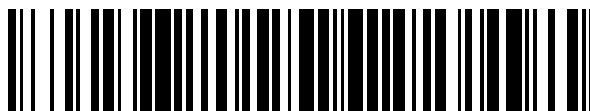


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 775**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2008** **E 08841724 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014** **EP 2205318**

54 Título: **Terapia de combinación de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con un inhibidor de proteasoma**

30 Prioridad:

24.10.2007 EP 07020820

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

29.01.2015

73 Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)
WAGISTRASSE 18
8952 SCHLIEREN-ZUERICH, CH**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 527 775 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 de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con un inhibidor de proteasoma

5 La presente invención se dirige al uso de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, especialmente de cánceres que expresan CD20 en combinación con un inhibidor del proteasoma.

10 Antecedentes de la invención

10 La molécula CD20 (también llamado antígeno de diferenciación restringido a linfocitos B humanos o Bp35) es una proteína transmembrana hidrofóbica con un peso molecular de aproximadamente 35 kD situada en linfocitos B maduros y pre-B (Valentine, 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 sangre periférica o de órganos linfoides y se expresa durante el desarrollo temprano de las células pre-B y permanece hasta la diferenciación en células plasmáticas. CD20 está presente tanto en células B normales así como en células B malignas. En particular, CD20 se expresa en más del 90% de los linfomas de células B no 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).

15 La región carboxilo-terminal de 85 aminoácidos de la proteína CD20 se encuentra en el citoplasma. La longitud de esta región contrasta con el de otras estructuras de superficie de células B específicas tales como las cadenas pesadas de IgM, IgD, y IgG o antígenos de histocompatibilidad de clase I1a o cadenas β , que tienen 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 carboxilo-terminal, 21 son residuos ácidos, mientras que sólo 2 son básicos, lo que indica que esta región tiene una fuerte carga negativa neta. El No. de acceso de GenBank es NP-690605. Se cree que CD20 podría estar implicado en la regulación de un paso temprano en el proceso de activación y diferenciación de células B (Tedder, T.F., et al., Eur. J. Immunol. 16 Tema 8 (1986) 881-887) y podría funcionar como un canal de iones de calcio (Tedder, T.F., et al., J. Cell. Biochem. 14D (1990) 195).

20 Existen dos tipos diferentes de anticuerpos anti-CD20 que difieren significativamente en su modo de unión a CD20 y las 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 por ejemplo, rituximab, son potentes en la citotoxicidad mediada por complemento, mientras que los anticuerpos de tipo II, como por ejemplo, Tositumomab (B1), anticuerpos 11B8, AT80 o B-Ly1 humanizados, inician de manera efectiva la muerte de la célula diana a través de la apoptosis independiente de caspasa con la exposición de fosfatidilserina concomitante.

25 Las características comunes de los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II se resumen en la Tabla 1.

40

Tabla 1:

Propiedades de 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 las balsas de lípidos
CDC aumentada (si isotipo IgG1)	CDC disminuida (si isotipo IgG1)
actividad CCDA (si isotipo IgG1)	actividad CCDA (si isotipo IgG1)
capacidad de unión completa	reducción de la capacidad de unión
agregación homotípica	fuerte agregación homotípica
inducción de apoptosis tras entrecruzamiento	fuerte inducción de muerte celular sin entrecruzamiento

45 El proteasoma 26S, también conocido como el complejo de proteinasa multicatalítico, es un complejo de peso molecular inusualmente alto (26S) que se encuentra tanto en el citoplasma y el núcleo de una amplia variedad de tipos de células eucariotas. El proteasoma se compone del núcleo catalítico central 20S y dos tapas reguladoras 19S. Las tapas reguladoras 19S se encuentran en cada extremo del complejo 20S y regulan la entrada de sustratos en el núcleo central de catalizador en forma de barril. Las tapas 19S juegan un papel en el reconocimiento de sustratos que han sido objeto de degradación por la adición de múltiples moléculas del polipéptido ubiquitina de 8,5 kDa (revisado por ejemplo, en Coux, O., Tanaka, K. y Goldberg, A., Ann. Rev. Biochem. 65 (1996) 801-847; Voges, D., Annu Rev Biochem. 68 (1999) 1015-1068 y Kisselev, A.L., et al., Chem Biol Vol. 8 (8) (2001) 739-758). Después de facilitar la eliminación de las moléculas de ubiquitina del sustrato, la tapa 19S promueve el despliegue de la proteína sustrato cuando entra en el núcleo catalítico central.

50 El proteasoma 26S está altamente conservado evolutivamente, después de haber sido encontrado en todas las células eucariotas estudiadas, y puede constituir hasta el 1,0% de la proteína total en homogeneizados de tejido. El proteasoma se ha encontrado tanto en el citoplasma y núcleo de las células, lo que sugiere un papel funcional en

55

ambos compartimentos (Tanaka, K., et al., J. Cell Physiol. 139 (1989) 34-41; Amsterdam, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 99-103.

Los primeros estudios sobre el proteasoma conducen a la delimitación de cinco actividades proteolíticas diferentes, cada una asociada con un componente distinto del complejo (Wilk, S., y Orlowski, M., J Neurochem 35 (1980) 1172-1182.; Wilk, S., y Orlowski, M., J Neurochem 40 (1983) 842-849; Orlowski, M., y Wilk, S., Biochem. Biophys. Res. Comm. 101 (1981) 814-822). Las tres actividades principales son similares en la especificidad de la quimotripsina, pepsina y peptidilglutamil peptidasa. Las otras dos actividades descritas exhiben una preferencia para la escisión de enlaces peptídicos en el lado carboxilo de los aminoácidos de cadena ramificada y hacia enlaces peptídicos entre los aminoácidos neutros de cadena corta (Orlowski, M., Biochemistry 29 (1990) 10289-297).

Ahora está bien establecido que el proteasoma es un gran sistema proteolítico extralisosomal involucrado en las vías proteolíticas esenciales para diversas funciones celulares como la división celular, el procesamiento de antígenos y la degradación de las proteínas reguladoras de vida corta, como oncoproteínas, factores de transcripción y ciclinas (Ciechanover, A., Cell 79 (1994) 13-21; Palombell, V.J., Rando, D.O., Goldberg, A.L. y Maniatis, T., Cell 78 (1994) 773-785). Dado que el proteasoma desempeña un papel clave en la degradación ordenada de las ciclinas durante la progresión del ciclo celular, desempeña un papel en la división celular. Estudios adicionales demostraron que la interrupción en cualquiera de 12 de los 13 genes que codifican subunidades del proteasoma de levadura da como resultado una detención en la proliferación celular o una incapacidad para degradar las proteínas, sugiriendo también un papel para el proteasoma en el crecimiento celular (Fujiwara, T., et al., J. Biol. Chem. 265 (1990) 16604-1613; Beynon, Int Committee on Proteolysis News Letter, Enero, 1-2 (1994)). Por lo tanto la inhibición del proteasoma puede ser útil en el tratamiento de enfermedades que resultan de la división celular aberrante como el cáncer.

La observación de que la proteólisis proteasomal mediada por ubiquitina juega un papel crítico en la activación de NFκB se podría aprovechar clínicamente por la utilización de inhibidores dirigidos hacia el proteasoma. La formación de la forma activa de NFκB requiere la proteólisis mediada por proteasoma de p 105, el precursor inactivo de NFκB.

Además, la forma procesada de NFκB (p65 / p50) se mantiene en el citosol como un complejo inactivo unido a la proteína inhibidora IκB. Diversos estímulos activan NFκB mediante el inicio de la vía de señalización que conduce a la degradación de IκB mediada por el proteasoma. La activación anormal de NFκB seguida por la estimulación de la síntesis de citoquinas ha sido observada en una variedad de enfermedades inflamatorias e infecciosas 2. La activación de NFκB es también esencial para la angiogénesis y para la expresión de moléculas de adhesión, y por lo tanto los inhibidores del proteasoma también pueden tener utilidad en el tratamiento de enfermedades asociadas con el sistema vascular.

Existen varios inhibidores del proteasoma como se describe por ejemplo en Kisselev, A. L., et al., Chem Biol Vol. 8 (8) (2001) 739-758, WO 2004/004749 y Joazeiro, C., et al., Cancer Res. 66 (16) (2006) 7840-7842, que todos tienen la misma propiedad de inhibir la actividad del proteasoma 26S. Dichos inhibidores del proteasoma incluyen, entre otras cosas, por ejemplo, derivados de péptidos tales como aldehídos de péptidos (por ejemplo, MG132, MG115, CEP-1615 o PSI), boronatos de péptidos (por ejemplo, el bortezomib (PS-341) o DFLB), epoxicetonas de péptidos (por ejemplo epoxomicina, dihidroeponemicina o derivado de epoxomicina PR-171), o vinilsulfonas de péptido (por ejemplo NLV) y derivados no peptídicos como salinosporamida A (NPI-0052), derivados de salinosporamida A, derivados de lactacistina o lactacistina (por ejemplo clasto-lactacistina-L-lactona (omuralide) o PS-519) (en Kisselev, A.L., et al., Chem Biol Vol. 8 (8) (2001) 739-758, WO 2004/004749 y Joazeiro, C., et al., Cancer Res. 66 (16) (2006) 7840-7842) .

Smolewski, P., et al., Leukemia Research 30 (2006) 1521-1529 describe efectos citotóxicos aditivos de bortezomib y rituximab in vitro, un anticuerpo anti-CD20 de tipo I. Wang, M., et al., Leukemia, 22 (2008) 179-185 describe los efectos de la triple combinación de bortezomib, rituximab y un ciclofosfamida in vitro y en un modelo de xenoinjerto de linfoma de células del manto.

de Vos, S. et al. Bortezomib plus rituximab in patients with indolent Non-Hodgkin's lymphoma (NHL): A phase 2. study. 47th Annual Meeting of the American-Society-of-Hematology, Blood (2005) 106 (11 parte 1):10A, describe un estudio de fase 2 de tratamiento de NHL con una combinación de rituximab y bortezomib.

de Vos, S. et al. Active combination therapy of bortezomib and rituximab in an in vitro and in vivo DLBCL model, Proc Amer Assoc Cancer Res (2004) 45: resumen N° 546 da a conocer la actividad in vitro e in vivo de una combinación de rituximab y bortezomib en un modelo de DLBCL.

Resumen de la invención

La invención comprende el uso de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer que expresa CD20 en combinación con un inhibidor del proteasoma tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención comprende además el uso de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que sufre de un cáncer que expresa CD20 en combinación con un inhibidor del proteasoma tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

5 Dicho inhibidor del proteasoma tiene una CI₅₀ de la actividad inhibidora anti-proteasoma de 5 μm o menos.

Un anticuerpo anti-CD20 de tipo II puede tener una relación de las capacidades de unión a CD20 en las células Raji (ATCC-No. CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II en comparación con rituximab de 0,3 a 0,6, más preferiblemente de 0,35-0,55, y aún más preferiblemente de 0,4 a 0,5.

10 Dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo B-Ly1 humanizado. Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II tiene aumentada la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).

15 Un inhibidor de proteasoma se puede seleccionar del grupo que consiste en aldehídos peptídicos, boronatos de péptidos, epoxicetonas de péptidos, o salinosporamida A.

Descripción detallada de la invención

20 El término "anticuerpo" abarca las diversas formas de anticuerpos incluyendo, pero no limitándose a anticuerpos completos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos de ingeniería genética como anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos o anticuerpos recombinantes, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que se conserven las propiedades características de acuerdo con la invención. Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza aquí, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición de aminoácidos. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una sola especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgén de la cadena humana ligera fusionado a una célula inmortalizada.

30 Un anticuerpo anti-CD20 de tipo II puede ser un anticuerpo monoclonal.

35 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir, región de unión, de una fuente o especie y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparado mediante técnicas de DNA recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana son especialmente preferidos. Tales anticuerpos quiméricos murinos / humanos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de DNA que codifican regiones variables de inmunoglobulina murina y segmentos de DNA que codifican regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de "anticuerpos quiméricos" abarcados por la presente descripción son aquellas en las que la clase o subclase se ha modificado o cambiado a partir de la del anticuerpo original. Tales anticuerpos "quiméricos" también se denominan "anticuerpos de cambio de clase". Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas de DNA recombinante y transfección génica convencionales bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5.202.238 y US 5.204.244.

45 El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que han sido modificados el marco o "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) para comprender el CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad en comparación con la de la inmunoglobulina parental. En un aspecto de la descripción, 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. CDR particularmente preferidos corresponden a aquellos que representan secuencias que reconocen los antígenos observados anteriormente para los anticuerpos quiméricos y bifuncionales.

55 El término "anticuerpo humano", como se usa aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Sobre la base de dicha tecnología, pueden producirse anticuerpos humanos contra una gran variedad de objetivos. Ejemplos de anticuerpos humanos se describen por ejemplo en Kellermann, S.A., et al., Curr Opin Biotechnol. 13 (2002) 593-597.

60 El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped tal como una célula NS0 o CHO o de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana en una forma

65

reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la descripción han sido sometidos a hipermutación somática in vivo. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

Tal como se usa en el presente documento, "se une específicamente" o "se une específicamente a" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD20. Preferiblemente, la afinidad de unión tiene un valor KD de 10^{-8} mol/l o inferior, preferiblemente 10^{-9} mol/l o inferior (por ejemplo 10^{-10} mol/l), más preferiblemente un valor KD de 10^{-10} mol/l o inferior (por ejemplo 10^{-12} mol/l). La afinidad de unión se determina con un ensayo de unión estándar, tal como el análisis gráfico de Scatchard (por ejemplo Biacore®) en células que expresan CD20.

El término "molécula de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, pretende incluir moléculas de DNA y moléculas de RNA. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es DNA de doble cadena.

Los "dominios constantes" no están implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero están involucrados en las funciones efectoras (CCDA, la unión del complemento y CDC).

La "región variable" (región variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) tal como se utiliza aquí denota cada una del par de cadenas ligeras y pesadas que está implicada directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas humanas tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias son ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones marco adoptan una conformación de láminas b y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de lámina b. Las CDR en cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por las regiones marco y forman junto con las CDR de la otra cadena el sitio de unión de antígeno. Las regiones CDR3 de anticuerpos de cadena pesada y ligera juegan un papel particularmente importante en la especificidad de unión / afinidad de los anticuerpos de acuerdo con la descripción.

Los términos "región hipervariable" o "porción de unión a antígeno de un anticuerpo" cuando se utiliza aquí se refieren a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Regiones "marco" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen aquí. Por lo tanto, las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden de N- a C-terminal los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Especialmente, CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión del antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan según 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 indistintamente en la presente descripción, e incluyen las variantes, isoformas y homólogos de especie de CD20 humano que se expresan de forma natural por las células o se expresan en las células transfectadas con el gen CD20. La unión de un anticuerpo de la invención con el antígeno CD20 media la muerte de las células que expresan CD20 (por ejemplo, una célula tumoral) mediante la inactivación de CD20. La muerte de las células que expresan CD20 se puede producir por uno o más de los siguientes mecanismos: inducción de la muerte de la célula / apoptosis, CCDA y / o CDC.

Sinónimos de CD20, como se reconoce en la técnica, incluyen antígeno CD20 de linfocitos B, antígeno de superficie B1, Leu-16, Bp35, BM5 y LF5 de linfocitos B. El término "anticuerpo anti-CD20" según la descripción 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, se pueden distinguir dos tipos de anticuerpos anti-CD20 (anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II) de acuerdo con Cragg, M.S., et al., Blood 103 (2004) 2738-2743; y Cragg, MS, et al., Blood 101 (2003) 1045-1052, véase la Tabla 2.

Tabla 2:

Propiedades de 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 las balsas de lípidos
CDC aumentada (si isotipo IgG1)	CDC disminuida (si isotipo IgG1)
actividad CCDA (si isotipo IgG1)	actividad CCDA (si isotipo IgG1)
capacidad de unión completa	reducción de la capacidad de unión
agregación homotípica	fuerte agregación homotípica
inducción de apoptosis tras entrecruzamiento	fuerte inducción de muerte celular sin entrecruzamiento

Una propiedad esencial del anticuerpo anti-CD20 de tipo I y tipo II es su modo de unión. Por lo tanto, el anticuerpo anti-CD20 de tipo I y tipo II se puede clasificar por la relación de las capacidades de unión a CD20 en células Raji (ATCC-No. CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 en comparación con rituximab.

5 Los anticuerpos anti-CD20 de tipo II tienen una relación de las capacidades de unión a CD20 en las células Raji (ATCC-No. CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 en comparación con rituximab de 0,3 a 0,6, preferiblemente desde 0,35 hasta 0,55, más preferiblemente de 0,4 a 0,5. Ejemplos de dichos anticuerpos anti-CD20 de tipo II incluyen, por ejemplo tositumomab (IgG2a B1), IgG1 de anticuerpo B-Ly1 humanizado (un anticuerpo quimérico
10 IgG1 humanizado como se describe en el documento WO 2005/044859), IgG1 11B8 (como se describe en el documento WO 2004/035607), e IgG1AT80. Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo B-Ly1 humanizado (tal como se describe en el documento WO 2005/044859).

15 Los anticuerpos anti-CD20 de tipo I en contraste con los anticuerpos de tipo II tienen una relación de las capacidades de unión a CD20 en las células Raji (ATCC-no. CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 en comparación con rituximab de 0,8 a 1,2, preferiblemente de 0,9 a 1,1. Ejemplos de tales anticuerpos anti-CD20 tipo I incluyen, por ejemplo rituximab, IgG2a 1F5 (ECACC, hibridoma; Press, O.W., et al., Blood 69/2 (1987) 584-591), IgG3 HI47 (ECACC, hibridoma), IgG1 2C6 (como se describe en el documento WO 2005/103081), IgG1 2F2 (como se describe y WO 2004/035607 y WO 2005/103081) e IgG1 2H7 (como se describe en el documento WO
20 2004/056312).

La "relación de las capacidades de unión a CD20 en las células Raji (ATCC-Nº CCL-86) de un anticuerpo anti-CD20 en comparación con rituximab" se determina mediante la medición de inmunofluorescencia directa (se mide la intensidad media de fluorescencia (MFI)) utilizando dicho anticuerpo anti-CD20 conjugado con Cy5 y rituximab conjugado con Cy5 en un FACSArray (Becton Dickinson) con células Raji (ATCC-Nº CCL-86), como se describe en el Ejemplo No. 2, y se calcula como sigue:
25

$$30 \quad \frac{\text{Relación de las capacidades de unión a CD20 en las células Raji (ATCC-Nº CCL-86)=}}{\text{MFI (anticuerpo anti-CD20-Cy5)}} \times \frac{\text{relación de marcado con Cy5 (rituximab-Cy5)}}{\text{relación de marcado con Cy5 (anticuerpo anti-CD20-Cy5)}}$$

La MFI es la intensidad media de fluorescencia. La "relación de marcaje Cy5" como se usa aquí significa el número de moléculas marcadas con Cy5 por molécula de anticuerpo.

35 Normalmente dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II tiene una relación de las capacidades de unión a CD20 en las células Raji (ATCC-nº CCL-86) de dicho segundo anticuerpo anti-CD20 en comparación con rituximab de 0,3 a 0,6, preferiblemente 0,35 a 0,55, más preferiblemente de 0,4 a 0,5.

40 Dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II, es un anticuerpo B-Ly1 humanizado, que tiene la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) aumentada.

Por "anticuerpo que tiene la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) aumentada" se entiende un anticuerpo, como se define ese término en el presente documento, que tiene una mayor CCDA como se determina por cualquier método adecuado conocido por los expertos en la técnica. Un ensayo in vitro de CCDA aceptado es como sigue:
45

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

50 2) el ensayo utiliza células humanas mononucleares de sangre periférica (CMSP), aisladas de sangre de un donante sano elegido al azar, como células efectoras;

3) el ensayo se lleva a cabo de acuerdo con la siguiente protocolo:

55 i) las CMSP se aíslan utilizando procedimientos de centrifugación de densidad estándar y se suspenden en 5 x 10⁶ células / ml en RPMI medio de cultivo celular;

60 ii) las células diana se cultivan mediante métodos de cultivo de tejidos estándar, cosechado de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad superior al 90%, se lavaron en RPMI medio de cultivo celular, marcado con 100 micro-curies de 51Cr, se lavó dos veces con medio de cultivo celular, y se resuspendieron en medio de cultivo celular a una densidad de 10⁵ células / ml;

65 iii) 100 microlitros de la suspensión de células diana final mencionado arriba se transfieren a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos;

- iv) el anticuerpo se diluye en serie desde 4000 ng / ml a 0,04 ng / ml en medio de cultivo celular y 50 microlitros de las soluciones de anticuerpo resultantes se añaden a las células diana en la placa de microtitulación de 96 pocillos, se analiza en varias concentraciones de anticuerpos por triplicado que cubre todo el intervalo de concentración anterior;
- 5 v) para los controles de liberación máxima (MR), 3 pozos adicionales en la placa que contienen las células diana marcadas reciben 50 microlitros de una solución acuosa de detergente no iónico al 2% (VN) (Nonidet, Sigma, St. Louis), en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);
- 10 vi) para los controles de liberación espontánea (SR), 3 pozos adicionales en la placa que contienen las células diana marcadas reciben 50 microlitros de medio de cultivo celular RPMI en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);
- 15 vii) la placa de microtitulación de 96 pocillos se centrifuga a 50 x g durante 1 minuto y se incuba durante 1 hora a 4 °C;
- viii) 50 microlitros de la suspensión de CMSP (punto I anterior) se añaden a cada pocillo para dar una relación de célula efectora: diana de 25:1 y las placas se colocan en una incubadora bajo atmósfera de CO₂ al 5% a 37 °C durante 4 horas;
- 20 ix) el sobrenadante libre de células de cada pocillo se recoge y la radioactividad liberada experimentalmente (ER) se cuantifica utilizando un contador gamma;
- x) el porcentaje de lisis específica se calcula para cada concentración de anticuerpo de acuerdo con la fórmula $(ER - MR) / (MR - SR) \times 100$, en donde ER es la radioactividad media cuantificada (véase el punto ix anterior) para esa concentración de anticuerpo, MR es la radioactividad media cuantificada (véase el punto ix arriba) para los controles de RM (véase el punto V anterior), y SR es la radioactividad media cuantificada (véase el punto ix arriba) para los controles de SR (véase el punto VI anterior);
- 25 4) "CCDA aumentada" se define como un aumento en el porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo analizado anteriormente, y / o una reducción en la concentración de anticuerpo requerida para alcanzar la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observado dentro del intervalo de concentración de anticuerpo analizado anteriormente. El aumento de la CCDA es relativo a la CCDA, medida con el ensayo anterior, mediada por el mismo anticuerpo, producida por el mismo tipo de células huésped, utilizando los mismos métodos de producción, purificación, formulación y almacenamiento estándar, que son conocidos para los expertos en la técnica, pero que no ha sido producido por células huésped manipuladas para sobreexpresar GnTIII.
- 30 Dicha "CCDA aumentada" se puede conseguir por glicosmodificación de dichos anticuerpos, lo que significa mejorar dichas funciones efectoras naturales mediadas por células de anticuerpos monoclonales mediante la modificación de su componente oligosacárido tal como se describe en Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 y US 6.602.684.
- 35 El término "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" se refiere a la lisis de las células diana tumorales humanas por el anticuerpo de acuerdo con la invención 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 de acuerdo con la invención en presencia del complemento. La CDC se produce si el anticuerpo induce a una concentración de 100 nM la lisis (muerte celular) de 20% o más de las células tumorales después de 4 horas. El ensayo se realiza preferentemente con células tumorales marcadas con ⁵¹Cr o Eu y la medición de ⁵¹Cr o Eu liberado. Los controles incluyen la incubación de las células diana tumorales con complemento pero sin el anticuerpo.
- 40 Por lo general anticuerpos anti-CD20 de tipo II del isotipo IgG1 muestran propiedades CDC características. Los anticuerpos anti-CD20 de tipo II tienen una CDC disminuida (si el isotipo es IgG1) en comparación con los anticuerpos de tipo I del isotipo IgG1. Preferiblemente los anticuerpos anti-CD20 de tipo II son anticuerpos de isotipo IgG1.
- 45 El anticuerpo "rituximab" (anticuerpo de referencia; ejemplo de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I) es un dominio constante murino 1 gamma humano quimérico diseñado genéticamente que contiene un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD20 humano. Este anticuerpo quimérico contiene dominios constantes 1 gamma humanos y se identifica por el nombre de "C2B8" en el documento US 5.736.137 (Andersen, KC, et. Al.) Emitida de abril 17,1998, asignado a IDEC Pharmaceuticals Corporation. Rituximab está aprobado para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin de células B CD20 positivo con bajo grado de recaída o refractante o folicular. En el mecanismo de acción de los estudios in vitro se ha demostrado que rituximab exhibe citotoxicidad dependiente de complemento humana (CDC) (Reff, M.E., et. al., Blood 83 (2) (1994) 435-445). Además, exhibe una actividad significativa en ensayos que miden la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).
- 50 55 60 65

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

Un "anticuerpo B-Ly1 humanizado" puede tener la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada del grupo de Id. de Sec. N° 3 a Id. de Sec. N° 20 (B-HH2 a B-HH9 y B-HL8 a B-HL17 de WO 2005/044859 y WO 2007/031875). Especialmente preferidos son Id. de Sec. N° 3, 4, 7, 9, 11, 13 e Id. de Sec. N° 15 (B-HH2, BHH-3, B-HH6, B-HH8, B-HL8, B-HL11 y B-HL13 de WO 2005/044859 y el documento WO 2007/031875).

El "anticuerpo B-Ly1 humanizado" tiene la región variable de la cadena ligera (VL) de la Id. de Sec. N° 20 (B-KV1 del documento WO 2005/044859 y WO 2007/031875). Además, el anticuerpo B-Ly1 humanizado es preferiblemente un anticuerpo IgG1.

Los anticuerpos B-Ly1 humanizados están glicosilados (GM) en la región Fc de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 y WO 99/154342. Tales anticuerpos humanizados glicosilados B-Ly1 tienen un patrón alterado de glucosilación en la región Fc, que tiene preferiblemente un nivel reducido de residuos de fucosa. Preferiblemente, al menos el 40% o más según la invención entre 40% y 60%, en otra realización al menos 50%, y en aún otra realización, al menos el 70% o más) de los oligosacáridos de la región Fc no están fucosilados. Además, los oligosacáridos de la región Fc son preferentemente biantenarios.

El componente oligosacárido puede afectar significativamente las propiedades relevantes para la eficacia de una glicoproteína terapéutica, incluyendo estabilidad física, resistencia al ataque de proteasas, interacciones con el sistema inmunológico, la farmacocinética y la actividad biológica específica. Tales propiedades pueden depender no sólo de la presencia o ausencia, sino también de las estructuras específicas, de oligosacáridos. Se pueden hacer algunas generalizaciones entre la estructura de oligosacáridos y la función de la glicoproteína. Por ejemplo, ciertas estructuras de oligosacáridos median la rápida eliminación de la glicoproteína desde el torrente sanguíneo a través de interacciones con proteínas de unión a carbohidratos específicos, mientras que otros pueden unirse a anticuerpos y desencadenar reacciones inmunes no deseadas. (Jenkins, N., et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-81).

Las células de mamífero son los huéspedes preferidos para la producción de glicoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad para glicosilar proteínas en la forma más compatible para la 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 glicosilan proteínas, y como otros tipos de huéspedes comunes, tales como levaduras, hongos filamentosos, células de insectos y plantas, proporcionan patrones de glicosilación asociados con la rápida eliminación del torrente sanguíneo, interacciones inmunes no deseadas y, en algunos casos específicos, la reducción de la actividad biológica. Entre las células de mamíferos, se han utilizado con mayor frecuencia las células de ovario de hámster chino (CHO) durante las dos últimas décadas. Además de dar modelos de glicosilación adecuados, estas células permiten la generación consistente de líneas celulares clonales genéticamente estables, altamente productivas. Pueden ser cultivadas a altas densidades en biorreactores simples usando medios libres de suero, y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales de uso común incluyen las células de riñón de cría hámster (BHK), y células de mieloma de ratón NSO y SP2/0. Más recientemente, también se ha probado la producción de animales transgénicos. (Jenkins, N., et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-981).

Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidrato en posiciones conservadas en las regiones constantes de cadena pesada, con cada isotipo que posee una matriz distinta de las estructuras de carbohidratos N-ligadas, que afectan variablemente al ensamblaje de proteínas, la secreción o actividad funcional. (Wright, A. y Morrison, S.L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). La estructura de los hidratos de carbono ligados a N varía considerablemente, dependiendo del grado de procesamiento, y puede incluir oligosacáridos altamente ramificados de alta manosa, así como oligosacáridos biantenarios complejos. (Wright, A. y Morrison, S.L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). Normalmente, existe un procesamiento heterogéneo de las estructuras centrales del oligosacáridos unidas a un sitio de glicosilación particular, de tal manera que incluso existen anticuerpos monoclonales como múltiples glicofomas. Asimismo, se ha demostrado que las principales diferencias en la glicosilación de anticuerpos se producen entre las líneas celulares, e incluso las diferencias menores se ven en una línea celular dada que crece bajo diferentes condiciones de cultivo. (Lifely, M.R., et al., *Glycobiology* 5 (8) (1995) 813-22).

Una manera de obtener grandes incrementos de potencia, manteniendo al mismo tiempo un proceso de producción simple y evitando potencialmente efectos secundarios no deseables significativos, es mejorar las funciones efectoras naturales mediadas por células de anticuerpos monoclonales mediante la modificación de su componente oligosacárido tal como se describe en Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 y US 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos más comúnmente utilizados en la inmunoterapia del cáncer, son glicoproteínas que tienen un sitio de glicosilación ligada a N conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos

oligosacáridos biantenarios complejos unidos a Asn297 se encuentran enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico, y su presencia es esencial para el anticuerpo para mediar funciones efectoras tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) (Lifely, M.R., et al., *Glycobiology* 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., et al, *Immunol Rev.* 163 (1998) 59-76; Wright, A. y Morrison, S.L., *Trends Biotechnol* 15 (1997) 26 -32).

Se ha demostrado anteriormente que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO), las de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I11 ("GnTII17y), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados, aumenta significativamente la actividad CCDA in vitro de un anticuerpo monoclonal quimérico antineuroblastoma (chCE7) producido por las células CHO modificadas (véase Umana, P., et al, *Nature Biotechnol* 17 (1999) 176-180;.. y WO 99/154342).

El anticuerpo chCE7 pertenece a una gran clase de anticuerpos monoclonales no conjugados que tienen una alta afinidad y especificidad por tumores, pero tienen muy poca potencia para ser clínicamente útiles cuando se producen en las líneas celulares industriales estándares que carecen del enzima GnTIII (Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180). Ese estudio fue el primero en demostrar que los grandes aumentos de actividad CCDA podrían obtenerse mediante la modificación de las células que producen los anticuerpos para expresar GnTIII, que también conduce a un aumento en la proporción de oligosacáridos bisectados asociados a la región constante (Fc), incluyendo oligosacáridos no fucosilados bisectados, por encima de los niveles encontrados en los anticuerpos de origen natural.

El término "proteasoma" se refiere a la proteasoma 26S, como se describe por ejemplo, en Coux, O., Tanaka, K. y Goldberg, A., *Ann. Rev. Biochem.* 65 (1996) 801-847; Voges, D., *Annu Rev Biochem.* 68 (1999) 1015-1068 o Kisselev, A.L., et al., *Chem Biol Vol.* 8 (8) (2001) 739-758.

El término "inhibidor del proteasoma" como se usa aquí se refiere a agentes que inhiben la actividad del proteasoma 26S. Tales inhibidores del proteasoma incluyen, entre otras cosas, por ejemplo, derivados de péptidos tales como aldehídos de péptidos (por ejemplo, MG132, MG115, CEP-1615, PSI, o inhibidor específico de inmunoproteasoma IPSI-001 (Cbz-LnL-CHO = N-carbobenciloxi-leucil-norleucinal, véase 2006/0241056), boronatos de péptidos (por ejemplo, bortezomib (PS-341) o DFLB), epoxicetonas de péptidos (por ejemplo epoxomicina, dihidroeponemicina o derivado de epoxomicina carfilzomib (PR-171)), o vinil sulfonas de péptidos (por ejemplo NLV) y derivados no peptídicos como salinosporamida A (NPI-0052), derivados de salinosporamida A, lactacistina o derivados de lactacistina (por ejemplo clasto-lactacistina-L-lactona (omuralide) o PS-519). Los diferentes tipos y estructuras de dichos inhibidores del proteasoma se describen por ejemplo, en Kisselev, A.L., et al., *Chem Biol Vol.* 8 (8) (2001) 739-758, WO 2004/004749 y Joazeiro, C., et al., *Cancer Res.* 66 (16) (2006) 7840-7842, Kanagasabaphy, P., et al., *Curr Opin Investig Drugs* 8 (2007) 447-51, Adams, J., *Nat Rev Cancer* 4 (2004) 349-360 y US 2006/0241056.

Dicho inhibidor del proteasoma puede seleccionarse a partir de aldehídos de péptidos ((IPSI-001), preferiblemente N-carbobenciloxi-leucil-norleucinal) boronatos de péptidos, preferiblemente (bortezomib (PS-341)), epoxicetonas de péptidos (preferiblemente derivado epoxomicina carfilzomib (PR- 171)), o salinosporamida A (NPI-0052). Más preferiblemente, tales inhibidores del proteasoma se seleccionan de carfilzomib (PR-171), salinosporamida A (NPI-0052) o N-carbobenciloxi-leucil-norleucinal (IPSI-001). Según la invención, el inhibidor de proteasoma es bortezomib (PS-341). En un aspecto preferido de la descripción el inhibidor de proteasoma es un derivado de péptido seleccionado a partir de aldehídos de péptidos (preferiblemente N-carbobenciloxi-leucil-norleucinal (IPSI 001)), boronatos de péptidos según la invención bortezomib (PS-341)) o epoxicetonas de péptidos. En otro aspecto de la descripción el inhibidor de proteasoma es un boronato de péptido de acuerdo con la invención bortezomib (PS-341); véase, por ejemplo, Adams, J., *Cur. Opin. Chem Biol.* 6 (2002) 493-500 y US 5.780.454).

Preferiblemente, el inhibidor del proteasoma tiene una CI50 de la actividad inhibidora anti-proteasoma de 5 μ m o inferior, más preferiblemente de 1 μ m o menos. Un ensayo basado en células para la identificación de dichos inhibidores del proteasoma y para la determinación de la CI50 de la actividad inhibidora anti-proteasoma (a través de diluciones seriadas y cálculos usando un ajuste de curva no lineal (programa XLfit (ID Business Solution Ltd., Guilford, Surrey, Reino Unido)) se describe en Moravec, R., et al., *Cell Notes* 15 (2006) 4-7 usando reactivo de ensayo basado en células Proteasome-Glo™ de Promega con células de mieloma U266 (plasma humano). Este ensayo "añadir-mezclar-medir" mide la actividad de la proteasa de tipo quimotripsina asociada con el proteasoma en células cultivadas.

Además de IPSI-001 (Cbz-LnL-CHO = N-carbobenciloxi-leucil-norleucinal) también se prefieren los siguientes derivados de péptidos de US 2006/0241056 como inhibidores del proteasoma: N-carbobenciloxi-homofenilalanil-fenilalanilal, N-carbobenciloxi-leucil-fenilalanilal, N-carbobenciloxi-alanil-fenilalanilal, N-carbobenciloxi-glicil-prolil-alanilfenilalanilal, N-carbobenciloxi-glicilprolil-fenilalanil-fenilalanilal, N-carbobenciloxi-glicil-fenilalanil-fenilalanilal, N-carbobenciloxi-leucil-norleucina ácido borónico, N-carbobenciloxi-fenilalanil-fenilalanina ácido borónico, N-carbobenciloxi-homofenilalanil-fenilalanina ácido borónico, N-carbobenciloxi-leucil-fenilalanina ácido borónico, N-carbobenciloxi-glicil-alanil-prolil-fenilalanina ácido borónico, N-carbobenciloxi-glicil-prolil-fenilalanil-fenilalanina ácido borónico, N-carbobenciloxi-leucil-leucil-fenilalanina ácido borónico, N-carbobenciloxi-glicil-fenilalanil-fenilalanina ácido borónico, N-carbobenciloxi-leucil-norleucina metil vinil sulfona, N-carbobenciloxi- fenilalanil- fenilalanina metil

vinil sulfona, N-carbobenciloxi-homofenilalanil-fenilalanina metil vinil sulfona, N-carbobenciloxi-leucil-fenilalanina metil vinil sulfona, N-carbobenciloxi-alanil-fenilalanina metil vinil sulfona, N-carbobenciloxi-glicil-prolil-alanil-fenilalanina metil vinil sulfona, N-carbobenciloxi-glicil-prolil-fenilalanil-fenilalanina metil vinil sulfona, N-carbobenciloxi-leucil-leucil-fenilalanina metil vinil sulfona, N-carbobenciloxi-glicil-fenilalanil-fenilalanina metil vinil sulfona, N-carbobenciloxi-leucil-norleucina epoxi cetona, N-carbobenciloxi-fenilalanil-fenilalanina epoxi cetona, N-carbobenciloxi-homofenilalanil-fenilalanina epoxi cetona, N-carbobenciloxi-leucil-fenilalanina epoxi cetona, N-carbobenciloxi-alanil-fenilalanina epoxi cetona, N-carbobenciloxi-glicil-prolil-alanil-fenilalanina epoxi cetona, N-carbobenciloxi-glicil-prolil-fenilalanil-fenilalanina epoxi cetona, N-carbobenciloxi-leucil-leucil-fenilalanina epoxi cetona, y N-carbobenciloxi-glicil-fenilalanil-fenilalanina epoxi cetona.

El término "expresión del antígeno CD20" pretende indicar un nivel significativo de la expresión del antígeno CD20 en una célula, preferiblemente en la superficie celular de una célula T o B, más preferiblemente una célula B, de un tumor o cáncer, respectivamente, preferiblemente un tumor no sólido. Los pacientes que tienen un "cáncer que expresa CD20" se pueden determinar mediante ensayos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo la expresión del antígeno CD20 se mide utilizando detección inmunohistoquímica (IHC), FACS o a través de la detección basada en PCR de los RNAm correspondientes.

El término "cáncer que expresa CD20" tal como se utiliza aquí, se refiere a todos los cánceres en los que las células cancerosas muestren una expresión del antígeno CD20. Dicho cáncer que expresa CD20 puede ser, por ejemplo, linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL), cáncer de pulmón de células bronquioloalveolares, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma intraocular o cutáneo, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, Schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma de la pituitaria, incluyendo versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriores, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

Preferiblemente un cáncer que expresa CD20 tal como se utiliza aquí se refiere a los linfomas (preferiblemente linfoma no-Hodgkin de células B (NHL)) y leucemias linfocíticas. Tales linfomas y leucemias linfocíticas incluyen por ejemplo, a) linfomas foliculares, b) linfomas de células no pequeñas escindidas / linfoma de Burkitt (incluyendo linfoma endémico de Burkitt, linfoma esporádico de Burkitt y linfoma no Burkitt) c) linfomas de la zona marginal (incluyendo linfoma de células B de zona extranodal marginal (linfomas de tejido linfático asociado a la mucosa MALT), linfoma de células B de zona marginal nodal y linfoma esplénico de la zona marginal), d) linfoma de células del manto (LCM), e) linfoma de células grandes (incluyendo linfoma de células grandes difusas de células B (LDCG), linfoma de células mixtas difusas, linfoma inmunoblástico, linfoma de células B mediastínico primario, linfoma angiocéntrico - linfoma de células B pulmonar) f) leucemia de células peludas, g) linfoma linfocítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, h) leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC) / linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia prolinfocítica de células B, i) neoplasias de células plasmáticas, mieloma de células plasmáticas, mieloma múltiple, plasmocitoma j) enfermedad de Hodgkin.

Más preferiblemente, el cáncer que expresa CD20 es un linfoma no-Hodgkin de células B (NHL). Especialmente el cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células del manto (LCM), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma de células grandes difusas de células B (LDCG), linfoma de Burkitt, leucemia de células pilosas, linfoma folicular, mieloma múltiple, linfoma de la zona marginal, trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), linfoma asociado al VIH, macroglobulinemia de Waldenstrom, o linfoma primario del SNC.

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 está diseñado para reducir o eliminar el número de células cancerosas en un paciente, o para aliviar los síntomas de un cáncer. "Un método de tratamiento de" cáncer u otro trastorno proliferativo no significa necesariamente que las células de cáncer u otros trastornos sean, de hecho, eliminadas, que el número de células o trastorno, de hecho, se reduzcan, o que los síntomas de un cáncer u otro trastorno sean, de hecho, aliviados. A menudo, un método de tratamiento del cáncer se realizará incluso con una baja probabilidad de éxito, pero que, dado el historial médico y la esperanza de supervivencia estimada de un paciente, se considera sin embargo para inducir un curso beneficioso global de la acción.

Los términos "coadministración" o "coadministrar" se refieren a la administración de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II y dicho inhibidor del proteasoma como una formulación única o como dos formulaciones separadas. La coadministración puede ser simultánea o secuencial en cualquier orden, donde preferiblemente hay un periodo de tiempo, mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II y dicho inhibidor del proteasoma se coadministran bien simultáneamente o

secuencialmente (por ejemplo, a través de una vía intravenosa (iv) a través de una infusión continua (una para el anticuerpo y, finalmente, una para el inhibidor del proteasoma, o el inhibidor de proteasoma es administrado por vía oral). Cuando los dos agentes terapéuticos se coadministran secuencialmente la dosis se administra ya sea en el mismo día en dos administraciones separadas, o uno de los agentes se administra en el día 1 y el segundo es coadministrado entre el día 2 hasta el día 7, preferiblemente entre el día 2 y el 4. Así, el término "secuencial" significa dentro de los 7 días después de la dosis del primer anticuerpo, preferiblemente dentro de los 4 días después de la dosis del primer anticuerpo; y el término "simultáneamente" significa al mismo tiempo. Los términos "coadministración" con respecto a las dosis de mantenimiento de anticuerpo anti-CD20 de tipo II y el inhibidor de proteasoma significa que las dosis de mantenimiento pueden coadministrarse simultáneamente, si el ciclo de tratamiento es apropiado para ambos fármacos, por ejemplo, cada semana. O el inhibidor del proteasoma se administra por ejemplo, entre el primer y tercer día y el anticuerpo anti-CD20 de tipo II se administra cada semana. O las dosis de mantenimiento se coadministran secuencialmente, ya sea dentro del mismo día o en varios días.

Es evidente que los anticuerpos se administran al paciente en una "cantidad terapéuticamente eficaz" (o simplemente "cantidad eficaz") que es la cantidad del compuesto correspondiente o combinación que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que está siendo buscada por el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro médico.

La cantidad de coadministración de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II y dicho inhibidor del proteasoma y el momento de la coadministración dependerá del tipo (especie, sexo, edad, peso, etc.) y la condición del paciente siendo tratado y la gravedad de la enfermedad o condición que se está tratando. Dicho anticuerpo anti-CD20 tipo II y dicho inhibidor del proteasoma se coadministran adecuadamente al paciente en una sola vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg / kg a 50 mg / kg (por ejemplo, 0,1-20 mg / kg) de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II y entre 1 µg / kg a 50 mg / kg (por ejemplo 0,1 -20 mg / kg) de dicho inhibidor del proteasoma es una dosis candidata inicial para la administración conjunta de ambos fármacos para el paciente. Si la administración es intravenosa el tiempo de infusión inicial de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II o dicho inhibidor del proteasoma puede ser más largo que los tiempos de infusión posteriores, por ejemplo, aproximadamente 90 minutos para la infusión inicial, y aproximadamente 30 minutos para las perfusiones posteriores (si la infusión inicial es bien tolerada).

La dosis preferida de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg / kg a aproximadamente 30 mg / kg. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 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. La dosis preferida de dicho inhibidor del proteasoma estará en el intervalo de 0,01 mg / kg a aproximadamente 30 mg / kg, por ejemplo, 0,1 mg / kg a 10,0 mg / kg para bortezomib. Dependiendo del tipo (especie, sexo, edad, peso, etc.) y el estado del paciente y del tipo de anticuerpo anti-CD20 e inhibidor de proteasoma, la dosis y la pauta de administración de dicho anticuerpo anti-CD20 puede diferir de la dosis de inhibidor del proteasoma. Por ejemplo dicho anticuerpo anti-CD20 puede administrarse por ejemplo, cada una a tres semanas y dicho inhibidor del proteasoma puede administrarse diariamente o cada 2 a 10 días. Una dosis de carga inicial más elevada, seguida de una o más dosis más bajas también se puede administrar.

En una realización preferida, el medicamento es útil para prevenir o reducir la metástasis o mayor diseminación en dicho paciente que padece cáncer que expresa CD20. El medicamento es útil para aumentar la duración de la supervivencia de dicho paciente, el aumento de la supervivencia libre de progresión de dicho paciente, el aumento de la duración de la respuesta, lo que resulta en una mejora estadísticamente significativa y clínicamente significativa del paciente tratado tal como se mide por la duración de la supervivencia, la supervivencia libre de progresión, la tasa de respuesta o duración de la respuesta. En una realización preferida, el medicamento es útil para aumentar la tasa de respuesta en un grupo de pacientes.

En el contexto de esta invención, otros agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o agentes anticancerígenos adicionales, o compuestos que mejoran los efectos de tales agentes (por ejemplo, citoquinas) se pueden usar en el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-CD20 de tipo II e inhibidor del proteasoma en un cáncer que expresa CD20. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. Preferiblemente, el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-CD20 de tipo II e inhibidor del proteasoma se utiliza sin tales agentes citotóxicos adicionales, agentes quimioterapéuticos o anticancerígenos, o compuestos que mejoran los efectos de tales agentes.

Tales agentes incluyen, por ejemplo: agentes alquilantes o agentes con una acción alquilante, como la ciclofosfamida (CTX; por ejemplo Cytoxan®), clorambucilo (CHL; por ejemplo, Leukeran®), cisplatino (CisP, por ejemplo Platinol®) busulfán (por ejemplo, Myleran®), melfalán, carmustina (BCNU), estreptozotocina, trietilenmelamina (TEM), mitomicina C, y similares; antimetabolitos, tales como metotrexato (MTX), etopósido (VP16; por ejemplo, VePesid®), 6-mercaptopurina (6 MP), 6-tioguanine (6TG), citarabina (Ara-C), 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina (por ejemplo Xeloda®), dacarbazina (DTIC), y similares; antibióticos, tales como actinomicina D, doxorubicina (DXR; por ejemplo, Adriamycin®), daunorubicina (daunomicina), bleomicina, mitramicina y similares; alcaloides, tales como vinca alcaloides tales como vincristina (VCR), vinblastina, y similares; y otros agentes antitumorales, tales como paclitaxel (por ejemplo, Taxol®) y derivados de paclitaxel, agentes citostáticos,

glucocorticoides tales como dexametasona (DEX; por ejemplo Decadron®) y corticosteroides tales como la prednisona, inhibidores de la enzima de nucleósidos tales como la hidroxiaurea, enzimas que escinden aminoácidos tales como asparaginasa, leucovorina y otros derivados de ácido fólico, y diversos agentes antitumorales similares. Los siguientes agentes también pueden utilizarse como agentes adicionales: arnifostina (por ejemplo, Ethyl®), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptoizocina, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), doxorubicina lipo (por ejemplo Doxil®), gemcitabina (por ejemplo Gemzar®), lipo daunorubicina (por ejemplo DaunoXome®), procarbazona, mitomicina, docetaxel (por ejemplo Taxotere®), aldesleucina, carboplatino, oxaliplatino, cladribina, camptotecina, CPT 11 (irinotecan), 10-hidroxi 7-etil-camptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, ifosfamida, idarubicina, mesna, interferón beta, interferón alfa, mitoxantrona, topotecan, leuprolide, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo. Preferiblemente, el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-CD20 de tipo II e inhibidor del proteasoma se utiliza sin tales agentes adicionales.

El uso de los agentes citotóxicos y anticancerosos descritos anteriormente, así como los medicamentos contra el cáncer antiproliferativos específicos de diana, como los inhibidores de la proteína quinasa en los regímenes quimioterapéuticos está generalmente bien caracterizado en el área de la terapia del cáncer, y a su uso en el presente documento se aplican las mismas consideraciones de vigilancia de la tolerancia y eficacia, y de control de las vías de administración y dosis, con algunos ajustes. Por ejemplo, la dosificación real de los agentes citotóxicos puede variar dependiendo de la respuesta de células cultivadas de un paciente determinado mediante el uso de métodos de histocultivo. Generalmente, la dosificación se reducirá en comparación con la cantidad utilizada en ausencia de otros agentes adicionales.

Las dosis típicas de un agente citotóxico efectivo pueden estar en los rangos recomendados por el fabricante, y cuando venga indicado por las respuestas *in vitro* o respuestas en modelos animales, se pueden reducir hasta en aproximadamente un orden de magnitud de concentración o cantidad. Por lo tanto, la dosis real dependerá de la opinión del médico, de la condición del paciente y la eficacia del método terapéutico en base a la capacidad de respuesta *in vitro* en muestras de células malignas primarias cultivadas o en histocultivos de tejidos, o las respuestas observadas en el modelos animales apropiados.

En el contexto de esta invención, una cantidad efectiva de radiación ionizante puede llevarse a cabo y/o se puede utilizar un radiofármaco adicionalmente al tratamiento de combinación del anticuerpo anti-CD20 de tipo II y el inhibidor del proteasoma en un tumor que expresa CD20. La fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente que se está tratado. Cuando la fuente es externa al paciente, la terapia se conoce como terapia de radiación de haz externo (TRHE). Cuando la fuente de radiación es interna al paciente, el tratamiento se denomina braquiterapia (BT). Los átomos radiactivos que se usan en el contexto de esta invención se pueden seleccionar del 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 radiactivos. Preferiblemente, el tratamiento de combinación del anticuerpo anti-CD20 de tipo II y el inhibidor del proteasoma se utiliza sin dicha radiación ionizante.

La radioterapia es un tratamiento estándar para el control de los tumores no resecables o inoperables y/o para las metástasis tumorales. Se han obtenido resultados mejorados cuando la radioterapia se combina con quimioterapia. La radioterapia se basa en el principio de que las altas dosis de radiación suministradas en la zona objetivo dará lugar a la muerte de las células en reproducción tanto de los tejidos normales como tumorales. El régimen de dosis de radiación se define generalmente 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 diversas consideraciones, pero los dos más importantes son la localización del tumor en relación con otras estructuras críticas u órganos del cuerpo, y el grado en que se ha propagado el tumor. Un curso típico de tratamiento para un paciente sometido a terapia de radiación será un programa de tratamiento durante un período de 1 a 6 semanas, con una dosis total de entre 10 y 80 Gy administrados al paciente en una sola fracción diaria de aproximadamente 1,8 a 2,0 Gy, 5 días a la semana. En una realización preferida de esta invención existe una sinergia cuando los tumores en pacientes humanos se tratan con el tratamiento de combinación de la invención y radiación. En otras palabras, la inhibición del crecimiento tumoral por medio de los agentes que comprenden la combinación de la invención mejora cuando se combinan con radiación, y opcionalmente con agentes quimioterapéuticos o anticancerígenos adicionales. Los parámetros de las terapias de radiación adyuvante son, por ejemplo, los contenidos en el documento WO 99/60023.

Los anticuerpos anti-CD20 de tipo II se administran a un paciente de acuerdo con los métodos conocidos, por administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial o intratecal. Es preferible la administración intravenosa o subcutánea de los anticuerpos.

Los inhibidores del proteasoma se administran a un paciente de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo, mediante administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por

vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal o rutas perorales. Es preferible la administración intravenosa, subcutánea u oral de los inhibidores del proteasoma.

5 La descripción se refiere además a un equipo que comprende un anticuerpo anti-CD20 de tipo II y un inhibidor del proteasoma para el tratamiento de combinación de un paciente que sufre un cáncer que expresa CD20. En un aspecto particular de la invención, los contenedores del equipo pueden incluir además un vehículo aceptable a nivel farmacéutico. El equipo puede incluir además un diluyente estéril, que se almacena preferiblemente en un recipiente adicional separado. El equipo puede incluir además un prospecto que comprende las instrucciones impresas que proporcionan una guía del uso del tratamiento combinado como un método para tratar una enfermedad cancerosa que expresa CD20, preferiblemente un linfoma no Hodgkin (NHL) de células B.

10 El término "prospecto" se refiere a las instrucciones incluidas habitualmente en los paquetes comerciales de los productos terapéuticos, que puede incluir información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y/ o advertencias sobre el uso de tales productos terapéuticos.

15 En un aspecto particular de la invención, los contenedores del artículo manufacturado pueden incluir además un vehículo aceptable a nivel farmacéutico. El artículo manufacturado puede incluir además un diluyente estéril, que se almacena preferiblemente en un recipiente adicional separado.

20 Como se utiliza en este documento, un "vehículo aceptable a nivel farmacéutico" pretende incluir cualquiera de todos los materiales compatibles con la administración farmacéutica, lo que incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, isotónicos y agentes que retrasan la absorción, y otros materiales y compuestos compatibles con la administración farmacéutica. Excepto en el caso de que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones de la invención. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios a las composiciones.

Composiciones farmacéuticas:

30 Las composiciones farmacéuticas se pueden obtener procesando el anticuerpo anti-CD20 de tipo II y/ o el inhibidor del proteasoma de acuerdo con esta invención con vehículos aceptables a nivel farmacéutico, inorgánicos u orgánicos. Pueden utilizarse por ejemplo lactosa, almidón de maíz o derivados de los mismos, talco, ácido esteárico o sus sales y similares, como vehículos para los comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas y cápsulas de gelatina dura. Los vehículos adecuados para las cápsulas de gelatina blanda son, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semi-sólidos y líquidos, y similares. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de la sustancia activa, por lo general no son necesarios vehículos en el caso de cápsulas de gelatina blanda. Los vehículos adecuados para la producción de soluciones y jarabes son, por ejemplo, agua, polioles, glicerol, aceite vegetal y similares. Los vehículos adecuados para supositorios son, por ejemplo, los aceites naturales o endurecidos, ceras, grasas, semi-polioles líquidos o líquidos y similares.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden, además, contener conservantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, aromatizantes, sales para modificar la presión osmótica, tampones, agentes de enmascaramiento o antioxidantes. También pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas.

45 Una realización de la invención es la composición farmacéutica que comprende tanto dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II como dicho inhibidor del proteasoma, en particular, para su uso con cáncer que expresa CD20.

Dicha composición farmacéutica puede comprender además uno o más vehículos aceptables a nivel farmacéutico .

50 La presente descripción se refiere además a una composición farmacéutica, en particular para uso en el cáncer, que comprende (i) una primera cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, y (ii) una segunda cantidad efectiva de un inhibidor del proteasoma. Tal composición comprende opcionalmente vehículos y/ o excipientes aceptables a nivel farmacéutico.

55 Las composiciones farmacéuticas sólo con el anticuerpo anti-CD20 de tipo II utilizadas de acuerdo con la presente descripción se preparan para su almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales aceptables a nivel farmacéutico (Remington Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol de butilo o bencilo, parabenos de alquilo tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas, polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas, agentes quelantes

tales como el EDTA, azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol, contraiones formadores de sales tales como sodio, complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/ o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

- 5 Las composiciones farmacéuticas sólo con el inhibidor de proteasoma, dependerán de sus propiedades farmacéuticas; por ejemplo para los compuestos químicos pequeños, tales como, por ejemplo, el bortezomib, una formulación podría ser, por ejemplo la siguiente:

10 a) Formulación de comprimidos (granulación húmeda):

Elemento	Ingredientes	mg/ comprimido			
1.	Compuesto de fórmula (I)	5	25	100	500
2.	Lactosa anhidra DTG	125	105	30	150
3.	Sta-Rx 1500	6	6	6	30
4.	Celulosa microcristalina	30	30	30	150
5.	Estearato de Magnesio	1	1	1	1
	Total	167	167	167	831

Procedimiento de fabricación

- 15 1. Mezclar los ingredientes 1, 2, 3 y 4 y granularlos con agua purificada.
 2. Secar los gránulos a 50°C.
 3. Pasar los gránulos a través de un equipo de molienda adecuado.
 4. Agregar el elemento 5 y mezclar durante tres minutos; comprimir en una prensa adecuada.

20 b) Formulación de la cápsula:

Elemento	Ingredientes	mg/ cápsula			
1.	Compuesto de fórmula (I)	5	25	100	500
2.	Lactosa hidratada	159	123	148	---
3.	Almidón de maíz	25	35	40	70
4.	Talco	10	15	10	25
5.	Estearato de Magnesio	1	2	2	5
	Total	200	200	300	600

Procedimiento de fabricación

- 25 1. Mezclar los ingredientes 1, 2 y 3 en un mezclador adecuado durante 30 minutos.
 2. Añadir los elementos 4 y 5, y mezclar durante 3 minutos.
 3. Introducirlo en una cápsula adecuada.

30 En una realización adicional de la invención, las composiciones farmacéuticas según la invención son preferiblemente dos formulaciones separadas para dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II y dicho inhibidor del proteasoma.

35 Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interracial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), 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 Pharmaceutical Sciences 16ª edición de Remington, Osol, A. Ed. (1980).

40 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos a los que se ha dado forma, por ejemplo, de películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen los poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o alcohol polivinílico), polilactidas (US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, acetato de etilenoivinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

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

50

La presente invención se refiere además a un método para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento (i) una primera cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II y (ii) una segunda cantidad efectiva de un inhibidor del proteasoma.

5 La presente invención se refiere además a un método para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento (i) una primera cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II; y (ii) una segunda cantidad efectiva de un inhibidor del proteasoma.

10 Tal como se utiliza aquí, el término "paciente" se refiere preferentemente a un ser humano en necesidad de tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 de tipo II (por ejemplo, un paciente que sufre de cáncer que expresa CD20) con cualquier propósito, y más preferiblemente un ser humano en necesidad de tal tratamiento para tratar el cáncer, o un estado o lesión precancerosa. Sin embargo, el término "paciente" también puede referirse a animales no humanos, preferiblemente mamíferos tales como perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos, entre otros.

15 La invención comprende además un anticuerpo anti-CD20 de tipo II para el tratamiento de un paciente que sufre de un cáncer que expresa CD20 en combinación un inhibidor del proteasoma tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

20 La invención comprende además un anticuerpo anti-CD20 de tipo II y un inhibidor de proteasoma para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa CD20 tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención comprende además un tipo de anticuerpo anti-CD20 II y un inhibidor de proteasoma para su uso en el tratamiento de un paciente que sufre de un CD20 que expresan tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

25 El inhibidor de proteasoma puede tener una CI50 de actividad inhibidora anti-proteasoma de 5 μ M o menos. Preferiblemente, tal inhibidor del proteasoma se selecciona a partir de aldehídos de péptidos (preferiblemente N-carbobenciloxi-leucil-norleucinal (IPSI-001)), boronatos de péptidos (preferiblemente y de acuerdo con la invención bortezomib (PS-341)), epoxicetonas de péptidos (preferiblemente el derivado de epoxomicina carfilzomib (PR-171)), o salinosporamida A (NPI-0052). Más preferiblemente, tales inhibidores del proteasoma se seleccionan de entre carfilzomib (PR-171), salinosporamida A (NPI-0052) o N-carbobenciloxi-leucil-norleucinal (IPSI-001). De acuerdo con la invención, el inhibidor de proteasoma es bortezomib (PS-341).

30 Dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II puede tener una relación de la capacidad de unión a CD20 sobre células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II en comparación con el rituximab de 0,3 a 0,6, más preferiblemente de 0,35-0,55, y aún más preferiblemente de 0,4 a 0,5.

35 Dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo B-Ly1 humanizado. Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).

40 El cáncer que expresa CD20 es un linfoma no Hodgkin (LNH) de células B.

Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo monoclonal.

45 Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Listado de Secuencias

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

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

55 Id. de Sec. N° 3-19 secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpos B-Ly1 humanizados (B-HH2 a B-HH9, B-HL8, y B-HL10 a B-HL17).

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

Descripción de las figuras

65 Figura 1 Actividad antitumoral del tratamiento combinado de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) que tiene una relación de la capacidad de unión a CD20 sobre células Raji (ATCC N° CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II en comparación con el rituximab de 0,44, con un inhibidor del proteasoma

(bortezomib) en SU-DHL-4, linfoma no-Hodgkin (NHL) de células B DLBCL. Los valores de la mediana del volumen tumoral [mm^3] +/- IQR se representan en el eje y; el número de días después de la inyección de las células tumorales se representa en el eje x. Leyenda: A) Vehículo (círculos), B) B-ly1 humanizado (B-HH6-B-KV1 GE) 10 mg/ kg una vez por semana (cuadrados), C) inhibidor del proteasoma bortezomib 1 mg/ kg una vez por semana (triángulos) y D) B-ly1 humanizado (B-HH6-B-KV1 GE) 10 mg/ kg una vez por semana co-administrado con el inhibidor del proteasoma bortezomib (1 mg/ kg una vez por semana) (cruces).

Figura 2 Intensidad media de fluorescencia (MFI, eje y de la izquierda) del anticuerpo anti-CD20 de tipo I (Cy5-rituximab = barra blanca) y del anticuerpo anti-CD20 de tipo II (B-Ly1 humanizado Cy5 B-HH6-B-KV1 GE = barra de color negro) en las células Raji (ATCC N° CCL-86). Relación de la capacidad de unión a CD20 del anticuerpo anti-CD20 de tipo I (rituximab) y el anticuerpo anti-CD20 de tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) en comparación con rituximab (escala en el eje y derecho).

Figura 3 Actividad antitumoral del tratamiento de dos anticuerpos anti-CD20 de tipo II en la línea de linfoma no Hodgkin (LNH) humana Z138. Ambos anticuerpos son anticuerpos B-Ly1 anti-CD20 humanizados; 1) B-HH6-B-KV1 glicomodificado (GE) y 2) B-HH6-B-KV1 de tipo salvaje (wt, no glicomodificado). Los valores promedios del volumen del tumor [mm^3] se representan en el eje y; el número de días después de la inyección de las células tumorales se representan 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) y C) B-Ly1 humanizado de tipo salvaje (B-HH6-B- KV1 wt) 30 mg/ kg una vez por semana (cruces).

Procedimientos Experimentales

Ejemplo 1

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

Agentes de ensayo

El anticuerpo anti-CD20 de tipo II B-HH6-B-KV1 GE (=B-Ly1 humanizado, B-HH6-B-KV1 glicomodificado, véase el documento WO 2005/044859 y WO 2007/031875) se proporcionó en una solución de reserva (c = 9,4 mg/ ml) GlycArt, Schlieren, Suiza. El tampón del anticuerpo incluye histidina, trehalosa y polisorbato 20. La solución de anticuerpo se diluyó apropiadamente en PBS desde la solución de reserva previamente a las inyecciones.

El inhibidor de proteasoma bortezomib se adquirió como formulación clínica de Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Alemania. La dilución se ajustó desde la solución de reserva reconstituida.

Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las células de linfoma no Hodgkin (LNH) humanas SU-DHL-4 (Chang, H., et al., Leuk. Lymphoma 8 (1992) 129-36) fueron proporcionadas amablemente por DSMZ, Braunschweig. La línea de células tumorales se cultivaron de forma rutinaria en medio RPMI (PAA, Laboratories, Austria) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (PAA Laboratories, Austria) y L-glutamina 2 mM, a 37°C en una atmósfera saturada de agua en un 5% de CO₂. El pase 5 se utilizó para el trasplante.

Animales

Los ratones hembra beige SCID, de 4-5 semanas de edad a su llegada (adquiridos de Bomholtgard, Ry, Dinamarca) se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos con ciclos diarios de 12 horas de luz/ 12 h de oscuridad según las directrices vigentes (GV-Solas; FELASA; TierSchG). El protocolo del estudio experimental fue revisado y aprobado por el gobierno local. Después de su llegada, los animales se mantuvieron en la zona de cuarentena de las instalaciones de estabulario durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un control continuo de la salud de manera regular. Se proporcionaron los alimentos de la dieta (Provimi Kliba 3337) y agua (pH acidificado 2,5-3) *ad libitum*.

Monitorización

Los animales se controlaron diariamente en busca de síntomas clínicos y para la detección de efectos adversos. Para el seguimiento a lo largo del experimento, el peso corporal de los animales de experimentación se documentó dos veces por semana y el volumen tumoral se midió mediante pie de rey después de su estadiaje.

Tratamiento de los animales

El tratamiento de los animales comenzó el día de la clasificación al azar, 22 días después del trasplante de células. Los grupos que recibieron el anticuerpo humanizado anti-CD20 de tipo II B-HH6-B-KV1 GE como agente único o en

combinación y el correspondiente grupo con vehículo fueron tratados por vía intravenosa 1 vez por semana, en el día de estudio 22, 29, 36 y 43 en la dosis indicada de 10 mg/ kg. El inhibidor del proteasoma Bortezomib se administró por vía intraperitoneal una vez por semana en el día 23, 29 y 37 a 1 mg/ kg.

5 Estudio de la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*

Los animales portadores de tumores que recibieron la dosis control de vehículo tuvieron que ser excluidos 15 días tras el inicio del tratamiento, debido a la carga tumoral. El tratamiento de los animales con B-HH6-B-KV1 GE (10 mg/ kg) una vez por semana como agente único inhibió significativamente el crecimiento de los xenoinjertos durante 10 días (TGI de 87%) en comparación con el control. Sin embargo, a pesar de los tratamientos con anticuerpos semanales los xenoinjertos de SU-DHL-4 progresaron de forma continua. Por el contrario, la terapia de agente único con el inhibidor del proteasoma bortezomib administrado una vez por semana a 1 mg/ kg fue sólo ligeramente activa, resultando en tumores de crecimiento progresivo similar al control. A pesar de la baja actividad de ambos compuestos como agentes únicos, la combinación consiguió una remisión de los xenoinjertos de linfoma SU-DHL-4. 15 El tratamiento semanal con B-HH6-B-KV1 GE (10 mg/ kg) y la inyección del inhibidor de proteasoma bortezomib una vez por semana causaron una regresión del linfoma en la primera semana y en su posterior período de tratamiento de combinación, 4 de 9 tumores SU-DHL-4 mostraron una remisión completa del tumor sin que se observara un nuevo crecimiento.

20 Ejemplo 2

Determinación de la relación de la capacidad de unión a CD20 sobre células Raji (ATCC N° CCL-86) del anticuerpo anti-CD20 de tipo II en comparación con el rituximab

25 Las células Raji (ATCC N° CCL-86) se mantuvieron en cultivo en medio RPMI-1640 (PanBiotech GmbH, N° Cat. PO4-18500) que contenía un 10% de FCS (Gibco, N° Cat. 10500-064). El anticuerpo anti-CD20 de tipo II B-HH6-B-KV1 (anticuerpo B-Ly1 humanizado) y el rituximab se marcaron con Cy5 usando mono éster de NHS (Amersham GE Healthcare, N° catálogo PA15101) según las instrucciones del fabricante. El conjugado de rituximab-Cy5 tenía una razón de marcaje de 2,0 moléculas de Cy5 por anticuerpo. El conjugado de B-HH6-B-KV1 Cy5 tenía una razón de 30 marcado de 2,2 moléculas de Cy5 por anticuerpo. Con el fin de determinar y comparar las capacidades y el modo de unión de ambos anticuerpos, las curvas de unión (por titulación del conjugado Rituximab Cy5 y el conjugado B-HH6-B-KV1 Cy5) se generaron por inmunofluorescencia directa usando la línea celular de linfoma de Burkitt Raji (ATCC N° CCL-86). La media de las intensidades de fluorescencia (MFI) se analizaron como CE50 (50% de la intensidad máxima) para el Cy5 conjugado con Rituximab y el Cy5 conjugado con B-HH6-B-KV1, respectivamente. Se tiñeron 35 * 10⁵ células por muestra durante 30 min. a 4°C. Después, las células se lavaron con medio de cultivo. La tinción con yoduro de propidio (PI) se utilizó para excluir las células muertas. Las mediciones se realizaron con el FACSArray (Becton Dickinson), y el yoduro de propidio (PI) se midió en Far Red A y el Cy5 en Red-A. La figura 2 muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) para la unión a CE50 (50% de la intensidad máxima) de B-HH6-B-KV1 marcado con Cy5 (barra negra) y rituximab marcado con Cy5 (barra blanca).

40 A continuación, la relación de la capacidad de unión a CD20 sobre células Raji (ATCC N° CCL-86) se calculó mediante la siguiente fórmula:

45 Relación de la capacidad de unión a CD20 sobre células Raji (ATCC N° CCL-86) =

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

55 Por lo tanto, B-HH6-B-KV1 como típico anticuerpo anti-CD20 de tipo II muestra una reducción de la capacidad de unión en comparación con el rituximab.

Ejemplo 3

60 Actividad antitumoral similar de los anticuerpos anti-CD20 (B-HH6-B-KV1 GE y wt) glicosilados (GE) y no glicosilados (de tipo salvaje, wt) frente a xenoinjertos del MCL Z138 en ratones SCID beige

Agentes de ensayo

El anticuerpo anti-CD20 de tipo II B-HH6-B-KV1 (glicomodificado (GE) y de tipo salvaje (wt) se proporcionaron 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.

5 Ambas soluciones se diluyeron apropiadamente en PBS desde la solución de reserva previamente a las inyecciones.

Líneas celulares y condiciones de cultivo

10 Las células Z138 de linfoma no Hodgkin (LNH) de células B humano 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, laboratorios, Austria) suplementado con suero bovino fetal al 10% (PAA Laboratories, Austria) y L-glutamina 2 mM a 37°C en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO₂. El pase 2 se utilizó para el trasplante.

15 Animales

Los ratones hembra beige SCID, de 4-5 semanas de edad a su llegada (adquiridos de Bomholtgard, Ry, Dinamarca) se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos con ciclos diarios de 12 horas de luz/ 12 h de oscuridad según las directrices vigentes (GV-Solas; FELASA; TierSchG). El protocolo del estudio experimental fue revisado y aprobado por el gobierno local. Después de su llegada, los animales se mantuvieron en la zona de cuarentena de las instalaciones de estabulario durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un control continuo de la salud de manera regular. Se proporcionaron los alimentos de la dieta (Provimi Kliba 3337) y agua (pH acidificado 2,5-3) *ad libitum*.

25 Monitorización

Los animales se controlaron diariamente en busca de síntomas clínicos y para la detección de efectos adversos. Para el seguimiento a lo largo del experimento, el peso corporal de los animales de experimentación se documentó dos veces por semana y el volumen tumoral se midió mediante pie de rey después de su estadía.

30 Tratamiento de los animales

El tratamiento de los animales comenzó el día de la clasificación al azar, 14 días después del trasplante de células. Los grupos que recibieron el anticuerpo humanizado anti-CD20 intravenoso (B-HH6-B-KV1 GE y wt) y el correspondiente grupo con vehículo fueron tratados 1 vez por semana, en el día de estudio 14, 20, 27 y 34 en la dosis indicada de 10 mg/ kg.

Estudio de la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*

40 Los animales portadores de tumores que recibieron la dosis control de vehículo tuvieron que ser excluidos 19 días tras el inicio del tratamiento, debido a la carga tumoral. El tratamiento de los animales con B-HH6-B-KV1 de tipo salvaje o glicomodificado (B-HH6-B-KV1 GE y wt) a 10 mg/ kg una vez por semana inhibió el sobrecrecimiento de los xenoinjertos poco después de inicio del tratamiento. En el momento de finalización de los controles, todos los tumores del grupo de anticuerpos estaban en regresión y más tarde la mayoría de los xenoinjertos tumorales Z138 mostraron una remisión completa. No se observaron diferencias significativas entre las versiones de tipo salvaje y glicomodificada del anticuerpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 en este modelo de xenotrasplante. Esto no era improbable ya que los ratones no expresan el receptor Fc de forma correcta en sus células NK y por lo tanto se cree que los ratones SCID beige son incompetentes para una CCDA mediada por NK debido a una inmunodeficiencia triple severa. Por lo tanto, los modelos de xenoinjerto subcutáneos en ratones SCID beige no son apropiados para imitar el efecto mediado por la CCDA humana con anticuerpos glicomodificados.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Terapia de combinación de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con un inhibidor de proteasoma

<130> 24570

<150> PE 07020820

<151> 2007-10-24

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

ES 2 527 775 T3

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

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

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

<210> 2

<211> 103

<212> PRT

10 <213> Mus sp.

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

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

15 <400> 2

ES 2 527 775 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

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH2)

10 <400> 3

ES 2 527 775 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 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> 4

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

10 <400> 4

ES 2 527 775 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 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 Leu 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> 5
- <211> 119
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH4)
- 10 <400> 5

ES 2 527 775 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

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH5)

10 <400> 6

ES 2 527 775 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

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

<400> 7

ES 2 527 775 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 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> 8

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH7)

<400> 8

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

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

ES 2 527 775 T3

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

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

<400> 9

ES 2 527 775 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

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

10 <400> 10

ES 2 527 775 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 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

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

10 <400> 11

ES 2 527 775 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

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL10)

<400> 12

10

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 Ala 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

ES 2 527 775 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> 13

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL11)

<400> 13

10

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

ES 2 527 775 T3

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

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

10 <400> 14

ES 2 527 775 T3

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
 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

<220>

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

10 <400> 15

ES 2 527 775 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

<210> 16

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL14)

<400> 16

ES 2 527 775 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

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

<400> 17

10 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

ES 2 527 775 T3

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

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

<400> 18

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

10 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

ES 2 527 775 T3

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> 19

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL17)

<400> 19

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 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

10 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> 20

<211> 115

ES 2 527 775 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo B-Ly1 humanizado B-KV1
<400> 20

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

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un
cáncer que expresa CD20, en el que el cáncer que expresa CD20 es un linfoma no Hodgkin de células B (NHL) en
combinación con un inhibidor del proteasoma, caracterizado porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un
anticuerpo B-Lyl humanizado y entre el 40% y el 60% de los oligosacáridos de la región Fc de dicho anticuerpo anti-
CD20 de tipo II no están fucosilados; y en el que el anticuerpo B-Lyl humanizado se caracteriza en que comprende
una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de Id. de Sec. N°: 7, y en que
10 comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de Id. de Sec. N°: 20; y en
donde dicho inhibidor del proteasoma es bortezomib.
- 15 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se administran uno o más agentes citotóxicos
adicionales, agentes quimioterapéuticos o anticancerígenos, o compuestos que mejoran los efectos de tales
agentes.
- 20 3. Un anticuerpo anti-CD20 de tipo II para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa CD20, en el que el
cáncer que expresa CD20 es un linfoma no Hodgkin de células B (NHL) en combinación con un inhibidor del
proteasoma caracterizado porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo humanizado B-Lyl y entre el
40% y el 60% de los oligosacáridos de la región Fc de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II no están fucosilados; y
en el que el anticuerpo B-Lyl humanizado se caracteriza en que comprende una secuencia de aminoácidos de la
región variable de la cadena pesada (VH) de Id. de Sec. N°: 7, y en que comprende una secuencia de aminoácidos
de la región variable de la cadena ligera (VL) de Id. de Sec. N°: 20.
- 25 4. El anticuerpo anti-CD20 de tipo II para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, se caracteriza porque se
administran uno o más agentes citotóxicos adicionales, agentes quimioterapéuticos o anticancerígenos, o
compuestos que mejoran los efectos de tales agentes.

Fig. 1

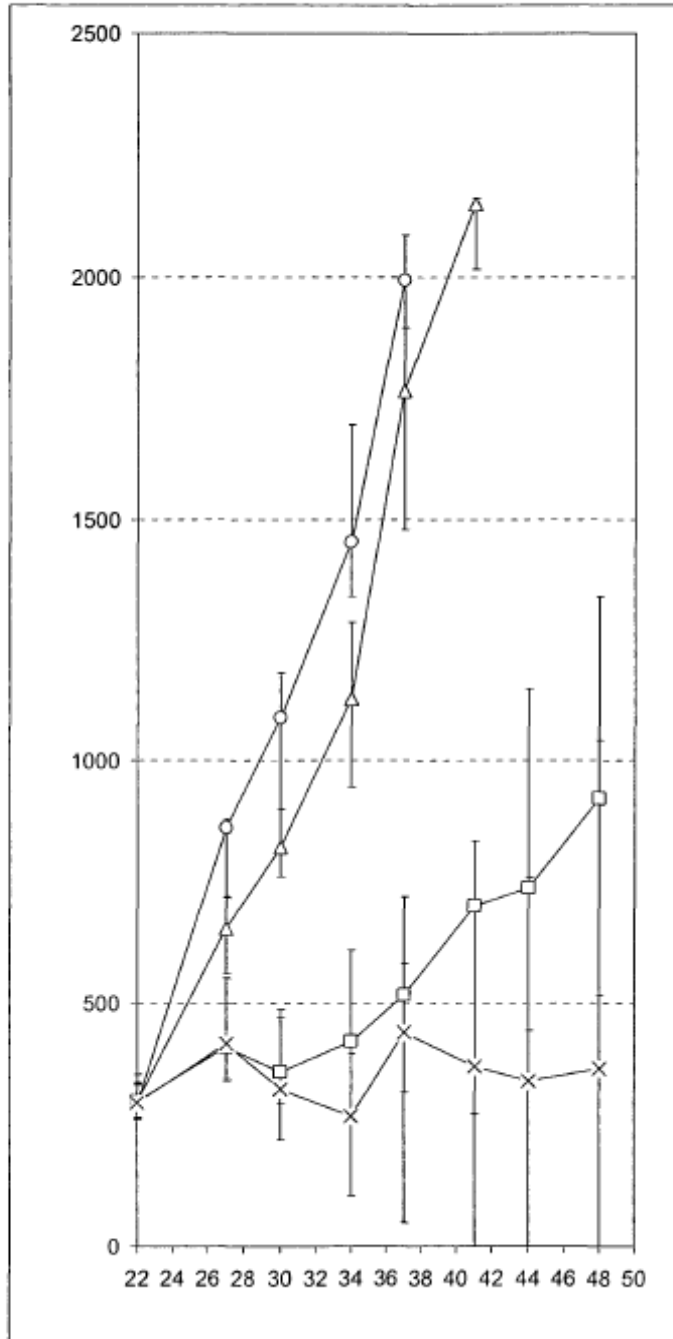


Fig. 2

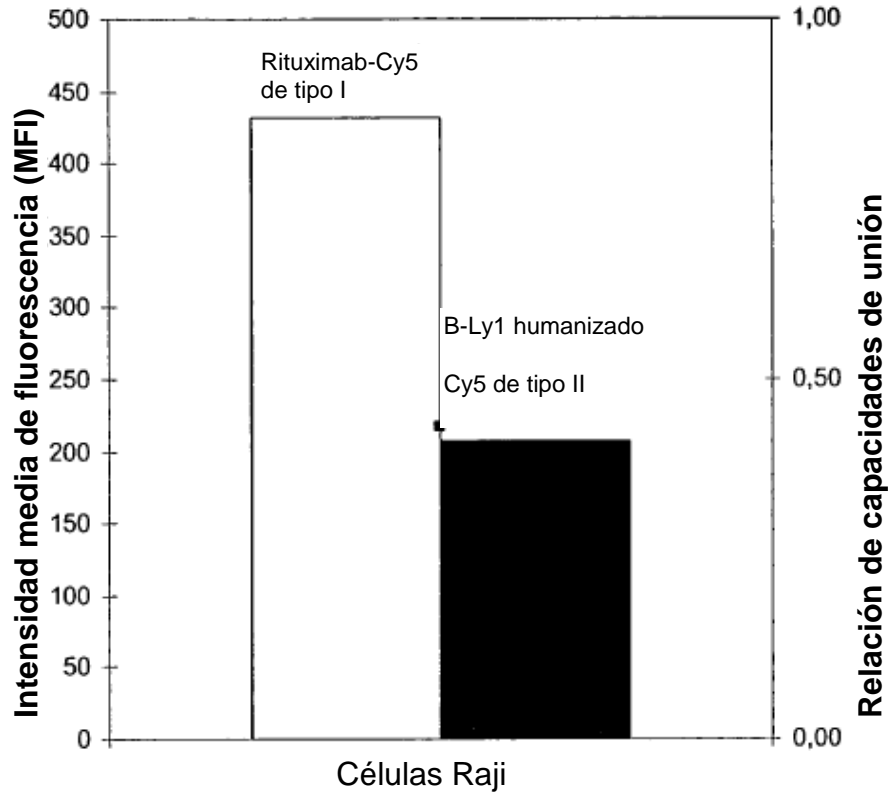


Fig. 3

