3) el ensayo se realiza de acuerdo con el siguiente protocolo:

30 i) las PBMC se aíslan utilizando procedimientos de centrifugación por densidad estándar y se resuspenden a  $5 \times 10^6$  células/ml en medio de cultivo celular RPMI;

35 ii) las células diana se cultivaron mediante métodos estándar de cultivo de tejidos, se recogieron en la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad superior al 90%, se lavaron con medio de cultivo celular RPMI, se marcaron con 100 microcuries de  $^{125}\text{I}$ , se lavaron dos veces con medio de cultivo celular, y se resuspendieron en medio de cultivo celular a una densidad de  $10^6$  células/ml;

iii) 100 microlitros de la suspensión final de células diana anterior se transfirieron a cada pocillo de una placa microtitulada de 96 pocillos;

40 iv) el anticuerpo se diluyó de forma seriada de 4000 ng/ml a 0,04 ng/ml en medio de cultivo celular y se añadieron 50 microlitros de las soluciones de anticuerpo resultantes a las células diana en la placa microtitulada de 96 pocillos, analizando por triplicado varias concentraciones de anticuerpo que cubran el rango de concentraciones anterior al completo;

45 v) para los controles de liberación máxima (MR), tres pocillos adicionales en la placa que contiene las células diana marcadas, recibieron 50 microlitros de una solución acuosa al 2% (VN) de detergente no iónico (Nonidet, Sigma, St. Louis), en lugar de la solución de anticuerpo (del punto iv anterior);

50 vi) para los controles de liberación espontánea (SR), tres pocillos adicionales en la placa que contiene las células diana marcadas, recibieron 50 microlitros de medio de cultivo celular RPMI en lugar de la solución de anticuerpo (del punto iv anterior);

vii) luego se centrifugó la placa microtitulada de 96 pocillos a  $50 \times g$  durante 1 minuto y se incubó durante 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ ;

55 viii) se añadieron 50 microlitros de la suspensión de PBMC (del punto i anterior) a cada pocillo para dar lugar a una proporción de efector: célula diana de 25: 1 y las placas se situaron en un incubador con una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% a  $37^\circ\text{C}$  durante 4 horas;

60 ix) el sobrenadante libre de células de cada pocillo se recogió y la radioactividad liberada experimentalmente (ER) se cuantificó utilizando un contador gamma;

x) el porcentaje de lisis específica se calculó para cada concentración de anticuerpo de acuerdo con la fórmula  $(ER-MR) / (MR-SR) \times 100$ , en la que ER es la radioactividad promedio cuantificada (véase el punto ix anterior) para esa concentración de anticuerpo, MR es la radioactividad promedio cuantificada (véase el punto ix anterior) para los controles MR (véase el punto v anterior), y SR es la radioactividad promedio cuantificada (véase el punto ix anterior) para los controles SR (véase el punto vi anterior);

4) La "CCDA aumentada" se define como un aumento en el porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del rango de concentraciones de anticuerpo analizado anteriormente, y/o una reducción en la concentración del anticuerpo es necesaria para alcanzar la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del rango de concentraciones de anticuerpo analizado anteriormente. El aumento de la CCDA está en relación a la CCDA, medida con el ensayo anterior, mediada por el mismo anticuerpo, producido por el mismo tipo de células huésped, utilizando los mismos métodos estándar de producción, purificación, formulación y almacenamiento, que son conocidos para los expertos en la materia, pero que no se han obtenido mediante células huésped manipuladas para que sobre-expresen la GnTIII.

Dicha "CCDA aumentada" puede obtenerse mediante la glucomodificación de dicho anticuerpos, lo que significa potenciar dichas funciones efectoras naturales mediadas por células de los anticuerpos monoclonales al modificar su componente oligosacárido como se describe en Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 y US 6.602.684.

El término "citotoxicidad dependiente de complemento (CDC)" se refiere a la lisis de las células tumorales diana humanas por el anticuerpo aquí descrito en presencia del complemento. La CDC se mide preferiblemente mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan CD20 con un anticuerpo anti-CD20 como los aquí descritos en presencia del complemento. La CDC se encuentra si el anticuerpo a una concentración de 100 nM induce la lisis (muerte celular) del 20% o más de las células tumorales tras 4 horas. El ensayo se realizó preferiblemente con células tumorales marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  o Eu y la medida del  $^{51}\text{Cr}$  o Eu liberado. Los controles incluyen la incubación de las células tumorales diana con el complemento pero sin el anticuerpo.

Normalmente, los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II de isotipo IgG1 muestran propiedades características de CDC. Los anticuerpos anti-CD20 de tipo I poseen una CDC aumentada (si son de isotipo IgG1) y los anticuerpos anti-CD20 de tipo II poseen una CDC reducida (si son de isotipo IgG1) comparado el uno con el otro. Preferiblemente, ambos anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II son anticuerpos de isotipo IgG1.

El anticuerpo "rituximab" es un dominio constante murino gamma 1 humano quimérico modificado genéticamente que contiene un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD20 humano. Este anticuerpo quimérico contiene dominios constantes gamma 1 humanos y se identifica mediante el nombre "C2B8" en la US 5.736.137 (Andersen, et. al.), registrada el 17 de abril de 1998, asignada a IDEC Pharmaceuticals Corporation. El Rituximab está aprobado para el tratamiento de pacientes con linfoma de células B, no de Hodgkin, positivo para CD20, de bajo grado o folicular, recidivado o refractario. Estudios in vitro del mecanismo de acción han demostrado que el rituximab muestra citotoxicidad dependiente del complemento humano (CDC) (Reiff, M.E., et. al, *Blood* 83(2) 435-445 (1994)). Además, muestra una actividad significativa en ensayos que miden la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA).

El término "anticuerpo humanizado B-Ly1" se refiere a un anticuerpo humanizado B-Ly1 como se describe en la WO 2005/044859 y WO 2007/031875, que se obtuvo a partir de un anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 B-Ly1 (región variable de la cadena pesada (VH) murina: Id. de Sec. N°: 1; región variable de la cadena ligera (VL) murina: Id. de Sec. N°: 2- véase Poppema, S. y Visser, L., *Biotest Bulletin* 3 (1987) 131-139;) mediante quimerización con un dominio constante humano de la IgG1 y tras la humanización (véanse la WO 2005/044859 y WO 2007/031875). Estos "anticuerpos humanizados B-Ly1" se describen en detalle en las WO 2005/044859 y WO 2007/031875.

Preferiblemente, el "anticuerpo humanizado B-Ly1" posee una región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de entre el grupo de Id. de Sec. N° 3 a Id. de Sec. N° 19 (de B-HH2 a B-HH9, B-HL8, y de B-HL10 a B-HL17 de la WO 2005/044859 y WO 2007/031875). Son especialmente preferibles las Id. de Sec. N° 3, 4, 7, 9, 11, 13 y 15 (B-HH2, BHH-3, B-HH6, B-HHB, B-HL8, B-HL11 y B-HL13 de la WO 2005/044859). Preferiblemente, el "anticuerpo humanizado B-Ly1" posee la región variable de la cadena ligera (VL) de Id. de Sec. N° 20 (B-KV1 de la WO 2005/044859). Además el anticuerpo humanizado B-Ly1 es preferiblemente un anticuerpo IgG1. Preferiblemente, tales anticuerpos humanizados B-Ly1 están glucomodificados (GE) en la región Fc de acuerdo con los procedimientos descritos en la WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 y la WO 99/154342. Tales anticuerpos humanizados B-Ly1 glucomodificados poseen un patrón alterado de glucosilación en la región Fc, preferiblemente poseen un nivel reducido de residuos de fucosa. Preferiblemente, al menos un 40% o más (en una realización entre el 40% y 60%, en otra realización al menos del 50%, y en otra realización al menos del 70% o más) de los oligosacáridos de la región Fc están no fucosilados. Además, los oligosacáridos de la región Fc son preferiblemente bisectados.



La descripción comprende la utilización de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa CD20 y que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II.

5 La descripción comprende la utilización de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un paciente que sufre un cáncer que expresa CD20 y que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II.

10 Preferiblemente, la utilización se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es el rituximab, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo humanizado B-Ly1 y dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL).

15 El componente oligosacárido puede afectar significativamente a las propiedades relacionadas con la eficacia de una glucoproteína terapéutica, lo que incluye la estabilidad física, resistencia al ataque de las proteasas, interacciones con el sistema inmune, farmacocinética, y actividad biológica específica. Tales propiedades pueden depender no sólo de la presencia o ausencia, sino también de las estructuras específicas de los oligosacáridos. Pueden hacerse algunas generalizaciones entre estructura de los oligosacáridos y función de la glucoproteína. Por ejemplo, ciertas estructuras de los oligosacáridos median la rápida eliminación de la glucoproteína del flujo sanguíneo a través de las interacciones con proteínas específicas de unión a carbohidratos, mientras otras pueden unirse mediante anticuerpos y disparar reacciones inmunes no deseadas. (Jenkins, N., et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-81).

25 Las células de mamífero son los huéspedes preferibles para la producción de glucoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad de glucosilar las proteínas en la forma más compatible para una aplicación humana (Cumming, D.A., et al., *Glycobiology* 1 (1991) 115-30; Jenkins, N., et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-81). Las bacterias muy raramente glucosilan las proteínas, y como otros tipos de huéspedes comunes, como las levaduras, hongos filamentosos, células de insecto y vegetales, dan lugar a patrones de glucosilación asociados con una rápida eliminación del flujo sanguíneo, interacciones inmunes no deseadas, y en algunos casos específicos, una actividad biológica reducida. Entre las células de mamífero, las células de ovario de hámster chino (CHO) son más comúnmente utilizadas durante las dos últimas décadas. Además de proporcionar patrones de glucosilación adecuados, estas células permiten la generación consistente de líneas celulares clonales genéticamente estables, altamente productivas. Pueden cultivarse hasta densidades elevadas en bioreactores simples utilizando medios libres de suero, y permite el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales comúnmente utilizadas incluyen las células de riñón de cría de hámster (BHK) y las células de mieloma de ratón NSO y SP2/0. Más recientemente, también se ha analizado la producción a partir de animales transgénicos (Jenkins, N., et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-81).

40 Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidratos en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada, y cada isotipo posee una disposición distinta de la estructura de carbohidratos N-ligados, lo que afecta de forma variable el ensamblaje de proteínas, la secreción o actividad funcional (Wright, A., y Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). La estructura de los carbohidratos N-ligados unidos varía considerablemente, dependiendo del grado de procesado, y puede incluir oligosacáridos de alta manosa, con ramificaciones múltiples así como complejos biantenarios (Wright, A., y Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). Normalmente, se da un procesado heterogéneo de las estructuras del núcleo del oligosacárido unidas en un lugar de glucosilación particular de forma que incluso los anticuerpos monoclonales existen en múltiples glucoformas. Asimismo, se ha demostrado que ocurren grandes diferencias en la glucosilación de anticuerpos entre líneas celulares, e incluso se observan pequeñas diferencias para una línea celular dada cultivada bajo diferentes condiciones de cultivo (Lifely, M. R. et al., *Glycobiology* 5(8) (1995) 813-22).

50 Una forma de obtener grandes aumentos en la potencia, manteniendo un proceso de producción simple y potencialmente, evitando los efectos colaterales no deseados significativos, es potenciar las funciones efectoras naturales mediadas por células de los anticuerpos monoclonales modificando su componente oligosacárido como se describe en Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 y la US 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos más frecuentemente utilizados en la inmunoterapia del cáncer, son glucoproteínas que poseen un lugar de glucosilación N-ligado conservado en la Asn297 en cada dominio CH<sub>2</sub>. Los dos complejos de oligosacáridos biantenarios unidos a la Asn297 quedan ocultos entre los dominios CH<sub>2</sub>, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico, y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie las funciones efectoras como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5: 813-822 (1995); Jefferis, R., et al., *Immunol. Rev.* 163: 59-76 (1998); Wright, A. y Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15:26-32 (1997)).

Previamente se había demostrado que la sobre-expresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de la  $\beta$ (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa I11 ("GnTII 17y), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos

bisectados, que aumentan significativamente la actividad CCDA in vitro de un anticuerpo monoclonal quimérico anti-neuroblastoma (chCE7) producido mediante células CHO modificadas (véase Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; y WO 99/154342).

5 El anticuerpo chCE7 pertenece a una gran clase de anticuerpos monoclonales no conjugados que poseen una elevada afinidad y especificidad tumoral, pero que poseen una potencia demasiado baja para ser útiles a nivel clínico cuando se producen en líneas celulares industriales estándar que carecen de la enzima GnTIII (Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180). Ese estudio fue el primero en demostrar que pueden obtenerse grandes aumentos de la actividad CCDA modificando las células productoras del anticuerpo para que expresen la GnTIII, lo que también resulta en un aumento de la proporción de oligosacáridos bisectados asociados a la región constante (Fc), lo que incluye los oligosacáridos bisectados no fucosilados, por encima de los niveles que se encuentran en los anticuerpos que aparecen en la naturaleza.

15 El término "expresión del antígeno CD20" pretende indicar un nivel significativo de la expresión del antígeno CD20 en una célula, preferiblemente en la superficie de una célula T o célula B, más preferiblemente una célula B, a partir de un tumor o cáncer, respectivamente, preferiblemente un tumor no sólido. Los pacientes con un "cáncer que expresa el CD20" pueden determinarse mediante ensayos estándar conocidos en la materia. Por ejemplo, la expresión del antígeno CD20 se mide utilizando detección inmunohistoquímica (IHC), FACS o mediante la detección basada en la PCR del correspondiente mRNA.

20 El término "cáncer que expresa el CD20" como se utiliza aquí se refiere preferiblemente a los linfomas (preferiblemente linfomas de células B no de Hodgkin (NHL)) y leucemias linfocíticas. Tales linfomas y leucemias linfocíticas incluyen por ejemplo a) linfomas foliculares, b) linfomas de células pequeñas no hendidas/ linfoma de Burkitt (lo que incluye el linfoma de Burkitt endémico, linfoma de Burkitt esporádico y linfoma no de Burkitt), c) linfomas de zona marginal (lo que incluye el linfoma de células B de zona marginal extranodal (linfomas asociados a tejido linfático asociado a mucosa, MALT), linfoma de células B de zona marginal nodal y linfoma de zona marginal esplénico), d) linfoma de células del manto (MCL), e) linfoma de células grandes (lo que incluye el linfoma difuso de células B de células grandes (DLCL), linfoma difuso de células mixtas, linfoma inmunoblástico, linfoma de células B primario de mediastino, linfoma de células B pulmonar - linfoma angiocéntrico), f) leucemia de células pilosas, g) linfoma linfocítico, macroglobulinemia de waldenstrom, h) leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL)/ linfoma de linfocitos pequeños (SLL), leucemia prolinfocítica de células B, i) neoplasias de células plasmáticas, mieloma de células plasmáticas, mieloma múltiple, plasmacitoma y j) enfermedad de Hodgkin.

35 Preferiblemente, el cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL). Especialmente el cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células del manto (MCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma difuso de células B de células grandes (DLCL), linfoma de Burkitt, leucemia de células pilosas, linfoma folicular, mieloma múltiple, linfoma de zona marginal, trastorno linfoproliferativo post-transplante (PTLD), linfoma asociado al VIH, macroglobulinemia de waldenstrom o linfoma primario del SNC.

40 El término "un método para tratar" o su equivalente, cuando se aplica a, por ejemplo, el cáncer se refiere a un procedimiento o curso de acción que se diseña para reducir o eliminar el número de células cancerosas en un paciente, o para aliviar los síntomas de un cáncer. Un "método de tratamiento" del cáncer u otro trastorno proliferativo no significa necesariamente que de hecho las células cancerosas u otro trastorno vayan a eliminarse, que el número de células o el trastorno vayan, de hecho, a reducirse, o que los síntomas de un cáncer u otro trastorno vayan, de hecho, a aliviarse. A menudo, un método para tratar el cáncer se realizará incluso con una baja probabilidad de éxito, pero dada la historia médica y las expectativas de supervivencia estimadas de un paciente, sin embargo se considera que puede inducir un curso de acción global beneficioso.

50 Los términos "coadministración" o "coadministrar" se refieren a la administración de dicho primer y segundo anticuerpo anti-CD20 como una única formulación o como dos formulaciones separadas. La coadministración puede ser simultánea o secuencial en cualquier orden, en el que preferiblemente existe un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) ingredientes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Si se utiliza una única formulación, ambos anticuerpos anti-CD20 se coadministran simultáneamente. Si se utilizan dos formulaciones separadas (una para el primer anticuerpo anti-CD20 y otra para el segundo anticuerpo anti-CD20), dichos primer y segundo anticuerpo anti-CD20 se coadministran simultáneamente (por ejemplo mediante una única infusión continua o mediante dos infusiones continuas separadas al mismo tiempo) o secuencialmente. Cuando ambos anticuerpos se coadministran secuencialmente la dosis se administra en el mismo día en dos administraciones separadas, por ejemplo dos infusiones continuas separadas en tiempos diferentes, o uno de los anticuerpos se administra en el día 1 y el segundo anticuerpo se coadministra del día 2 al día 7, preferiblemente de los días 2 a 4. Por lo tanto, el término "secuencialmente" significa dentro de los 7 días siguientes a la dosis del primer anticuerpo, preferiblemente dentro de los 4 días siguientes a la administración del primer anticuerpo; y el término "simultáneamente" significa al mismo tiempo. Los términos "coadministración" con respecto a las dosis de mantenimiento de los anticuerpos anti-CD20 significa que las dosis de mantenimiento pueden coadministrarse simultáneamente, por ejemplo durante una

infusión continua, si el ciclo de tratamiento es apropiado para ambos anticuerpos, por ejemplo cada semana, o bien las dosis de mantenimiento se coadministran secuencialmente, dentro de uno o varios días, por ejemplo la dosis de mantenimiento de uno de los anticuerpos es administra aproximadamente cada semana, y la dosis de mantenimiento del segundo anticuerpo se coadministra también cada 2 semanas. También pueden utilizarse otros ciclos de tratamiento para ambos anticuerpos, normalmente, por ejemplo, de 3 días hasta varias semanas.

Es evidente que los anticuerpos se administran al paciente en una cantidad efectiva a nivel terapéutico, que es la cantidad del compuesto objeto o combinación que provoca la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que busca el investigador, veterinario, médico u otro clínico.

La cantidad de coadministración de dicho primer y segundo anticuerpo anti-CD20 y la pauta de coadministración dependerá del tipo (especie, género, edad, peso, etc.) y estado del paciente a tratar y la gravedad de la enfermedad o estado a tratar. Dicho primer y segundo anticuerpo anti-CD20 se coadministran de forma adecuada al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, alrededor de 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo 0,1-20 mg/kg) de dicho primer o segundo anticuerpo anti-CD20 es una dosis candidata inicial para la coadministración al paciente, si, por ejemplo, se realizan una o más administraciones separadas, o para una infusión continua. En una realización, el tiempo de infusión inicial para dicho primer o segundo anticuerpo anti-CD20 puede ser más largo que los siguientes tiempos de infusión, por ejemplo aproximadamente 90 minutos para la infusión inicial, y aproximadamente 30 minutos para las siguientes infusiones (si la infusión inicial se ha tolerado bien).

Las dosis preferibles de dicho primer o segundo anticuerpo anti-CD20 estarán en el rango de alrededor de 0,05 mg/kg a alrededor de 30 mg/kg. Así, una o más dosis de alrededor de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg (o cualquier combinación de los mismos) puede coadministrarse al paciente. Dependiendo del tipo (especie, género, edad, peso, etc.) y estado del paciente y del tipo del anticuerpo anti-CD20, la dosis de dicho primer anticuerpo puede diferir de la dosis del segundo anticuerpo anti-CD20. Tales dosis pueden coadministrarse de forma diaria o intermitente, por ejemplo cada día del tercero al sexto o incluso de cada semana a cada tres semanas. Puede administrarse una dosis de carga superior inicial, seguida por una o más dosis inferiores.

En una realización preferible, el medicamento es útil para evitar o reducir la metástasis o la diseminación adicional en dicho paciente que sufre un cáncer que expresa el CD20. El medicamento es útil para aumentar la duración del periodo de supervivencia de tal paciente, aumentando el periodo de supervivencia libre de progresión de tal paciente, aumentando la duración de la respuesta, resultando en una mejora estadísticamente y clínicamente significativa del paciente tratado medido según la duración del periodo de supervivencia libre de progresión, la tasa de respuesta o duración de la respuesta. En una realización preferible, el medicamento es útil para aumentar la tasa de respuesta en un grupo de pacientes.

En el contexto de esta invención, pueden utilizarse otros agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o anticancerosos adicionales, o compuestos que potencian los efectos de tales agentes, en el tratamiento de un cáncer que expresa el CD20 con la combinación de anticuerpos anti-CD20. Preferiblemente, el tratamiento con la combinación de anticuerpos anti-CD20 se utiliza sin tales agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o anticancerosos adicionales, o compuestos que potencien los efectos de tales agentes.

Tales agentes incluyen, por ejemplo: agentes alquilantes o agentes con acción alquilante, como la ciclofosfamida (CTX; por ejemplo Cytoxan®), clorambucilo (CHL; por ejemplo Leukeran®), cisplatino (CisP; por ejemplo Platinol®) busulfan (por ejemplo myleran®), melfalan, carmustina (BCNU), estreptozotocina, trietilenmelamina (TEM), mitomicina C, y similares; antimetabolitos, como el metotrexato (MTX), etoposido (VP16; por ejemplo Vepesid®), 6-mercaptopurina (6MP), 6-tioguanina (6TG), citarabina (Ara-C), 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina (por ejemplo Xeloda®), dacarbazina (DTIC), y similares; antibióticos, como actinomicina D, doxorubicina (DXR; por ejemplo Adriamycin®), daunorubicina (daunomicina), bleomicina, mitramicina y similares; alcaloides, como los alcaloides vinca como la vincristina (VCR), vinblastina y similares; y otros agentes antitumorales, como el paclitaxel (por ejemplo Taxol®) y derivados del paclitaxel, los agentes citostáticos, glucocorticoides como dexametasona (DEX; por ejemplo Decadron®) y los corticosteroides como la prednisona, inhibidores de enzimas de nucleósidos como la hidroxiaurea, enzimas de eliminación de aminoácidos como la asparaginasa, leucovorina y otros derivados del ácido fólico, y agentes antitumorales diversos similares. Los siguientes agentes también pueden utilizarse como agentes adicionales: arnifostina (por ejemplo Ethyol®), dactinomicina, mecloretamina (mostaza de nitrógeno), estreptozocina, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), doxorubicina lipo (por ejemplo Doxil®), gemcitabina (por ejemplo Gemzar®), daunorubicina lipo (por ejemplo Daunoxome®), procarbazona, mitomicina, docetaxel (por ejemplo Taxotere®), aldesleuquina, carboplatino, oxaliplatino, cladribina, camptotecina, CPT 11 (irinotecan), 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, ifosfamida, idarubicina, mesna, interferón beta, interferón alfa, mitoxantrona, topotecan, leuprolida, megestrol, melfalan, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobroman, plicamicina, tamoxifeno, teniposido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo,

vinorelbina, clorambucilo. Preferiblemente, el tratamiento de combinación con anticuerpos anti-CD20 se utiliza sin tales agentes adicionales.

5 La utilización de los agentes citotóxicos y anticancerosos anteriormente descritos así como los fármacos anticancerosos antiproliferativos específicos de diana, como los inhibidores de las quinasas de proteínas en los regímenes quimioterapéuticos está generalmente bien caracterizada en la materia de la terapia del cáncer, y su utilización aquí recae en las mismas consideraciones para el seguimiento de su tolerancia y efectividad, y para controlar las vías de administración y dosis, con algunos ajustes. Por ejemplo, las dosis reales de los agentes citotóxicos pueden variar dependiendo de la respuesta de células en cultivo del paciente, determinada utilizando métodos de histocultivo. Generalmente, la dosis se reducirá comparada con la cantidad utilizada en ausencia de otros agentes adicionales.

15 Las dosis típicas de un agente citotóxico efectivo pueden estar en el rango recomendado por el fabricante, y cuando esté indicado por las respuestas in vitro o las respuestas en los modelos animales, puede reducirse la concentración o cantidad en hasta alrededor de un orden de magnitud. Por lo tanto, la dosis real dependerá del juicio del clínico, el estado del paciente, y la efectividad del método terapéutico basado en la respuesta in vitro de las células tumorales en un cultivo primario o muestra de tejido histocultivado, o las respuestas observadas en los modelos animales apropiados.

20 En el contexto de esta descripción, puede utilizarse una cantidad efectiva de radiación ionizante y/o un radiofármaco además del tratamiento de combinación de anticuerpos anti-CD20 del cáncer que expresa el CD20. La fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente a tratar. Cuando la fuente es externa al paciente, la terapia se conoce como terapia de radiación de haz externo (EBRT). Cuando la fuente de radiación es interna al paciente, el tratamiento se denomina braquiterapia (BT). Los átomos radioactivos para su utilización en el contexto de esta invención pueden seleccionarse de entre el grupo que incluye, pero no se limita a, radio, cesio 137, iridio 192, americio 241, oro 198, cobalto 57, cobre 67, tecnecio 99, yodo 123, yodo 131 e indio 111. También es posible marcar el anticuerpo con tales isótopos radioactivos. Preferiblemente, el tratamiento de combinación con anticuerpos anti-CD20 se utiliza sin radiación ionizante.

30 La terapia de radiación es un tratamiento estándar para controlar los tumores irresecables o inoperables y/o las metástasis tumorales. Se han observado resultados mejorados cuando la terapia de radiación se ha combinado con quimioterapia. La terapia de radiación se basa en el principio de que la radiación en elevada dosis liberada en un área diana resultará en la muerte de las células reproductivas tanto en el tejido tumoral como en el normal. El régimen de dosificación de la radiación generalmente se define en términos de dosis de radiación absorbida (Gy), tiempo y fraccionamiento, y debe estar cuidadosamente definido por el oncólogo. La cantidad de radiación que recibe un paciente dependerá de varias consideraciones, pero las dos más importantes son la localización del tumor en relación a otras estructuras u órganos críticos del cuerpo, y la extensión en la que el tumor se ha extendido. Un curso típico de tratamiento para un paciente que se somete a terapia de radiación será un programa de tratamiento a lo largo de un periodo de 1 a 6 semanas, con una dosis total de entre 10 y 80 Gy administrados al paciente en una única fracción diaria de alrededor de 1,8 a 2,0 Gy, 5 días por semana. En una realización preferible aquí descrita existe una sinergia cuando los tumores en pacientes humanos se tratan con el tratamiento de combinación aquí descrito y con radiación. En otras palabras, la inhibición del crecimiento tumoral mediante los agentes que comprende la combinación de la invención se potencia cuando se combina con radiación, opcionalmente con agentes quimioterapéuticos o anticancerosos adicionales. Los parámetros de las terapias de radiación adyuvantes, por ejemplo, están contenidos en la WO 99/60023.

50 Los anticuerpos se administran a un paciente de acuerdo con métodos conocidos, mediante administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, a través de la vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinuival o intratecal. La administración intravenosa o subcutánea de los anticuerpos es preferible.

55 La descripción además comprende un equipo que se caracteriza por que comprende un contenedor, una composición dentro del contenedor que comprende dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I y de tipo II, en forma de una sola o dos formulaciones separadas, y un prospecto con las instrucciones para el usuario de la composición a administrar dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I y de tipo II a un paciente que sufre un cáncer que expresa el CD20.

60 Preferiblemente, el equipo se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es el rituximab, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo humanizado B-Ly1 y dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL).

El término "prospecto" se refiere a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los paquetes comerciales de los productos terapéuticos, lo que puede incluir información acerca de las indicaciones, utilización, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias que conciernen a la utilización de tales productos terapéuticos.

En una realización preferible, los contenedores del artículo elaborado además pueden incluir un transportador aceptable a nivel farmacéutico. El artículo elaborado además puede incluir un diluyente estéril, que preferiblemente se almacena en un contenedor adicional separado.

5 Como se utiliza aquí, un "transportador aceptable a nivel farmacéutico" pretende incluir cualquiera de todos los materiales compatibles con la administración farmacéutica, lo que incluye solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y otros materiales y compuestos compatibles con la administración farmacéutica. Excepto si cualquiera de los medios o  
10 agentes convencionales es incompatible con el compuesto activo, la utilización de los mismos en las composiciones de la invención se contempla. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones.

#### 15 Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos utilizados aquí se preparan para su almacenamiento mezclando un anticuerpo con el grado deseado de pureza con transportadores, excipientes o estabilizantes, opcionales y aceptables a nivel farmacéutico (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los transportadores, excipientes o estabilizantes aceptables son  
20 no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones como el fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, los que incluye el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (como el cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo o alcohol de bencilo; parabenos de alquilo como el metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a alrededor de 10 residuos);  
25 proteínas, como la albúmina sérica, albúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como la glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, lo que incluye la glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como el EDTA; azúcares como la sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos como el TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Las formulaciones aquí descritas pueden ser dos formulaciones separadas para cada uno de los anticuerpos anti-CD20. Alternativamente, la presente formulación también puede contener ambos anticuerpos en una formulación.

35 Adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento o agente antiangiogénico. Tales moléculas están presentes en combinación de forma adecuada en cantidades que son efectivas para el propósito que se pretende.

Los ingredientes activos también pueden incluirse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interracial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilati), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

45 Pueden obtenerse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, y cuyas matrices están en forma de artículos con una forma definida, por ejemplo películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen los poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glucólico como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glucólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

55 Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante su filtración a través de membranas de filtración estériles.

La descripción además comprende un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para el tratamiento de un cáncer que expresa CD20 y que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II.

La descripción además comprende un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para el tratamiento de un paciente que sufre un cáncer que expresa CD20 y que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II.

5 En una realización preferible aquí descrita, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab, dicho anticuerpo anti-CD20 tipo II es un anticuerpo humanizado B-Ly1 y dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL).

10 La descripción además comprende un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para el tratamiento de un cáncer que expresa CD20 o de un paciente que sufre un cáncer que expresa CD20 y que se caracteriza porque

a) dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I muestra una proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I comparado con el rituximab de 0,8 a 1,2,

15 b) dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, y

c) dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II muestra una proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II comparado con el rituximab, de 0,3 a 0,6.

20 Preferiblemente, el cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL).

Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es el rituximab.

Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo humanizado B-Ly1.

25 Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II posee una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) aumentada.

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar en la comprensión de la invención.

30 Listado de secuencias

Id. de Sec. N°: 1 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 B-Ly1.

35 Id. de Sec. N°: 2 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 B-Ly1.

40 Id. de Sec. N°: 3-19 Secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de los anticuerpos humanizados B-Ly1 (B-HH2 to B-HH9, B-HL8, y B-HL10 to B-HL17)

Id. de Sec. N°: 20 Secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo humanizado B-Ly1 B-KV1

45 Descripción de las Figuras

Figura 1 Actividad antitumoral del tratamiento combinado de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I (rituximab) que posee una proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I comparado con el rituximab de 1,0, con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) que posee una proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II comparado con el rituximab de 0,44, en el linfoma no de Hodgkin (NHL) humano OCI-Ly18. Los valores promedios del volumen del tumor [mm<sup>3</sup>] están representados en el eje y, el número de días tras la inyección de células tumorales están representados en el eje x. Leyenda: A) vehículo (círculos), B) rituximab 30 mg/kg i.v. una vez por semana (triángulos), C) B-Ly1 humanizado (B-HH6-B-KV1 GE) 30 mg/kg una vez por semana (cuadrados) y D) rituximab coadministrado con B-HH6-B-KV1 GE (30 mg/kg de cada una vez por semana) (cruces).

Figura 2 Intensidad de la fluorescencia promedio (MFI, eje y izquierdo) del anticuerpo anti-CD20 de tipo I (rituximab-Cy5 = barra blanca) y el anticuerpo anti-CD20 de tipo II (B-Ly1 humanizado-Cy5 B-HH6-B-KV1 GE = barra negra) en células Raji (ATCC N° CCL-86); Proporción de las capacidades de unión a CD20 del anticuerpo anti-CD20 de tipo I (rituximab) y del anticuerpo anti-CD20 de tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) comparado con el rituximab (escala en el eje y derecho).

Figura 3 Actividad antitumoral del tratamiento de dos anticuerpos anti-CD20 de tipo II en el linfoma no de Hodgkin (NHL) humano Z138. Ambos anticuerpos son anticuerpos anti-CD20 humanizados B-Ly1; 1) B-HH6-B-KV1 glucomodificado (GE) y 2) B-HH6-B-KV1 salvaje (wt, no glucomodificado). Los valores promedios del volumen del tumor [mm<sup>3</sup>] están representados en el eje y, el número de días tras la inyección de células tumorales están representados en el eje x. Leyenda: A) vehículo (círculos), B) B-ly1 humanizado GE (B-HH6-B-KV1 GE) 30 mg/kg una vez por semana (triángulos), C) B-ly1 humanizado wt (B-HH6-B-KV1 wt) 30 mg/kg una vez por semana (cruces).

#### Procedimientos experimentales

##### 10 Ejemplo 1

Actividad antitumoral del tratamiento combinado de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I (rituximab) con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II (B-HH6-B-KV1 GE)

##### 15 Agentes de prueba

Se proporcionó el anticuerpo anti-CD20 de tipo I rituximab como una solución de reserva (c = 10 mg/ml) de Hoffmann La Roche, Basilea, Suiza. El tampón contiene polisorbato 80, cloruro sódico y citrato sódico.

20 Se proporcionaron anticuerpos anti-CD20 de tipo II B-HH6-B-KV1 GE (=B-HH6-B-KV1 glucomodificado, humanizado B-Ly1, véanse las WO 2005/044859 y WO 2007/031875) como una solución de reserva (c = 9,4 mg/ml) de GlycArt, Schlieren, Suiza. El tampón del anticuerpo incluyó histidina, trehalosa y polisorbato 20.

Ambas soluciones se diluyeron de forma apropiada en PBS a partir de la reserva previamente a las inyecciones.

25

##### Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizaron células de linfoma no de Hodgkin (NHL) humano OCI-Ly18 (Chang, H., et al, Leuk Lymphoma. 1992 Sep; B(1-2): 129-36) (linfoma difuso de células grandes - DLCL). La línea de células tumorales se cultivó de forma rutinaria en medio INDM (PAA, Laboratories, Austria) suplementado con suero fetal bovino al 20% (PAA Laboratories, Austria) y L-glutamina 2 mM, HEPES 25 nM y mercaptoetanol 0,05 mM a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO<sub>2</sub> al 5%. El pase 2 se utilice para el trasplante.

30

##### Animales

35

Los ratones SCID beige hembra, de 4-5 semanas de edad a su llegada (obtenidos de Bomholtgard, Ry, Dinamarca) se mantuvieron bajo condiciones específicas libres de patógenos con ciclos diarios de 12 h de luz/ 12 h de oscuridad de acuerdo con las guías comprometidas (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental fue revisado y aprobado por las autoridades locales. Tras la llegada de los animales, se mantuvieron en la zona de cuarentena del estabulario durante una semana para que se acostumbraran al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento continuo de la salud de forma regular. Se proporcionaron comida para la dieta (Provimi Kliba 3337) y agua (acidificada a pH 2,5-3) ad libitum.

40

##### Seguimiento

45

Los animales se controlaron diariamente en busca de síntomas clínicos y para la detección de efectos adversos. Para su seguimiento, a lo largo del experimento se registró el peso corporal de los animales dos veces por semana y se midió el volumen del tumor mediante un pie de rey tras la clasificación.

##### 50 Tratamiento de los animales

El tratamiento de los animales se inició el día de la asignación al azar, 24 días tras el trasplante de células. Los grupos que reciben el anticuerpo anti-CD20 de tipo II humanizado B-HH6-B-KV1 GE y el correspondiente grupo control con vehículo se trataron por vía intravenosa cada 7 días en el día de estudio 24, 31, 38, 45 y 52 a la dosis indicada de 30 mg/kg. El tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 de tipo I rituximab como único agente y en combinación con el anticuerpo anti-CD20 de tipo II B-HH6-B-KV1 GE se realizó en los días 26, 33, 40, 47 y 54.

55

##### Estudio de la inhibición del crecimiento tumoral in vivo

60

Los animales que habían desarrollado tumores que recibieron vehículo control se tuvieron que excluir 10 días tras el inicio del tratamiento debido a la carga tumoral. El tratamiento semanal de los animales con Rituximab a 30 mg/kg como único agente inhibió la expansión del xenoinjerto durante 10 días (TGI del 68%). Posteriormente los xenoinjertos tumorales progresaron de forma continua a pesar de las inyecciones adicionales semanales de

Rituximab como único agente. Por el contrario, la terapia con B-HH6-B-KV1 GE (30 mg/kg) como único agente una vez por semana controló el crecimiento tumoral de OCI-Ly18 (TGI del 100%). Sin embargo, finalmente los xenoinjertos tumorales empezaron a progresar bajo la administración de B-HH6-B-KV1 GE como único agente. Sin embargo, la combinación de Rituximab y B-HH6-B-KV1 GE, ambos a 30 mg/kg, mostró una eficacia obviamente superior. Los xenoinjertos tumorales se controlaron y al contrario de lo observado para cada uno de los anticuerpos como agentes únicos la estabilidad de los tumores se mantuvo a los largo del tiempo.

Ejemplo 2

10 Determinación de la proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) del anticuerpo anti-CD20 de tipo II comparado con rituximab

15 Las células Raji (ATCC N° CCL-86) se mantuvieron en cultivo en medio RPMI-1640 (PanBiotech GmbH, N° Cat. PO4-18500) que contiene FCS al 10% (Gibco, N° cat. 10500-064). El anticuerpo anti-CD20 de tipo II B-HH6-B-KV1 (anticuerpo humanizado B-Ly1) y el rituximab se marcaron utilizando Cy5 éster mono NHS (Amersham GE Healthcare, N° Catálogo PA15101) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El rituximab conjugado con Cy5 posee una proporción de marcado de 2,0 moléculas de Cy5 por anticuerpo. El B-HH6-B-KV1 conjugado con Cy5 posee una proporción de marcado de 2,2 moléculas de Cy5 por anticuerpo. Para determinar y comparar las capacidades y modos de unión de ambos anticuerpos, se generaron curvas de unión (mediante titulación de Rituximab conjugado con Cy5 y B-HH6-B-KV1 conjugado con Cy5) por inmunofluorescencia directa utilizando la línea celular de linfoma de Burkitt Raji (ATCC N° CCL-86). Las intensidades de la fluorescencia promedio (MFI) se analizaron como CE50 (50% de la intensidad máxima) para el Rituximab conjugado con Cy5 y el B-HH6-B-KV1 conjugado con Cy5, respectivamente. Se tiñeron  $5 \times 10^5$  células por muestra durante 30 min. a 4 °C. Después, las células se lavaron en medio de cultivo. La tinción con yoduro de propidio (PI) se utilizó para excluir las células muertas. Las medidas se realizaron utilizando un FACSArray (Becton Dickinson), el yoduro de propidio (PI) se midió en el Far Red A y el Cy5 en el Red-A. La figura 2 muestra la intensidad de la fluorescencia promedio (MFI) de la unión a CE50 (50% de la intensidad máxima) del B-HH6-B-KV1 marcado con Cy5 (barra negra) y el rituximab marcado con Cy5 (barra blanca).

30 Por lo tanto la proporción de la capacidad de unión a CD20 en células Raji (ATCC N° CCL-86) se calculó de acuerdo con la siguiente formula:

$$\begin{aligned}
 & \frac{\text{MFI (anticuerpo anti-CD20 – Cy5)}}{\text{MFI (rituximab – Cy5)}} \times \frac{\text{proporción de marcado con Cy5 (rituximab – Cy5)}}{\text{proporción de marcado con Cy5 (anticuerpo anti-CD20 – Cy5)}} \\
 & = \frac{\text{MFI (B-HH6-B-KV1)}}{\text{MFI (rituximab – Cy5)}} \times \frac{\text{proporción de marcado con Cy5 (rituximab – Cy5)}}{\text{proporción de marcado con Cy5 (B-HH6-B-KV1)}} \\
 & = \frac{207}{433} \times \frac{2.2}{2.0} = 0.44
 \end{aligned}$$

45 Por lo tanto, B-HH6-B-KV como anticuerpo anti-CD20 de tipo II típico muestra una capacidad de unión reducida comparado con el rituximab.

Ejemplo 3

50 Similar actividad antitumoral de los anticuerpos anti-CD20 glucomodificados (GE) y no glucomodificados (salvaje, wt) (B-HH6-B-KV1 GE y wt) frente a los xenoinjertos de MCL Z138 en ratones SCID beige

Agentes de prueba

55 Se proporcionaron anticuerpos anti-CD20 de tipo II B-HH6-B-KV1 (glucomodificados (GE) y salvajes (wt)) como solución de reserva (c = 9,4 mg/ml y 12,5 mg/ml) de GlycArt, Schlieren, Suiza. El tampón del anticuerpo incluyó histidina, trehalosa y polisorbato 20.

Ambas soluciones se diluyeron de forma apropiada en PBS a partir de la reserva previamente a las inyecciones.

60 Líneas celulares y condiciones de cultivo



Las células de linfoma de células B no de Hodgkin (NHL) humano Z138 se obtuvieron originalmente de Glycart (linfoma de células del manto - MCL). La línea de células tumorales se cultivó de forma rutinaria en medio DMEM (PAA, Laboratories, Austria) suplementado con suero fetal bovino al 10% (PAA Laboratories, Austria) y L-glutamina 2 mM a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO<sub>2</sub> al 5%. El pase 2 se utilizó para el trasplante.

5

#### Animales

Los ratones SCID beige hembra, de 4-5 semanas de edad a su llegada (obtenidos de Bomholtgard, Ry, Dinamarca) se mantuvieron bajo condiciones específicas libres de patógenos con ciclos diarios de 12 h de luz/ 12 h de oscuridad de acuerdo con las guías comprometidas (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental fue revisado y aprobado por las autoridades locales. Tras la llegada de los animales, se mantuvieron en la zona de cuarentena del estabulario durante una semana para que se acostumbraran al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento continuo de la salud de forma regular. Se proporcionaron comida para la dieta (Provimi Kliba 3337) y agua (acidificada a pH 2,5-3) ad libitum.

15

#### Seguimiento

Los animales se controlaron diariamente en busca de síntomas clínicos y para la detección de efectos adversos. Para su seguimiento, a lo largo del experimento se registró el peso corporal de los animales dos veces por semana y se midió el volumen del tumor mediante un pie de rey empezando en la clasificación.

20

#### Tratamiento de los animales

El tratamiento de los animales se inició el día de la asignación al azar, 14 días tras el trasplante de células subcutáneo. Los grupos que reciben anticuerpos anti-CD20 humanizados (B-HH6-B-KV1 GE y salvaje) y el correspondiente grupo control con vehículo se trataron por vía intravenosa cada 7 días, en el día de estudio 14, 20, 27 y 34 a la dosis indicada de 10 mg/kg.

25

#### Estudio de inhibición del crecimiento tumoral in vivo

30

Los animales que habían desarrollado tumores que recibieron vehículo control se tuvieron que excluir 19 días tras el inicio del tratamiento debido a la carga tumoral. El tratamiento semanal de los animales con B-HH6-B-KV1, salvaje o glucomodificado (B-HH6-B-KV1 GE y wt) a 10 mg/kg inhibió la expansión del xenoinjerto poco tiempo tras el inicio del tratamiento. En el momento de finalización del control todos los tumores mostraron regresión y posteriormente la mayoría de xenoinjertos tumorales Z138 mostraron una remisión completa. No se observaron diferencias significativas entre las versiones salvaje y glucomodificada del anticuerpo anti CD20 B-HH6-B-KV1 en este modelo de xenoinjerto. Esto no es improbable, ya que los ratones no expresan el receptor Fc correcto en sus células NK y además se cree que los ratones SCID beige son incompetentes para la CCDA mediada por NK debido a la triple inmunodeficiencia severa. Por lo tanto, los modelos de xenoinjertos subcutáneos en ratones SCID beige no son apropiados para simular el efecto mediado por la CCDA humana con anticuerpos modificados glucomodificados.

35

40

Listado de secuencias

5 <110> F. Hoffmann-La Roche AG  
<120> Terapia de combinación con anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II  
<130> 24509

10 <150> EP 07017337  
<151> 2007-09-05  
<160> 20

15 <170> PatentIn version 3.2  
<210> 1

20 <211> 112  
<212> PRT

25 <213> Mus sp.  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE

30 <223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 B-Ly1  
<400> 1

ES 2 449 070 T3

Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys  
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu  
 20 25 30

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp  
 35 40 45

Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr  
 50 55 60

Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr  
 65 70 75 80

Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly  
 85 90 95

Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 100 105 110

<210> 2

5 <211> 103

<212> PRT

10 <213> Mus sp.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 B-Ly1

<400> 2

ES 2 449 070 T3

Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser  
 1 5 10 15

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu  
 20 25 30

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn  
 35 40 45

Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr  
 50 55 60

Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val  
 65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly  
 85 90 95

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100

<210> 3

5 <211> 119

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

15 <223> secuencias de aminoácido de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo humanizado B-Ly1 (B-HH2)

<400> 3

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

ES 2 449 070 T3

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 4

5 <211> 119

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

15 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo humanizado B-Ly1 (B-HH3)

<400> 4



ES 2 449 070 T3

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 6

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> secuencias de aminoácido de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo humanizado B-Ly1 (B-HH5)

15

<400> 6

ES 2 449 070 T3

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

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 7

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo humanizado B-Ly1 (B-HH6)

15 <400> 7





ES 2 449 070 T3

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

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

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 9

5 <211> 119

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

15 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo humanizado B-Ly1 (B-HH8)

<400> 9

ES 2 449 070 T3

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 10

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo humanizado B-Ly1 (B-HH9)

15

<400> 10

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

ES 2 449 070 T3

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 11

5 <211> 119

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo humanizado B-Ly1 (B-HL8)

15 <400> 11

ES 2 449 070 T3

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

- 5 <210> 12
- <211> 119
- <212> PRT
- 10 <213> Artificial
- <220>
- 15 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo humanizado B-Ly1 (B-HL10)
- <400> 12



ES 2 449 070 T3

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 14

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo humanizado B-Ly1 (B-HL12)

15

<400> 14

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

ES 2 449 070 T3

35

40

45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 15

<211> 119

5

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo humanizado B-Ly1 (B-HL13)

15

<400> 15



ES 2 449 070 T3

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

- 5 <210> 16
- <211> 119
- <212> PRT
- 10 <213> Artificial
- <220>
- 15 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo humanizado B-Ly1 (B-HL14)
- <400> 16

ES 2 449 070 T3

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 17

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo humanizado B-Ly1 (B-HL15)

15

<400> 17

ES 2 449 070 T3

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 18

5 <211> 119

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

15 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo humanizado B-Ly1 (B-HL16)

<400> 18

ES 2 449 070 T3

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

- 5 <210> 19
- <211> 119
- <212> PRT
- 10 <213> Artificial
- <220>
- 15 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo humanizado B-Ly1 (B-HL17)
- <400> 19



ES 2 449 070 T3

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

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. La utilización de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa el CD20, que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo humanizado B-Ly1, y al menos un 40% o más de los oligosacáridos de la región Fc de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II están no fucosilados, y dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL), y en el que dicho anticuerpo humanizado B-Ly1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) de Id. de Sec. N° 7 y una región variable de la cadena ligera (VL) de Id. de Sec. N° 20.
- 10 2. La utilización de acuerdo con la reivindicación1, que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II posee una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) aumentada.
- 15 3. Un anticuerpo anti-CD20 de tipo I para su utilización en el tratamiento de un cáncer que expresa CD20 que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I se coadministra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo humanizado B-Ly1, y al menos un 40% o más de los oligosacáridos de la región Fc de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II están no fucosilados, y dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL), y en el que dicho anticuerpo humanizado B-Ly1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) de Id. de Sec. N° 7 y una región variable de la cadena ligera (VL) de Id. de Sec. N° 20.
- 20 4. El anticuerpo anti-CD20 de tipo I de acuerdo con reivindicación3 para su utilización en el tratamiento de un cáncer que expresa CD20 de acuerdo con reivindicación 3, que se caracteriza porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II posee una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) aumentada.
- 25

Fig. 1

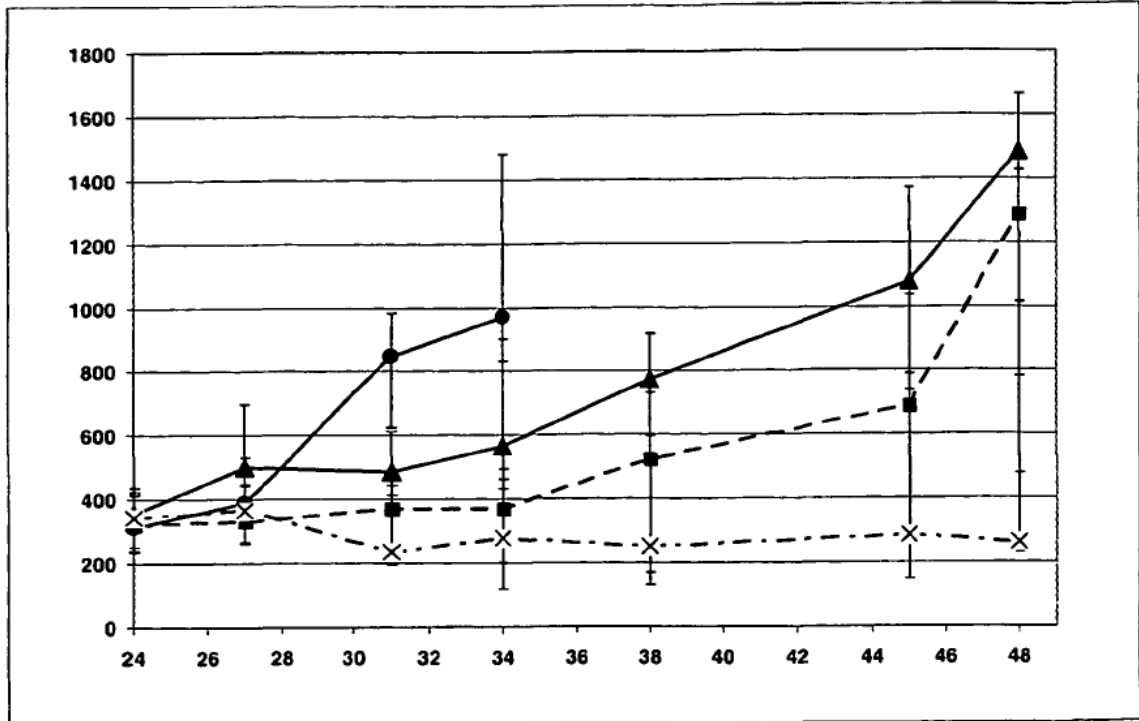




Fig. 2

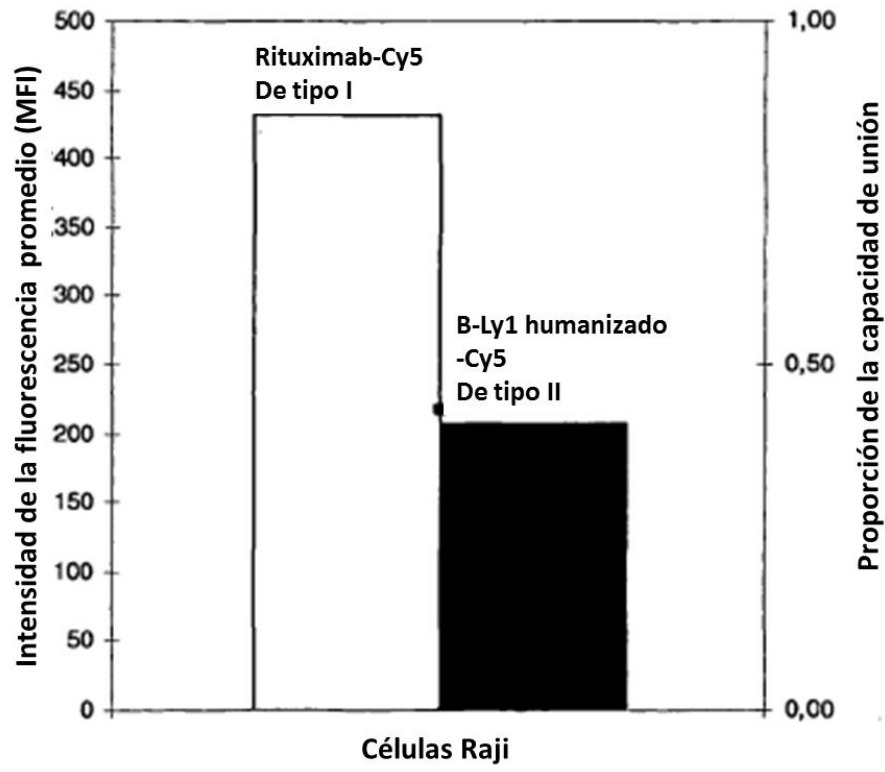


Fig. 3

