

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 312**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2009 PCT/EP2009/002111**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2009 WO09118142**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2009 E 09723808 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2268310**

54 Título: **Utilización de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada en combinación con ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina para el tratamiento de linfomas no de Hodgkin**

30 Prioridad:

**25.03.2008 EP 08005554**

**11.04.2008 EP 08007172**

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

**29.11.2016**

73 Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)**

**Wagistrasse 18**

**8952 Schlieren-Zuerich, CH**

72 Inventor/es:

**DUMONTET, CHARLES;**

**FRIESS, THOMAS;**

**HERTING, FRANK;**

**KLEIN, CHRISTIAN y**

**UMANA, PABLO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 592 312 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

Utilización de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada en combinación con ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina para el tratamiento de linfomas no de Hodgkin

La presente invención se refiere a la utilización de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer, especialmente cánceres que expresan CD20, en combinación con un agente quimioterapéutico seleccionado de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina.

Antecedentes de la invención

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

La región carboxilo-terminal de 85 aminoácidos de la proteína CD20 se encuentra situada dentro del citoplasma. La longitud de esta región contrasta con la de otras estructuras de superficie específicas de las células B, tales como las cadenas pesadas de IgM, IgD e IgG o las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$  de los antígenos de histocompatibilidad de clase II, que presentan regiones intracitoplasmáticas relativamente cortas, de 3, 3, 28, 15 y 16 aminoácidos, respectivamente (Komaromy M. et al., NAR 11:6775-6785, 1983). De entre los últimos 61 aminoácidos carboxilo-terminales, 21 son residuos ácidos, mientras que únicamente 2 son básicos, indicando que esta región presenta una fuerte carga neta negativa. El nº de acceso GenBank es NP-690605. Se cree que CD20 podría participar en la regulación de una o más etapas tempranas del proceso de activación y diferenciación de las células B (Tedder T.F. et al., Eur. J. Immunol. 25(16):881-887, 1986) y podría funcionar como un canal de iones calcio (Tedder T.F. et al., J. Cell. Biochem. 14D:195, 1990).

Existen dos tipos diferentes de anticuerpos anti-CD20 que difieren significativamente en su modo de unión a CD20 y en sus actividades biológicas (Cragg M.S. et al., Blood 103:2738-2743, 2004; y Cragg M.S. et al., Blood 101:1045-1052, 2003). Los anticuerpos de tipo I, tales como, por ejemplo, el rituximab, presentan una potente citotoxicidad mediada por el complemento potente, mientras que los anticuerpos de tipo II, tales como, por ejemplo, el Tositumomab (B1), 11B8, AT80 o los anticuerpos B-Ly1 humanizados, inician eficazmente la muerte de las células diana mediante apoptosis independiente de caspasa con la exposición concomitante a fosfatidilserina.

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

Tabla 1:

Propiedades de los anticuerpos anti-CD20 de tipos I y II	
Anticuerpos anti-CD20 de tipo I	Anticuerpos anti-CD20 de tipo II
Epítipo CD20 de tipo I	Epítipo CD20 de tipo II
Localización de CD20 en balsas lipídicas	No localizan CD20 en balsas lipídicas
CDC incrementada (en caso de ser de isotipo IgG1)	CDC reducida (en caso de ser de isotipo IgG1)
Actividad ADCC (en caso de ser de isotipo IgG1)	Actividad ADCC (en caso de ser de isotipo IgG1)
Capacidad de unión completa	Capacidad de unión reducida
Agregación homotípica	Agregación homotípica más fuerte
Inducción de apoptosis tras el entrecruzamiento	Fuerte inducción de muerte celular sin entrecruzamiento

Descripción resumida de la invención

La invención comprende la utilización de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de cáncer que expresa CD20 en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina, caracterizado porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo B-Ly1 humanizado glucomanipulado en el que el anticuerpo B-Ly1 humanizado presenta la región variable de cadena pesada (VH) de SEC ID nº 7 y una región variable de la cadena ligera (VL) de SEC ID nº 20 y el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 de tipo II se realiza en combinación

- a) con ciclofosfamida y vincristina, o
- b) ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina.

5 La invención comprende además un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada para el tratamiento de cáncer que expresa CD20 en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina, caracterizado porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo B-Ly1 humanizado glucomanipulado en el que el anticuerpo B-Ly1 humanizado presenta la región variable de cadena pesada (VH) de SEC ID nº 7 y una región variable de la cadena ligera (VL) de SEC ID nº 20 y el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 de tipo II se realiza en combinación

10 a) con ciclofosfamida y vincristina, o  
b) ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina.

#### Descripción detallada de la invención

15 El término "anticuerpo" comprende las diversas formas de anticuerpos, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos completos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos manipulados genéticamente, tales como anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos o anticuerpos recombinantes, así como fragmentos de dichos anticuerpos, con la condición de que se conserven las propiedades características según la invención.

20 Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión que presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son

25 producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo de un ratón transgénico, que presenta un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana fusionados a una célula inmortalizada.

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

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir una región de unión, obtenido de una fuente o especie y por lo menos una parte de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparado mediante técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana resultan especialmente preferentes. Dichos anticuerpos quiméricos murinos/humanos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN codificantes de regiones variables de inmunoglobulina murina y segmentos de ADN codificantes de regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de "anticuerpos quiméricos" comprendidos por la presente invención son aquéllas en las que la clase o subclase ha sido modificada o cambiada respecto a la del anticuerpo original. Dichos anticuerpos "quiméricos" también se denominan "anticuerpos de cambio de clase". Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección génica ahora bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Morrison S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984; patentes US nº 5.202.238 y nº 5.204.244.

45 La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que el marco o las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) han sido modificadas para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente de la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferente, se injerta una CDR murina en la región marco de un anticuerpo humano para preparar un "anticuerpo humanizado". (ver, por ejemplo, Riechmann L. et al., Nature 332:323-327, 1988, y Neuberger M.S. et al., Nature 314:268-270, 1985. Las CDR particularmente preferentes corresponden a aquéllas que representan secuencias que reconocen los antígenos indicados anteriormente para los anticuerpos quiméricos y bifuncionales.

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos del estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5:368-374, 2001). Basándose en dicha tecnología, pueden producirse anticuerpos humanos contra una gran diversidad de dianas. Se describen ejemplos de anticuerpos humanos en, por ejemplo, Kellermann S.A. et al., Curr. Opin. Biotechnol. 13:593-597, 2002.

60 La expresión "anticuerpo recombinante humano", tal como se utiliza en la presente memoria, 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 ó CHO, o de un animal (por ejemplo un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o para anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Dichos anticuerpos humanos recombinantes presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana en una forma reorganizada. Los anticuerpos recombinantes humanos según la invención han sido sometidos a

hipermutación somática *in vivo*. De esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de las secuencias VH y VL de la línea germinal humana y relacionadas con la misma, podrían no existir naturalmente en el repertorio *in vivo* de anticuerpos de la línea germinal humana.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "de unión específica" o "se une específicamente a" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD20. Preferentemente, la afinidad de unión es de valor  $K_D$  de  $10^{-9}$  moles/l o inferior (por ejemplo  $10^{-10}$  moles/l), preferentemente con un valor de  $K_D$  de  $10^{-10}$  moles/l o inferior (por ejemplo de  $10^{-12}$  moles/l). La afinidad de unión se determina con un ensayo de unión estándar, tal como el análisis gráfico de Scatchard en células que expresan CD20.

La expresión "molécula de ácidos nucleicos", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácidos nucleicos puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es de ADN bicatenario.

Los "dominios constantes" no participan directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, aunque sí participan en las funciones efectoras (ADCC, unión del complemento y CDC).

La expresión "región variable" (región variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cada una de las cadenas de la pareja de cadenas ligera y pesada que participa directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de las cadenas variables ligeras y pesadas humanas presentan la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias se encuentran ampliamente conservadas y conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones de marco adoptan una conformación de hoja  $\beta$  y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de hojas  $\beta$ . Las CDR en cada cadena son mantenidas en su estructura tridimensional por las regiones de marco y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena el sitio de unión de antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos según la invención y, por lo tanto, proporcionan un objetivo adicional de la invención.

Las expresiones "región hipervariable" o "parte de unión a antígeno de un anticuerpo", tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "de marco" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen en la presente memoria. Por lo tanto, las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. En particular, la CDR3 de la cadena pesada es la región que contribuye más a la unión de antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) y/o a partir de los residuos de un "bucle hipervariable".

Las expresiones "CD20" y "antígeno CD20" se utilizan intercambiamente en la presente memoria, e incluyen cualquier variante, isoformas y homólogos específicos de la CD20 humana que se expresan naturalmente en las células o que se expresan sobre las células transfectadas con el gen CD20. La unión de un anticuerpo de la invención al antígeno CD20 media en la eliminación de células que expresan CD20 (por ejemplo células tumorales) mediante la inactivación de CD20. La eliminación de las células que expresan CD20 puede producirse mediante uno o más de los mecanismos siguientes: inducción de muerte celular/apoptosis, ADCC y CDC.

Entre los sinónimos de CD20, según se reconoce en la técnica, se incluyen antígeno CD20 de linfocitos B, antígeno superficial B1 de linfocitos B, Leu-16, Bp35, BM5 y LF5.

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

Tabla 2:

Propiedades de los anticuerpos anti-CD20 de tipos I y II	
Anticuerpos anti-CD20 de tipo I	Anticuerpos anti-CD20 de tipo II
Epítipo CD20 de tipo I	Epítipo CD20 de tipo II
Localización de CD20 en balsas lipídicas	No localizan CD20 en balsas lipídicas
CDC incrementada (en caso de ser de isotipo IgG1)	CDC reducida (en caso de ser de isotipo IgG1)
Actividad ADCC (en caso de ser de isotipo IgG1)	Actividad ADCC (en caso de ser de isotipo IgG1)
Capacidad de unión completa	Capacidad de unión reducida
Agregación homotípica	Agregación homotípica más fuerte

Inducción de apoptosis tras el entrecruzamiento	Fuerte inducción de muerte celular sin entrecruzamiento
---	---

Una propiedad esencial del anticuerpo anti-CD20 de tipos I y II es su modo de unión. De esta manera, el anticuerpo anti-CD20 de tipos I y II puede clasificarse con la proporción entre las capacidades de unión a CD20 sobre las células Raji (ATCC nº CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 en comparación con el rituximab.

Los anticuerpos anti-CD20 de tipo II presentan una proporción de capacidades de unión a CD20 sobre las células Raji (ATCC nº CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 en comparación con el rituximab de entre 0,3 y 0,6, preferentemente de entre 0,35 y 0,55, más preferentemente de entre 0,4 y 0,5. Entre los ejemplos de dichos anticuerpos anti-CD20 de tipo II se incluyen, por ejemplo, el tositumomab (IgG2a B1), el anticuerpo IgG1 humanizado B-Ly1 (un anticuerpo IgG1 humanizado quimérico dado a conocer en el documento nº WO 2005/044859), IgG1 11B8 (según se da a conocer en el documento nº WO 2004/035607) e IgG1 AT80.

Preferentemente, 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 da a conocer en el documento nº WO 2005/044859). Los anticuerpos anti-CD20 de tipo II presentan, en contraste con los anticuerpos de tipo I, una proporción de capacidades de unión a CD20 sobre las células Raji (ATCC nº CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 en comparación con el rituximab de entre 0,8 y 1,2, preferentemente de entre 0,9 y 1,1. Entre los ejemplos de los anticuerpos anti-CD20 de tipo I se incluyen, por ejemplo, el rituximab, IgG2a 1F5 (ECACC, hibridoma; Press O.W. et al., Blood 69/2:584-591, 1987), IgG3 HI47 (ECACC, hibridoma), IgG1 2C6 (tal como se da a conocer en el documento nº WO 2005/103081), IgG1 2F2 (tal como se da a conocer en los documentos nº WO 2004/035607 y nº WO 2005/103081) e IgG1 2H7 (según se da a conocer en el documento nº WO 2004/056312).

La "proporción entre las capacidades de unión a CD20 sobre las células Raji (ATCC nº CCL-86) de los anticuerpos anti-CD20 en comparación con el rituximab" se determina mediante medición de inmunofluorescencia directa (se miden las intensidades medias de fluorescencia (IMF)) 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), tal como se indica en el Ejemplo nº 2 y se calcula de la manera siguiente:

Proporción de capacidades de unión a CD20 sobre células Raji (ATCC nº CCL-86)=

$$\frac{\text{IMF (Cy5-anticuerpo anti-CD20)}}{\text{IMF(Cy5-rituximab)}} \times \frac{\text{Cy5-proporción marcaje(Cy5-rituximab)}}{\text{Cy5-proporción marcaje(Cy5-anticuerpo anti-CD20)}}$$

La IMF es la intensidad media de fluorescencia. La "proporción de marcaje de Cy5" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al número de moléculas de marcaje Cy5 por cada molécula de anticuerpo.

Típicamente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II presenta una proporción de capacidades de unión a CD20 sobre las células Raji (ATCC nº CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 en comparación con el rituximab de entre 0,3 y 0,6, preferentemente de entre 0,35 y 0,55, más preferentemente de entre 0,4 y 0,5.

Dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II según la invención presenta una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada.

La expresión "anticuerpo que presenta una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada" o "anticuerpo con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada" se refiere a un anticuerpo, según se define esta expresión en la presente memoria, que presenta una ADCC incrementada según se determina mediante cualquier método adecuado conocido por el experto ordinario en la materia. Un ensayo in vitro de ADCC aceptado es el siguiente:

- 1) el ensayo utiliza células diana que es conocido que expresan el antígeno diana reconocido por la región de unión a antígeno del anticuerpo,
- 2) el ensayo utiliza células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas, aisladas a partir de sangre de un donante sano seleccionado aleatoriamente, a modo de células efectoras,
- 3) el ensayo se lleva a cabo según el protocolo siguiente:
  - i) se aíslan las PBMC utilizando procedimientos estándares de centrifugación en gradiente de densidad y se suspenden a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml en medio de cultivo celular RPMI,
  - ii) se cultivan las células diana mediante métodos de cultivo de tejido estándares, se recolectan de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad superior al 90%, se lavan en medio de cultivo celular RPMI, se marcan con 100  $\mu$ Curies de  $^{51}\text{Cr}$ , se lavan dos veces con medio de cultivo celular, y se resuspenden en medio de cultivo celular a una densidad de  $10^5$  células/ml,
  - iii) se transfieren 100 microlitros de la suspensión final de células diana anteriormente indicada a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos,

iv) el anticuerpo se diluye en serie entre 4.000 ng/ml y 0,04 ng/ml en medio de cultivo celular y se añaden 50 microlitros de las soluciones de anticuerpo resultantes a las células diana en la placa de microtitulación de 96 pocillos, realizando un ensayo por triplicado de diversas concentraciones de anticuerpo que cubren el intervalo completo de concentraciones anteriormente indicado,

v) para los controles de liberación máxima (MR), 3 pocillos adicionales en la placa que contiene las células diana marcadas reciben 50 microlitros de una solución acuosa al 2% (VN) de detergente no iónico (Nonidet, Sigma, St. Louis) en lugar de la solución de anticuerpos (punto iv, anteriormente),

vi) para los controles de liberación espontánea (SR), 3 pocillos adicionales en la placa que contiene las células diana marcadas reciben 50 microlitros de medio de cultivo celular RPMI en lugar de la solución de anticuerpos (punto iv, anteriormente),

vii) la placa de microtitulación de 96 pocillos seguidamente se centrifuga a 50xg durante 1 minuto y se incuba durante 1 hora a 4°C,

viii) se añaden 50 microlitros de la suspensión de PBMC (punto i, anteriormente) a cada pocillo, proporcionando una proporción de efector:célula diana de 25: 1 y las placas se introducen en un incubador bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 4 horas,

ix) se recolecta el sobrenadante libre de células de cada pocillo y la radioactividad liberada experimentalmente (ER) se cuantifica utilizando un contador gamma,

x) se calcula el porcentaje de lisis específica para cada concentración de anticuerpo según la fórmula  $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$ , en la que ER es la radioactividad media cuantificada (ver el punto ix, anteriormente) para la concentración de anticuerpos correspondiente, MR es la radioactividad media cuantificada (ver el punto ix, anteriormente) para los controles MR (ver el punto V, anteriormente), y SR es la radioactividad media cuantificada (ver el punto ix, anteriormente) para los controles SR (ver el punto vi, anteriormente),

4) se define "ADCC incrementada" como un incremento del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a ensayo anteriormente, y/o una reducción de la concentración de anticuerpos necesaria para alcanzar la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observado dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a ensayo anteriormente. El incremento de ADCC es respecto a la ADCC, medida con el ensayo anteriormente indicado, mediada por el mismo anticuerpo, producida por el mismo tipo de células huésped, utilizando los mismos métodos estándares de producción, purificación, formulación y almacenamiento, que son conocidos por el experto en la materia, pero que no ha sido producido por células huésped manipuladas para sobreexpresar GnTIII.

Dicha "ADCC incrementada" puede obtenerse mediante glucomanipulación de dichos anticuerpos, es decir se incrementan dichas funciones efectoras naturales mediadas por células de anticuerpos monoclonales mediante la manipulación de su componente oligosacárido, tal como se describe en Umana P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999 y patente US nº 6.602.684.

La expresión "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" se refiere a la lisis de células tumorales humanas diana por el anticuerpo según la invención en presencia del complemento. CDC se mide preferentemente mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan CD20 con un anticuerpo anti-CD20 según la invención en presencia del complemento. Se presenta la CDC en el caso de que el anticuerpo induzca a una concentración de 100 nM la lisis (la muerte celular) de 20% o más de las células tumorales tras 4 horas. El ensayo se lleva a cabo preferentemente con células tumorales marcadas con <sup>51</sup>Cr o Eu y midiendo el <sup>51</sup>Cr o Eu liberado. Entre los controles se incluyen la incubación de las células diana tumorales con el complemento, aunque sin el anticuerpo.

Típicamente, los anticuerpos anti-CD20 de tipo II del isotipo IgG1 muestran propiedades de CDC características. Los anticuerpos anti-CD20 de tipo II presentan una CDC reducida (en caso de ser del isotipo IgG1) en comparación con los anticuerpos de tipo I del isotipo IgG1. Preferentemente, los anticuerpos anti-CD20 de tipo II son anticuerpos de isotipo IgG1.

El anticuerpo "rituximab" (anticuerpo de referencia; ejemplo de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I) es un anticuerpo monoclonal que contiene dominio constante gamma 1 quimérico murino-humano genéticamente manipulado dirigido contra el antígeno CD20 humano. Este anticuerpo quimérico contiene los dominios constantes gamma 1 humanos y se identifica con el nombre "C2B8" en la patente nº US 5.736.137 (Anderson K.C. et al.), publicada el 17 de abril de 1998, de IDEC Pharmaceuticals Corporation. El rituximab ha sido autorizado para el tratamiento de pacientes con linfoma no de Hodgkin de células B CD20-positivo de grado bajo o folicular en recaída o refractario. Los estudios in vitro de mecanismo de acción han demostrado que el rituximab muestra citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) humano (Reff M.E. et al., Blood 83(2):435-445, 1994). Además, muestra actividad significativa en ensayos que miden la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La expresión "anticuerpo B-Ly1 humanizado" se refiere al anticuerpo B-Ly1 humanizado según se da a conocer en los documentos nº WO 2005/044859 y nº WO 2007/031875, que se obtuvieron del anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 B-Ly1 (región variable de la cadena pesada murina (VH): SEC ID nº región variable de la cadena ligera (VL) murina: SEC ID nº 2, ver Poppema S. y Visser L., Biotest Bulletin 3:131-139, 1987, mediante quimerización con un dominio constante humano de IgG1 y tras la humanización (ver los documentos nº WO 2005/044859 y nº WO

2007/031875). Estos "anticuerpos B-Ly1 humanizados" se dan a conocer en detalle en los documentos n° WO 2005/044859 y n° WO 2007/031875.

5 Preferentemente, el "anticuerpo B-Ly1 humanizado" presenta una región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de entre el grupo de las secuencias SEC ID n° 3 a SEC ID n° 20 (B-HH2 a B-HH9 y B-HL8 a B-HL17 de los documentos WO n° 2005/044859 y n° 2007/031875). Resultan especialmente preferentes las secuencias SEC ID n° 3, 4, 7, 9, 11, 13 y 15 (B-HH2, BHH-3, B-HH6, B-HH8, B-HL8, B-HL11 y B-HL13 de las patentes WO n° 2005/044859 y n° 2007/031875). Preferentemente, el "anticuerpo B-Ly1 humanizado" presenta una región variable de cadena ligera (VL) de secuencia SEC ID n° 20 (B-KV1 de los documentos n° WO 2005/044859 y n° WO 10 2007/031875). Además, el anticuerpo B-Ly1 humanizado preferentemente es un anticuerpo IgG1. Según la invención, dichos anticuerpos B-Ly1 humanizados se encuentran glucomanipulados (GE) en la región Fc según los procedimientos descritos en los documentos n° WO 2005/044859, n° WO 2004/065540, n° WO 2007/031875, Umana P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999, y el documento n° WO 99/154342. Dichos "anticuerpos B-Ly1 humanizados glucomanipulados" presentan un patrón alterado de glucosilación en la región Fc, presentando 15 preferentemente un nivel reducido de residuos de fucosa. Preferentemente, por lo menos 40%, o más (en una realización, entre 40% y 60%; en otra realización, por lo menos 50%, y en todavía otra realización, por lo menos 70% o más) de los oligosacáridos de la región Fc son no fucosilados. Además, los oligosacáridos de la región Fc preferentemente son biantenarios.

20 El componente oligosacárido puede afectar significativamente a propiedades relevantes a la eficacia de una glucoproteína terapéutica, incluyendo la estabilidad física, la resistencia al ataque de proteasas, las interacciones con el sistema inmunológico, la farmacocinética y la actividad biológica específica. Dichas propiedades pueden depender no sólo de la presencia o ausencia, sino también de las estructuras específicas de los oligosacáridos. Pueden alcanzarse algunas generalizaciones sobre la relación entre estructura del oligosacárido y función de la 25 glucoproteína. Por ejemplo, determinadas estructuras oligosacáridas median en la eliminación rápida de la glucoproteína del flujo sanguíneo mediante interacciones con proteínas de unión a carbohidrato específicas, mientras que otras pueden unirse a anticuerpos y desencadenar reacciones inmunológicas no deseadas. (Jenkins N. et al., Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-81).

30 Las células de mamífero son los huéspedes preferentes para la producción de glucoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad para glucosilar proteínas de la manera más compatible para la aplicación en el ser humano (Cumming D.A. et al., Glycobiology 1:115-30, 1991; Jenkins N. et al., Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-81). Las bacterias muy raramente glucosilan las proteínas, y al igual que otros tipos de huéspedes comunes, tales como levaduras, hongos filamentosos, células de insecto y vegetales, proporcionan patrones de glucosilación asociados a la rápida 35 eliminación del flujo sanguíneo, interacciones inmunológicas no deseables, y en algunos casos específicos, una actividad biológica reducida. Entre las células de mamífero, las células de ovario de hámster chino (CHO) han sido las utilizadas más comúnmente durante las últimas dos décadas. Además de proporcionar patrones de glucosilación adecuados, estas células permiten la generación consistente de líneas celulares clonales altamente productivas genéticamente estables. Pueden cultivarse hasta densidades elevadas en biorreactores simples utilizando medio 40 libre de suero, y permiten el desarrollo de procedimientos seguros y reproducibles. Entre otras células animales utilizadas comúnmente se incluyen las células renales de hámster neonato (BHK), células de mieloma de ratón NS0- y SP2/0. Más recientemente, también se ha sometido a ensayo la producción de animales transgénicos (Jenkins N. et al., Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-981).

45 Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidrato en posiciones conservadas en las regiones constantes de cadena pesada, presentando cada isotipo una serie diferente de estructuras de carbohidrato N-ligadas, que afectan variablemente al ensamblaje, secreción o actividad funcional de la proteína (Wright A. y Morrison S.L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32). La estructura del carbohidrato N-ligado unido varía considerablemente dependiendo del grado de procesamiento, y puede incluir oligosacáridos ricos en manosa, de múltiples 50 ramificaciones, así como oligosacáridos complejos biantenarios (Wright A. y Morrison S.L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32). Típicamente se produce un procesamiento heterogéneo de las estructuras oligosacáridas nucleares unidas en un sitio de glucosilación particular, de manera que incluso los anticuerpos monoclonales pueden encontrarse en múltiples glucoformas. De manera similar, se ha demostrado que las diferencias principales en la glucosilación de los anticuerpos se producen entre líneas celulares, y que se observan incluso diferencias menores en una línea celular dada cultivada bajo condiciones de cultivo diferentes (Lifely M.R. et al., Glycobiology 5(8):813-22, 1995).

Una manera de obtener grandes incrementos de potencia, manteniendo simultáneamente un procedimiento simple de producción y potencialmente evitando efectos secundarios no deseables significativos, es incrementar las 60 funciones efectoras naturales mediadas por células de los anticuerpos monoclonales mediante la manipulación de su componente oligosacárido, tal como se describe en Umana P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999, y patente US n° 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, Iso anticuerpos utilizados más comúnmente en la inmunoterapia del cáncer, son glucoproteínas que presentan un sitio de glucosilación N-ligado conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos complejos biantenarios unidos a Asn27 se encuentran enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico, y su presencia 65 resulta esencial para que el anticuerpo medie en funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente

de anticuerpos (ADCC) (Lifely M. R. et al., *Glycobiology* 5:813-822, 1995; Jefferis R. et al., *Immunol. Rev.* 163:59-76, 1998; Wright A. y Morrison S.L., *Trends Biotechnol.* 15:26-32, 1997).

5 Previamente se ha demostrado que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII7y"), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados, incrementa significativamente la actividad ADCC in vitro de un anticuerpo monoclonal quimérico antineuroblastoma (chCE7) producido por las células CHO manipuladas (ver Umana P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180, 1999, y documento nº WO 99/154342). El anticuerpo chCE7 pertenece a una gran clase de anticuerpos monoclonales no conjugados que presentan una elevada afinidad y especificidad tumorales, pero que presentan  
10 demasiada poca potencia para resultar clínicamente útiles al producir las en líneas celulares industriales estándares que no presentan el enzima GnTIII (Umana P. et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180). El estudio fue el primero que demostró que podían obtenerse grandes incrementos de la actividad de ADCC mediante la manipulación de las células productoras de anticuerpos para que produjesen GnTIII, lo que también conducía a un incremento de la  
15 proporción de oligosacáridos biantenarios asociados a región constante (Fc), incluyendo oligosacáridos biantenarios no fucosilados, por encima de los niveles observados en anticuerpos naturales.

La expresión "expresión del antígeno CD20" pretende indicar un nivel significativo de expresión del antígeno CD20 en una célula, preferentemente sobre la superficie de una célula T o B, más preferentemente de una célula B, procedente de un tumor o cáncer, respectivamente, preferentemente de un tumor no sólido. Los pacientes que  
20 presentan un "cáncer que expresa CD20" pueden determinarse mediante ensayos estándares conocidos de la técnica, por ejemplo la expresión de antígeno CD20 se mide utilizando la detección inmunohistoquímica (IHQ), FACS o mediante detección basada en PCR del ARNm correspondiente.

La expresión "cáncer que expresa CD20" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a todos los cánceres en los que las células del cáncer muestran expresión del antígeno CD20. Dicho cáncer que expresa CD20 puede ser, por ejemplo, linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer pulmonar, cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCL), cáncer pulmonar de células bronquiolo-alveolares, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, 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 los tubos de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del 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 del tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasmas del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tallo cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma pituitario, incluyendo versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriormente indicados, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriormente indicados.  
35

Preferentemente, el cáncer que expresa CD20 tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a linfomas (preferentemente linfomas no Hodgkin de células B (NHL)) y leucemias linfocíticas. Entre dichos linfomas y leucemias linfocíticas se incluyen, por ejemplo, a) linfomas foliculares, b) linfomas de células pequeñas no hendidas/linfoma de Burkitt (incluyendo el linfoma de Burkitt endémico, el linfoma de Burkitt esporádico y el linfoma no de Burkitt), c) linfomas de zona marginal (incluyendo el linfoma de células B extranodal de la zona marginal (linfomas de tejido linfático asociado a mucosa, MALT), linfoma nodal de zona marginal de células B y linfoma esplénico de la zona marginal), d) linfoma de células del manto (MCL), e) linfoma de células grandes (incluyendo el linfoma de células B grandes difusas (DLCL), linfoma de células mixtas difusas, linfoma inmunoblástico, linfoma mediastinal primario de células B, linfoma angiocéntrico-linfoma pulmonar de células B, f) leucemia de células pilosas, g) linfoma linfocítico, macroglobulinemia de Waldenström (CLL)/linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia prolinfocítica de células B, i) neoplasmas de células plasmáticas, mieloma de células plasmáticas, mieloma múltiple, plasmacitoma, j) enfermedad de Hodgkin.  
40  
45  
50

Más preferentemente, 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 (MCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma difuso de células B grandes (DLCL), linfoma de Burkitt, leucemia de células pilosas, linfoma folicular, mieloma múltiple, linfoma de la zona marginal, trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD), linfoma asociado al VIH, macroglobulinemia de Waldenström o linfoma primario del SNC.  
55

La expresión "un método de tratamiento" o su equivalente, al aplicarla a, por ejemplo, cáncer, se refiere a un procedimiento o curso de acción que se ha diseñado para reducir o eliminar el número de células de cáncer en un paciente, o para aliviar los síntomas de un cáncer. Un "método de tratamiento" de cáncer o de otro trastorno proliferativo no se refiere necesariamente a que las células de cáncer u otro trastorno serán, de hecho, eliminadas, a que el número de células o el trastorno, de hecho, se reducirán, o a que los síntomas de un cáncer o de otro trastorno, de hecho, se aliviarán. Con frecuencia, se lleva a cabo un método de tratamiento del cáncer incluso que presenta una baja probabilidad de éxito, pero que, dada la historia médica y la esperanza de supervivencia estimada de un paciente, se considera que proporciona un curso de acción globalmente beneficioso.  
60  
65

En una realización, el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada se realiza en combinación con ciclofosfamida y vincristina.

5 Además, se da a conocer el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada en combinación con doxorubicina.

Además, se da a conocer el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada en combinación con ciclofosfamida.

10 En otra realización, el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada se realiza en combinación con ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina.

15 Las expresiones "coadministración", "coadministrar" o "en combinación" tal como se utilizan en la presente memoria presentan el mismo significado y se refieren a la administración de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II y dichos agentes quimioterapéuticos como una formulación única o como dos formulaciones separadas. La coadministración puede ser simultánea o secuencial en cualquier orden, en la que preferentemente se deja un periodo de tiempo mientras ambos agentes activos (o la totalidad de los mismos) ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II y dichos agentes quimioterapéuticos se coadministran simultánea o  
 20 secuencialmente (por ejemplo por vía intravenosa (i.v.) o mediante una infusión continua (una para el anticuerpo y finalmente una para los agentes quimioterapéuticos, o los agentes quimioterapéuticos se administran por vía oral). Al coadministrar secuencialmente ambos agentes terapéuticos, la dosis se administra el mismo día en dos administraciones separadas, o uno de los agentes se administra el día 1 y el segundo se coadministra entre el día 2 y el día 7, preferentemente los días 2 a 4. De esta manera, el término "secuencialmente" se refiere dentro de los 7  
 25 días posteriores a la administración del primer componente, preferentemente dentro de los 4 días posteriores a la administración del primer componente, y el término "simultáneamente" se refiere a que se administran al mismo tiempo. El término "coadministración" con respecto a las dosis de mantenimiento del anticuerpo anti-CD20 de tipo II y los agentes quimioterapéuticos se refiere a que las dosis de mantenimiento pueden coadministrarse simultáneamente, en el caso de que el ciclo de tratamiento resulte apropiado para ambos fármacos, por ejemplo  
 30 cada semana O los agentes quimioterapéuticos se administran, por ejemplo, cada primer a tercer día y el anticuerpo anti-CD20 de tipo II se administra cada semana. Alternativamente, las dosis de mantenimiento se coadministran secuencialmente, en un solo día o en varios días.

35 Resulta evidente que los anticuerpos se administran en el paciente en una "cantidad terapéuticamente eficaz" (o simplemente "cantidad eficaz"), que es la cantidad del compuesto o combinación respectivo que inducirá la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que busca el investigador, veterinario, médico u otro responsable clínico.

40 La cantidad de coadministración de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II y dichos agentes quimioterapéuticos y la planificación temporal de la coadministración dependerán del tipo (especie, género, edad, peso, etc.) y condición del paciente bajo tratamiento y de la severidad de la enfermedad o condición bajo tratamiento. Dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II y dichos agentes quimioterapéuticos se coadministran convenientemente en el paciente de una sola vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, una dosis candidata inicial para la coadministración de ambos fármacos en el paciente es de entre aproximadamente 1 µg/kg y 50 mg/kg  
 45 (por ejemplo de entre 0,1 y 20 mg/kg) de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II y de entre 1 µg/kg y 50 mg/kg (por ejemplo de entre 0,1 y 20 mg/kg) de dichos agentes quimioterapéuticos. En el caso de que la administración sea intravenosa, el tiempo de infusión inicial de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II o de dichos agentes quimioterapéuticos puede ser más prolongado que los tiempos de infusión posteriores, por ejemplo aproximadamente 90 minutos para la infusión inicial, y aproximadamente de 30 minutos para las infusiones  
 50 posteriores (en el caso de que la infusión inicial resulte bien tolerada).

La dosis preferente de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II se encontraría comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,05 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg. De esta manera, puede administrarse en el paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 10mg/kg o 30 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). La dosis preferente de dichos agentes quimioterapéuticos se encontrará comprendida en el intervalo de entre 0,01 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg, por ejemplo de entre 0,1 mg/kg y 10,0 mg/kg para el bortezomib. Dependiendo del tipo (especie, género, edad, peso, etc.) y condición del paciente, y del tipo de anticuerpo anti-CD20 y agentes quimioterapéuticos, la dosis y el programa de administración de dicho anticuerpo anti-CD20 pueden diferir de la dosis de los agentes quimioterapéuticos. Por ejemplo, dicho anticuerpo anti-CD20  
 55 glucomanipulado puede administrarse, por ejemplo, cada una a tres semanas y dichos agentes quimioterapéuticos pueden administrarse diariamente o cada 2 a 10 días. También puede administrarse una dosis inicial de carga más elevada, seguido de una o más dosis más bajas.

65 En una realización preferente, el medicamento resulta útil para prevenir o reducir la metástasis o la diseminación adicional en dicho paciente que sufre cáncer que expresa CD20. El medicamento resulta útil para incrementar la supervivencia de dicho paciente, para incrementar la supervivencia libre de progresión de dicho paciente o para

incrementar la duración de la respuesta, resultando en una mejora estadísticamente significativa y clínicamente significativa del paciente tratado según mediciones de la duración de supervivencia, supervivencia libre de progresión, tasa de respuesta o duración de la respuesta. En una realización preferente, el medicamento resulta útil para incrementar la tasa de respuesta en un grupo de pacientes.

Puede utilizarse en el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-CD20 de tipo II y agentes quimioterapéuticos del cáncer que expresa CD20. Dichos moléculas se encuentran convenientemente presentes en combinación en cantidades que resultan eficaces para el propósito deseado. Por lo tanto, en una realización, en el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina, se administra un corticoesteroide adicional, preferentemente prednisona.

En una realización, el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-CD20 de tipo II y agentes quimioterapéuticos se aplica sin dichos corticoesteroides adicionales.

La utilización del corticoesteroide anteriormente indicado, tal como en regímenes quimioterapéuticos, se encuentra generalmente bien caracterizada en las técnicas terapéuticas del cáncer, y su utilización en la presente memoria se encuentra comprendida dentro de las mismas consideraciones de tolerancia al seguimiento y efectividad del mismo, y de control de las vías y dosis de administración, con algunos ajustes. Por ejemplo, las dosis reales de los agentes quimioterapéuticos y corticoesteroides pueden variar dependiendo de la respuesta de las células en cultivo del paciente determinada mediante la utilización de métodos de cultivo de tejidos. Generalmente, se reduce la dosis en comparación con la cantidad utilizada en ausencia de otros agentes adicionales.

Las dosis típicas de los agentes quimioterapéuticos y/o corticoesteroides eficaces pueden encontrarse comprendidas en los intervalos recomendados por el fabricante, y en el caso indicado por las respuestas in vitro o las respuestas en modelos animales, pueden reducirse hasta aproximadamente en un orden de magnitud (concentración o cantidad). De esta manera, la dosis real dependerá del criterio del médico, de la condición del paciente y de la eficacia del método terapéutico, basada en la sensibilidad in vitro de las células malignas en cultivo primario o de la muestra de tejido en histocultivo, o de las respuestas observadas en los modelos animales apropiados.

En el contexto de la presente invención, puede utilizarse una cantidad eficaz de radiación ionizante y/o puede utilizarse un radiofarmacéutico, además del tratamiento de combinación de anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada y agente quimioterapéutico del cáncer que expresa CD20. La fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente bajo tratamiento. En el caso de que la fuente sea externa al paciente, la terapia se conoce como terapia de radiación de haz externo (EBRT). En el caso de que la fuente de radiación sea interna al paciente, el tratamiento se denomina braquiterapia (BT). Los átomos radioactivos para la utilización en el contexto de la presente invención pueden seleccionarse de entre el grupo que incluye, aunque sin limitación, radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yodo-123, yodo-131 e indio-111. También resulta posible marcar el anticuerpo con dichos isótopos radioactivos. Preferentemente, el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada y agente quimioterapéutico se aplica sin dicha radiación ionizante.

La terapia de radiación es un tratamiento estándar para controlar los tumores y/o metástasis tumorales no resecables o inoperables. Se han observado resultados mejorados al combinar la terapia de radiación con la quimioterapia. La terapia de radiación se basa en el principio de que la radiación de dosis elevada administrada en un área diana resultará en la muerte de las células reproductoras en tejidos tanto tumorales como normales. El régimen de dosificación de radiación generalmente se define en términos de dosis de radiación absorbida (Gy), tiempo y fraccionamiento, y debe ser cuidadosamente definida por el oncólogo. La cantidad de radiación recibida por un paciente dependerá de diversas consideraciones, aunque las dos más importantes son la localización del tumor en relación a otras estructuras u órganos críticos del cuerpo, y el grado en el que se ha extendido el tumor. Un curso típico de tratamiento para un paciente sometido a terapia de radiación será un programa de tratamiento de 1 a 6 semanas de duración, con una dosis total de entre 10 y 80 Gy administrados en el paciente en una única fracción diaria de aproximadamente 1,8 a 2,0 Gy, 5 días por semana. En una realización preferente de la presente invención existe sinergia en el caso de que los tumores en pacientes humanos se traten 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 se potencia en combinación con radiación, opcionalmente con agentes quimioterapéuticos o anticáncer adicionales. Los parámetros de terapias adyuvantes de radiación se encuentran contenidos en, por ejemplo, la patente WO n° 99/60023.

Los anticuerpos anti-CD20 de tipo II se administran en el paciente según métodos conocidos, mediante administración intravenosa en forma de bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial o intratecal. La administración intravenosa o subcutánea de los anticuerpos resulta preferente.

5 Los agentes quimioterapéuticos se administran en un paciente según métodos conocidos, por ejemplo mediante administración intravenosa en forma de bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal o peroral. La administración intravenosa, subcutánea u oral de los agentes quimioterapéuticos resulta preferente.

10 La presente exposición comprende además un kit que comprende un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada y uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina, para el tratamiento de combinación de un paciente que sufre de cáncer que expresa CD20. En una realización preferente, los recipientes del kit pueden incluir además un portador farmacéuticamente aceptable. El kit puede incluir además un diluyente estéril, que preferentemente se almacena en un recipiente adicional separado. El kit puede incluir además un impreso en el paquete que comprende instrucciones impresas que dirigen la utilización del tratamiento combinado como método para una enfermedad de cáncer que expresa CD20, preferentemente un linfoma no Hodgkin de células B (NHL).

15 La expresión “impresos dentro del paquete” se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y/o advertencias referentes a la utilización de dichos productos terapéuticos.

20 En una realización preferente, los recipientes del artículo fabricado pueden incluir además un portador farmacéuticamente aceptable. El artículo fabricado puede incluir además un diluyente estéril, que preferentemente se almacena en un recipiente adicional separado.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “portador farmacéuticamente aceptable” pretende incluir cualquiera y la totalidad de los materiales compatibles con la administración farmacéutica, incluyendo solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y otros materiales y compuestos compatibles con la administración farmacéutica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se encuentra contemplada la utilización del mismo en las composiciones de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos  
30 suplementarios en las composiciones.

#### Composiciones farmacéuticas:

35 Pueden obtenerse composiciones farmacéuticas mediante procesamiento del anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada y/o agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina según la presente invención con portadores inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Puede utilizarse lactosa, almidón de maíz o derivados de los mismos, talco, ácido esteárico o sales del mismo, y similares, a título de ejemplo de dichos portadores para tabletas, tabletas recubiertas, grageas y cápsulas de gelatina dura. Son portadores  
40 adecuados para las cápsulas de gelatina blanda, por ejemplo, los aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos y líquidos, y similares. Dependiendo de la naturaleza de la sustancia activa, sin embargo, ningún portador resulta habitualmente necesario en el caso de las cápsulas de gelatina blanda. Son portadores adecuados para la producción de soluciones y jarabes, por ejemplo, agua, polioles, glicerol, aceite vegetal y similares. Son portadores adecuados para los supositorios, por ejemplo, los aceites naturales o endurecidos, ceras, grasas, polioles  
45 semilíquidos o líquidos, y similares.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden contener, además, conservantes, solubilizadores, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, sales para modificar la presión osmótica, tampones, agentes enmascaradores o antioxidantes. También pueden contener todavía otras sustancias terapéuticamente valiosas.

55 Una realización de la invención es una composición farmacéutica que comprende tanto dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada y uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina, en particular para la utilización en cáncer que expresa CD20.

Dicha composición farmacéutica puede comprender además uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

60 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica, en particular para la utilización en el cáncer, que comprende: (i) una primera cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada e (ii) una segunda cantidad eficaz de uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina. Dicha composición opcionalmente comprende portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

65 Las composiciones farmacéuticas del anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada por sí solo utilizado según la presente invención se preparan para el

almacenamiento mediante la mezcla de un anticuerpo que presenta el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A., editor, 1980) en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los recipientes a las dosis y concentraciones utilizadas, 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 butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metilparabén o propilparabén, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, 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 EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína) y/o surfactantes no iónicos, tales como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> o polietilenglicol (PEG).

Las composiciones farmacéuticas de los agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina, dependen de sus propiedades farmacéuticas, por ejemplo para compuestos químicos pequeños, tales como, por ejemplo, bortezomib, una formulación podría ser, por ejemplo, la siguiente:

a) Formulación de tableta (granulación húmeda):

Ítem	Ingredientes	mg/tableta			
1.	Compuestos 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 preparación:

1. Mezcla de los ingredientes 1, 2, 3 y 4 y granulado con agua purificada.
2. Secado de los gránulos a 50°C.
3. Molido de los gránulos en un equipo de molido adecuado.
4. Adición del ingrediente 5 y mezcla durante tres minutos; compresión en una prensa adecuada.

b) Formulación de cápsula:

Ítem	Ingredientes	mg/cápsula			
1.	Compuestos 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 preparación:

1. Mezcla de los ingredientes 1, 2 y 3 en un mezclador adecuado durante 30 minutos.
2. Adición de los ítems 4 y 5 y mezcla durante 3 minutos.
3. Rellenado de una cápsula adecuada.

En una realización adicional de la invención, las composiciones farmacéuticas según la invención preferentemente son dos formulaciones separadas para dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada y para los agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina. Los ingredientes activos también pueden encapsularse en microcápsulas preparadas mediante, por ejemplo, técnicas de coacervado o mediante polimerización interracial, por ejemplo hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidal (por ejemplo liposomas, microesferas de albumina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A., editor, 1980.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el

anticuerpo, encontrándose las matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico), poliláctidos (patente US nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

Las formulaciones que deben utilizarse para la administración in vivo deben ser estériles. Lo anterior se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

La presente descripción da a conocer además un método para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar en el paciente que requiere dicho tratamiento: (i) una primera cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada e (ii) una segunda cantidad eficaz de uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina.

La presente descripción da a conocer además un método para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar en el paciente que requiere dicho tratamiento: (i) una primera cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada e (ii) una segunda cantidad eficaz de uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "paciente" preferentemente se refiere a un ser humano que necesita tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II (por ejemplo un paciente que padece un cáncer que expresa CD20) para cualquier fin, y más preferentemente un ser humano que necesita dicho tratamiento para tratar cáncer, o una condición o lesión precancerosa. Sin embargo, el término "paciente" también puede referirse a animales no humanos, preferentemente mamíferos, tales como perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos, entre otros.

La invención comprende además un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada para el tratamiento de cáncer que expresa CD20 en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina, caracterizado porque:

dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo B-Ly1 humanizado glucomanipulado en el que el anticuerpo B-Ly1 humanizado presenta una región variable de cadena pesada (VH) de SEC ID nº 7 y una región variable de cadena ligera (VL) de SEC ID nº 20 y el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 de tipo II se realiza en combinación:

- a) con ciclofosfamida y vincristina, o
- b) ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina.

La descripción da a conocer además un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada para el tratamiento de un paciente que sufre de cáncer que expresa CD20 en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina.

La invención comprende además un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada y uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina para la utilización en el tratamiento de cáncer que expresa CD20. La descripción da a conocer además un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada y uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina para la utilización en el tratamiento de un paciente que sufre de un cáncer que expresa CD20.

Preferentemente dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada es un anticuerpo B-Ly1 humanizado glucomanipulado. Preferentemente, dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma no Hodgkin de células B (NHL).

Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a comprender la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

#### Descripción del listado de secuencias:

- |             |   |
|-------------|---|
| SEC ID nº 1 | secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal anti-CD20 murino B-Ly1. |
| SEC ID nº 2 | secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo monoclonal anti-CD20 murino B-Ly1. |

- SEC ID nº 3-19 secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de los anticuerpos B-Ly1 humanizados (B-HH2 a B-HH9, B-HL8 y B-HL10 a B-HL17).
- SEC ID nº 20 secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo B-Ly1 humanizado B-KV1.

5

#### Descripción de las figuras:

- Figura 1 a) Actividad antitumoral sinérgica del tratamiento combinado de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada (B-HH6-B-KV1 GE) y ciclofosfamida y vincristina, y  
b) comparación con un tratamiento combinado de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I (rituximab) con ciclofosfamida y vincristina sobre linfoma no Hodgkin de células B humanas WSU-DLCL2 (NHL). Valores de la mediana del volumen tumoral [ $\text{mm}^3$ ] +/- IQR representado en el eje y; número de días tras la inyección de células tumorales representado en el eje x. Leyenda: A) Vehículo (*círculos*), B) ciclofosfamida (25 mg/kg) y vincristina (0,25 mg/kg) una vez a la semana (cruces), C) rituximab (30 mg/kg) una vez a la semana (*triángulos*), D) B-Ly1 humanizado glucomanipulado (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) una vez a la semana (*cuadrados*), E) rituximab (30 mg/kg) con ciclofosfamida (25 mg/kg) y vincristina (0,25 mg/kg), una vez a la semana (*rombos*) y F) B-Ly1 humanizado glucomanipulado (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) con ciclofosfamida (25 mg/kg) y vincristina (0,25 mg/kg), una vez a la semana (*signos de 'más'*).
- Figura 2 Intensidad media de fluorescencia (IMF, eje y izquierdo) de anticuerpo anti-CD20 de tipo I (Cy5-rituximab=columna blanca) y anticuerpo anti-CD20 de tipo II (Cy5-glucomanipulado, B-Ly1 humanizado B-HH6-B-KV1 GE=columna negra) en células Raji (ATCC nº CCL-86); proporción de capacidades de unión a CD20 de anticuerpo anti-CD20 de tipo I (rituximab) y de anticuerpo anti-CD20 de tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) en comparación con rituximab (representado a escala en el eje y derecho).
- Figura 3 a) Actividad antitumoral sinérgica del tratamiento combinado de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada (B-HH6-B-KV1 GE) y doxorubicina, y  
b) comparación con un tratamiento combinado de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I (rituximab) con doxorubicina sobre el linfoma no Hodgkin folicular humano (NHL) RL. Valores de la mediana del volumen tumoral [ $\text{mm}^3$ ] +/- IQR representado en el eje y; número de días tras la inyección de células tumorales representado en el eje x. Leyenda: A) Vehículo (*signos de 'más'*), B) doxorubicina (3 mg/kg) una vez a la semana (cruces), C) rituximab (30 mg/kg) una vez a la semana (*triángulos*), D) B-Ly1 humanizado glucomanipulado (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) una vez a la semana (*cuadrados*), E) rituximab (30 mg/kg) con doxorubicina (3 mg/kg), una vez a la semana (*rombos*) y F) B-Ly1 humanizado glucomanipulado (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) con doxorubicina (3 mg/kg), una vez a la semana (*círculos*).
- Figura 4 a) Actividad antitumoral sinérgica del tratamiento combinado de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada (B-HH6-B-KV1 GE) con ciclofosfamida, y  
b) comparación con un tratamiento combinado de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I (rituximab) con ciclofosfamida sobre el linfoma no Hodgkin folicular humano (NHL) RL. Valores de la mediana del volumen tumoral [ $\text{mm}^3$ ] +/- IQR representado en el eje y; número de días tras la inyección de células tumorales representado en el eje x. Leyenda: A) Vehículo (*círculos*), B) ciclofosfamida (50 mg/kg) una vez a la semana (cruces), C) rituximab (30 mg/kg) una vez a la semana (*triángulos*), D) B-Ly1 humanizado glucomanipulado (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) una vez a la semana (*cuadrados*), E) rituximab (30 mg/kg) con ciclofosfamida (50 mg/kg), una vez a la semana (*rombos*) y F) B-Ly1 humanizado glucomanipulado (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) con ciclofosfamida (50 mg/kg), una vez a la semana (*signos de 'más'*).

#### Procedimientos experimentales

##### Ejemplo 1

Actividad antitumoral sinérgica del tratamiento combinado de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada (B-HH6-B-KV1 GE) y ciclofosfamida y vincristina.

##### Agentes de ensayo:

Se proporcionó anticuerpo anti-CD20 de tipo II B-HH6-B-KV1 GE (=B-Ly1 humanizado glucomanipulado B-HH6-B-KV1, ver los documentos nº WO 2005/044859 y nº WO 2007/031875) a modo de solución madre (c=9,4 mg/ml) de GlycArt, Schlieren, Suiza. El tampón de anticuerpos incluía histidina, trehalosa y polisorbato 20. La solución de

65

anticuerpos se diluyó apropiadamente en PBS a partir de la solución madre para las inyecciones anteriormente indicadas.

Rituximab fue proporcionado por Hoffmann La Roche, Basel.

Se obtuvo ciclofosfamida y vincristina en forma de formulación clínica de Baxter Oncology GmbH, Halle, Alemania o medac, Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Hamburg, Alemania, respectivamente. Se ajustó la dilución a partir de solución madre reconstituida.

#### Líneas celulares y condiciones de cultivo:

Las células WSU-DLCL2 humanas de linfoma no Hodgkin (NHL) fueron obtenidas de Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, NJ, USA. La línea celular tumoral se cultivó rutinariamente en medio RPMI (PAA Laboratories, Austria) complementado con suero de feto bovino al 10% (PAA Laboratories, Austria) y L-glutamina 2 mM a 37°C en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO<sub>2</sub>. Se utilizó el pase 4 para el trasplante. Las células se coinyectaron con Matrigel.

#### Animales:

Los ratones SCID beige hembra; de 7 a 8 semanas de edad a la llegada (adquiridos de Charles River, Sulzfeld, Alemania) se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad de acuerdo con directrices acordadas (GV-Solas, Felasa, TierschG). El protocolo del estudio experimental fue revisado y autorizado por el gobierno local. Tras la llegada, los animales se mantuvieron en la parte de cuarentena de las instalaciones para los animales durante una semana para que se aclimasen al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento continuo de su salud de manera periódica. Se proporcionó alimentación dietética (Provimi Kliba 3337) y agua (acidificada a pH 2,5 a 3) *ad libitum*.

#### Seguimiento:

Los animales se controlaron diariamente para síntomas clínicos y la detección de efectos adversos. Para el seguimiento durante la totalidad del experimento, se documentó el peso corporal de los animales dos veces a la semana y se midió el volumen tumoral con un calibrador tras la clasificación del estadio del tumor.

#### Tratamiento de los animales:

El tratamiento animal se inició el día de aleatorización 9 días después del trasplante celular. Se administró anticuerpo anti-CD20 de tipo II humanizado glucomanipulado B-HH6-B-KV1 GE o rituximab en forma de agentes individuales i.p. q7d los días de estudio 9, 15, 23, 30, 37, 44, 51 y 58 a la dosis indicada de 30 mg/kg. El vehículo correspondiente se administró los mismos días. Se administró i.v. ciclofosfamida y vincristina una vez a la semana los días 9, 15, 23, 30, 37, 44, 51 y 58 a dosis de 25 mg/kg o 0,25 mg/kg, respectivamente. En los grupos de terapia de combinación, se administraron ambos anticuerpos 24 horas después de los agentes quimioterapéuticos, los días 10, 16, 24, 31, 38, 45, 52 y 59.

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

El día 35 después del trasplante celular, se produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral, de 73%, 85%, 66%, 94% o 90%, en los animales que recibieron rituximab, el anticuerpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE, quimioterapia, combinación de quimioterapia y anticuerpo anti-CD20 o la combinación de quimioterapia y rituximab, respectivamente, en comparación con el grupo de control. Al final del experimento, se observó una inhibición significativamente superior del crecimiento tumoral en el grupo de combinación de quimioterapia/anticuerpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE comparado con el grupo de combinación de quimioterapia/rituximab.

El efecto de los diferentes tratamientos hasta el final del estudio el día 64 después del trasplante celular se demostró con el valor de retardo del crecimiento tumoral (T-C, en el que T es la mediana del tiempo en días necesario para que los tumores del grupo de tratamiento alcancen un tamaño predeterminado de 1.500 mm<sup>3</sup>, y C es la mediana del tiempo en días para que los tumores del grupo de control alcancen el mismo tamaño). Se muestran los resultados en la tabla a continuación:

Tabla 3:

Retardo del crecimiento tumoral de los grupos de tratamiento en comparación con el grupo de control, en días		
Grupo	Compuesto (dosis)	Valor T-C (días)
2	Rituximab (30 mg/kg)	13
3	Anticuerpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE (30 mg/kg)	19
4	Ciclofosfamida (25 mg/kg)	14

	Vincristina (0,25 mg/kg)	
5	Ciclofosfamida (25 mg/kg)Vincristina (0,25 mg/kg)Anticuerpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE (30 mg/kg)	38
6	Ciclofosfamida (25 mg/kg) Vincristina (0,25 mg/kg)Rituximab (30 mg/kg)	28

Ejemplo 2

5 Determinación de la proporción de capacidades de unión a CD20 sobre células Raji (ATCC nº CCL-86) del anticuerpo anti-CD20 de tipo II en comparación con el rituximab

10 Se mantuvieron células Raji (ATCC nº CCL-86) en cultivo en medio RPMI-1640 (PanBiotech GmbH, nº de cat. PO4-18500) que contenía FCS al 10% (Gibco, nº de cat. 10500-064). El anticuerpo anti-CD20 de tipo II B-HH6-B-KV1 GE (anticuerpo B-Ly1 humanizado glucomanipulado) y rituximab se marcaron utilizando éster de mono-NHS Cy5 (Amersham GE Healthcare, nº de catálogo PA15101) siguiendo las instrucciones del fabricante. El rituximab conjugado con Cy5 presentaba una proporción de marcaje de 2,0 moléculas de Cy5 por cada una de anticuerpo. B-HH6-B-KV1 conjugado con Cy5 presentaba una proporción de marcaje de 2,2 moléculas de Cy5 por cada una de anticuerpo. Con el fin de determinar y comparar las capacidades y modo de unión de ambos anticuerpos, se generaron curvas de unión (mediante titulación de rituximab conjugado con Cy5 y B-HH6-B-KV1 GE conjugado con Cy5) mediante inmunofluorescencia directa utilizando la línea celular Raji de linfoma de Burkitt (ATCC nº CCL-86). Se analizaron las intensidades medias de fluorescencia (IMF) como EC50 (50% de la intensidad máxima) para rituximab conjugado con Cy5 y B-HH6-B-KV1 GE conjugado con Cy5, respectivamente. Se tiñeron  $5 \times 10^5$  células por cada muestra durante 30 min. a 4°C. Después las células se lavaron en medio de cultivo. Se utilizó la tinción de yoduro de propidio (YP) para excluir las células muertas. Se realizaron las mediciones utilizando el instrumento FACSArray (Becton Dickinson), se midió el yoduro de propidio (YP) en rojo lejano A y Cy5 en el rojo A. La figura 2 muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) para la unión en el EC50 (50% de la intensidad máxima) de B-HH6-B-KV1 GE marcado con Cy5 (columna negra) y rituximab marcado con Cy5 (columna blanca).

25 A continuación, se calculó la proporción de capacidades de unión a CD20 sobre células Raji (ATCC nº CCL-86) siguiendo la fórmula siguiente:

Proporción de capacidades de unión a CD20 sobre células Raji (ATCC nº CCL-86)=

$$\frac{\text{IMF}(\text{Cy5-anticuerpo anti-CD20})}{\text{IMF}(\text{Cy5-rituximab})} \times \frac{\text{Proporción marcaje Cy5}(\text{Cy5-rituximab})}{\text{proporción de marcaje Cy5}(\text{Cy5-anticuerpo anti-CD20})}$$

$$= \frac{\text{IMF}(\text{B-HH6-B-KV1})}{\text{IMF}(\text{Cy5-rituximab})} \times \frac{\text{Proporción marcaje Cy5}(\text{Cy5-rituximab})}{\text{Proporción marcaje Cy5}(\text{B-HH6-B-KV1})}$$

$$= \frac{207}{433} \times \frac{2,2}{2,0} = 0,44$$

30 De esta manera, B-HH6-B-KV1 GE como anticuerpo anti-CD20 de tipo II típico muestra la capacidad de unión reducida en comparación con el rituximab.

Ejemplo 3

35 Actividad antitumoral del tratamiento combinado de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada (B-HH6-B-KV1 GE) y doxorubicina.

Agentes de ensayo:

40 Se proporcionó anticuerpo anti-CD20 de tipo II B-HH6-B-KV1 GE (=B-Ly1 humanizado glucomanipulado B-HH6-B-KV1, ver los documentos nº WO 2005/044859 y nº WO 2007/031875) a modo de solución madre (c=9,4 mg/ml) de GlycArt, Schlieren, Suiza. El tampón de anticuerpos incluía histidina, trehalosa y polisorbato 20. La solución de anticuerpos se diluyó apropiadamente en PBS a partir de la solución madre para las inyecciones anteriormente indicadas.

El rituximab fue proporcionado por Hoffmann La Roche, Basel.

5 La doxorubicina se obtuvo en forma de formulación clínica de Hexal, Holzkirchen, Alemania. Se ajustó la dilución a partir de solución madre reconstituida.

Líneas celulares y condiciones de cultivo:

10 Las células de linfoma no Hodgkin folicular humano RL fueron proporcionadas por el Dr. Charles Dumontet, INSERM 590, Lyon, Francia. La línea celular tumoral se cultivó rutinariamente en medio RPMI (PAA Laboratories, Austria) complementado con suero de feto bovino al 10% (PAA Laboratories, Austria) y L-glutamina 2 mM a 37°C en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO<sub>2</sub>. Se utilizó el pase 2 para el trasplante.

Animales:

15 Los ratones SCID beige hembra; de 7 a 8 semanas de edad a la llegada (adquiridos de Charles River, Sulzfeld, Alemania) se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad de acuerdo con directrices acordadas (GV-Solas, Felasa, TierschG). El protocolo del estudio experimental fue revisado y autorizado por el gobierno local. Tras la llegada, los animales se mantuvieron en la parte de cuarentena de las instalaciones para los animales durante una semana para que se aclimasen al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento continuo de su salud de manera periódica. Se proporcionó alimentación dietética (Provimi Kliba 3337) y agua (acidificada a pH 2,5 a 3) *ad libitum*.

Seguimiento:

25 Los animales se controlaron diariamente para síntomas clínicos y la detección de efectos adversos. Para el seguimiento durante la totalidad del experimento, se documentó el peso corporal de los animales dos veces a la semana y se midió el volumen tumoral con un calibrador tras la clasificación del estadio del tumor.

Tratamiento de los animales:

30 El tratamiento animal se inició el día de aleatorización 14 días después del trasplante celular. Se administró anticuerpo anti-CD20 de tipo II humanizado glucomanipulado B-HH6-B-KV1 GE o rituximab en forma de agentes individuales, i.v. q7d los días de estudio 14, 21, 28, 36 y 42, a la dosis indicada de 30 mg/kg o 60 mg/kg. Se administró el vehículo correspondiente los mismos días, así como doxorubicina i.v. una vez a la semana a una dosis de 3 mg/kg. En los grupos de terapia de combinación, se administró doxorubicina i.v. una vez a la semana los días 15, 22, 29, 37 y 43 a una dosis de 3 mg/kg y rituximab se administró i.v. una vez a la semana los mismos días a una dosis de 30 mg/kg en el grupo de terapia de combinación.

Ejemplo 4

Actividad antitumoral del tratamiento combinado de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) y ciclofosfamida en la línea celular RL.

Agentes de ensayo:

45 Se proporcionó anticuerpo anti-CD20 de tipo II B-HH6-B-KV1 GE (=B-Ly1 humanizado glucomanipulado B-HH6-B-KV1, ver los documentos nº WO 2005/044859 y nº WO 2007/031875) a modo de solución madre (c=9,4 mg/ml) de GlycArt, Schlieren, Suiza. El tampón de anticuerpos incluía histidina, trehalosa y polisorbato 20. La solución de anticuerpos se diluyó apropiadamente en PBS a partir de la solución madre para las inyecciones anteriormente indicadas.

50 El rituximab, anticuerpo anti-CD20 de tipo I, en forma de solución madre (c=10 mg/ml) fue proporcionado por Hoffmann La Roche, Basel, Suiza. El tampón contenía polisorbato 80, cloruro sódico y citrato sódico.

55 Se obtuvo ciclofosfamida en forma de formulación clínica de Baxter Oncology GmbH, Halle, Alemania o medac, Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Hamburg, Alemania, respectivamente. Se ajustó la dilución a partir de solución madre reconstituida.

Líneas celulares y condiciones de cultivo:

60 La línea celular de linfoma no Hodgkin folicular humano RL se cultivó rutinariamente en medio RPMI 1640 complementado con suero de feto bovino al 10% y antibiótico. Las células RL se cultivaron en suspensión y formaron agregados. Las células en crecimiento exponencial se inyectaron por vía subcutánea en ratones SCID.

65

Animales:

Los animales utilizados eran ratones SCID hembra de 6 semanas de edad proporcionados por Charles River (L'Arbresle, Francia) con estatus IPSOS. Los animales se alojaron durante por lo menos una semana antes de la inyección de células RL. Las jaulas contenían 5 animales.

Seguimiento:

Los animales se controlaron diariamente para síntomas clínicos y la detección de efectos adversos. Para el seguimiento durante la totalidad del experimento, se documentó el peso corporal de los animales dos veces a la semana y se midió el volumen tumoral con un calibrador tras la clasificación del estadio del tumor. Los criterios de exclusión del estudio de los animales fueron descritos y aprobados por el Comité local de experimentación animal.

Tratamiento de los animales:

El tratamiento se inició 31 días después del trasplante celular en la aleatorización. Se proporcionó i.v. una vez a la semana a los animales anticuerpo anti-CD20 de tipo II humanizado B-HH6-B-KV1-GE, vehículo o rituximab a una dosis de 30 mg/kg (días 31, 38, 45 y 52). Se inyectó ciclofosfamida los mismos días a una dosis de 50 mg/kg. Se prepararon diluciones del anticuerpo frescas a partir de la solución madre antes de la utilización.

Estudio de inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral:

El día 66 después del trasplante celular, se produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral, de 54%, 85% o 91%, en los animales que recibieron las combinaciones de rituximab y ciclofosfamida, anticuerpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE y rituximab o anticuerpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE y ciclofosfamida. De esta manera, el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE y ciclofosfamida rindió la mejor actividad antitumoral en comparación con el tratamiento con ciclofosfamida por sí sola.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Terapia de combinación de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada

<130> 24858

<150> 08005554.4

<151> 2008-03-25

<150> 08007172.3

<151> 2008-04-11

<160> 20

<170> Patent In versión 3.2

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

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

ES 2 592 312 T3

<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

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

<210> 2

5 <211> 103

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

10 <221> MISC\_FEATURE

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

<400> 2

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

15



# ES 2 592 312 T3

<400> 4

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

<210> 5

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH4)



ES 2 592 312 T3

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 7

- 5 <211> 119
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>

- 10 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH6)

<400> 7

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

- 15 <210> 8
- <211> 119

# ES 2 592 312 T3

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

5 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del 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

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

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

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

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

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

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

10

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

15

<220>

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

# ES 2 592 312 T3

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 10

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH9)

ES 2 592 312 T3

<400> 10

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

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL8)

<400> 11

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

15

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

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

# ES 2 592 312 T3

<400> 12

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

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

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL11)

# ES 2 592 312 T3

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 14

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL12)

ES 2 592 312 T3

<400> 14

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

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL13)

<400> 15

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

15 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

<210> 16

<211> 119

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

ES 2 592 312 T3

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

<400> 16

5

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

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL15)

# ES 2 592 312 T3

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 18

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del 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

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

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

25 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL17)

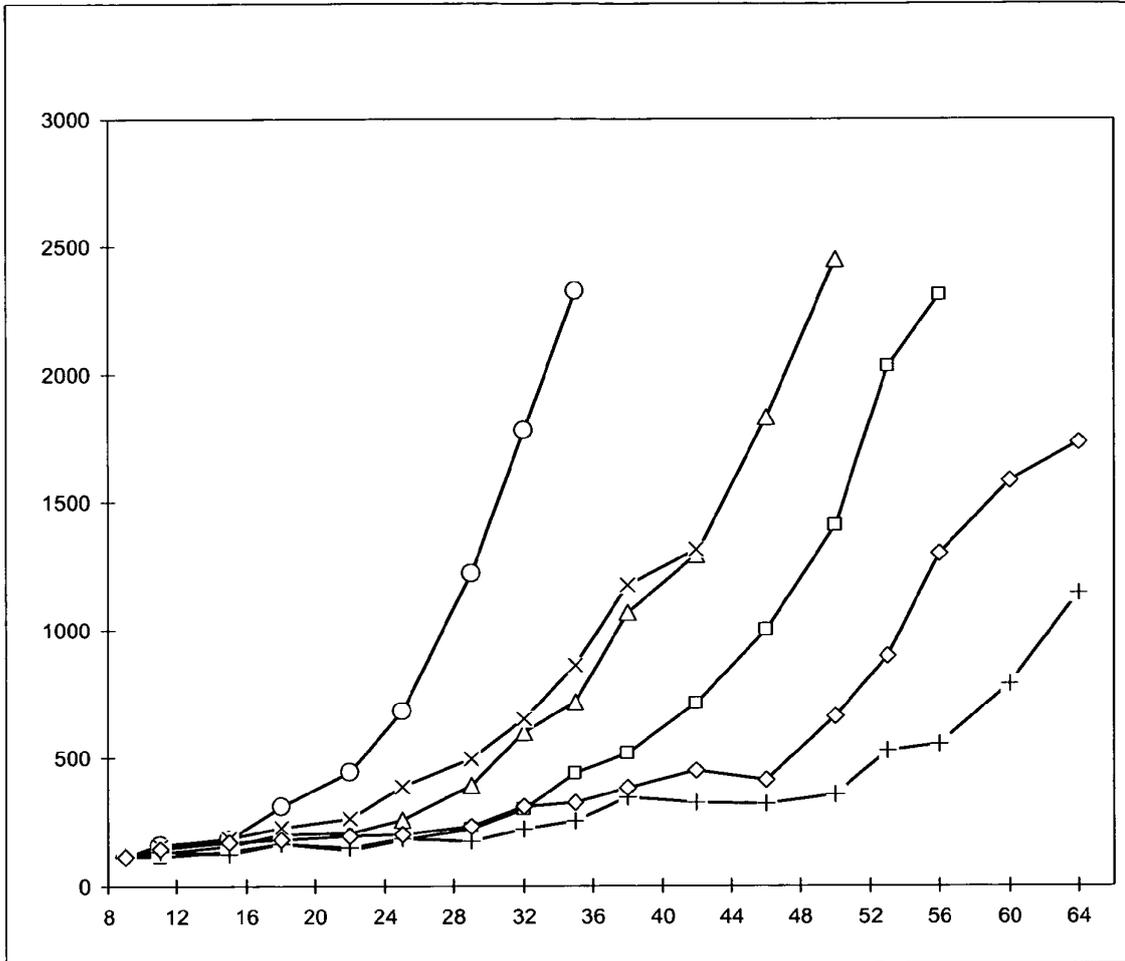
<400> 19



**REIVINDICACIONES**

1. Utilización de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de cáncer que expresa CD20 en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina, caracterizado porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo B-Ly1 humanizado glucomanipulado en el que el anticuerpo B-Ly1 humanizado presenta la región variable de cadena pesada (VH) de SEC ID nº 7 y una región variable de la cadena ligera (VL) de SEC ID nº 20 y el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 de tipo II se realiza en combinación
- 5
- 10       a) con ciclofosfamida y vincristina, o  
          b) ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina.
2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma no Hodgkin de células B (NHL).
- 15
3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada porque se administra un corticoesteroide adicional.
4. Anticuerpo anti-CD20 de tipo II con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada para la utilización en el tratamiento de un paciente que sufre de un cáncer que expresa CD20 en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados de entre el grupo que consiste de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina, caracterizado porque dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo B-Ly1 humanizado glucomanipulado en el que el anticuerpo B-Ly1 humanizado presenta la región variable de cadena pesada (VH) de SEC ID nº 7 y una región variable de la cadena ligera (VL) de SEC ID nº 20 y el tratamiento con el anticuerpo anti-
- 20
- 25       CD20 de tipo II se realiza en combinación  
          a) con ciclofosfamida y vincristina, o  
          b) ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina.
5. Utilización según la reivindicación 4, caracterizada porque dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma no Hodgkin de células B (NHL).
- 30
6. Anticuerpo anti-CD20 de tipo II según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, caracterizado porque se administra un corticoesteroide adicional.

**Fig. 1**



**Fig. 2**

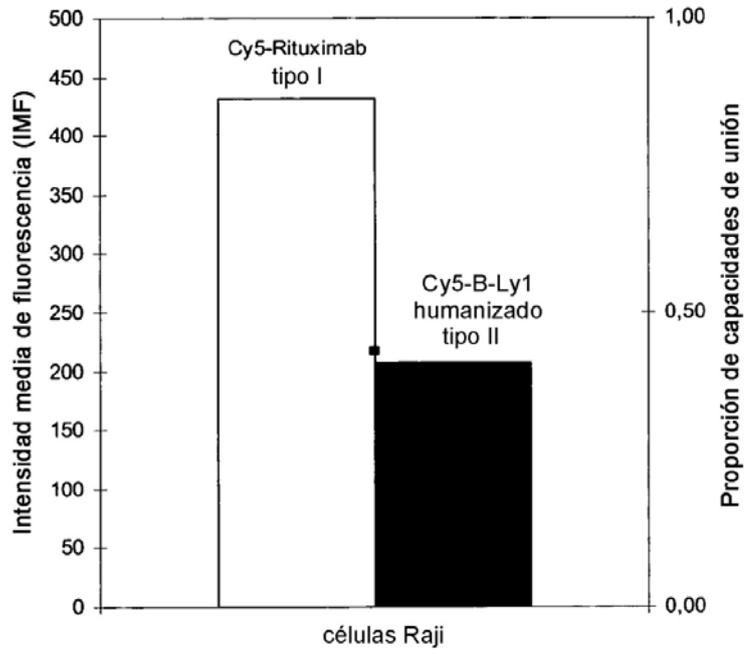


Fig. 3

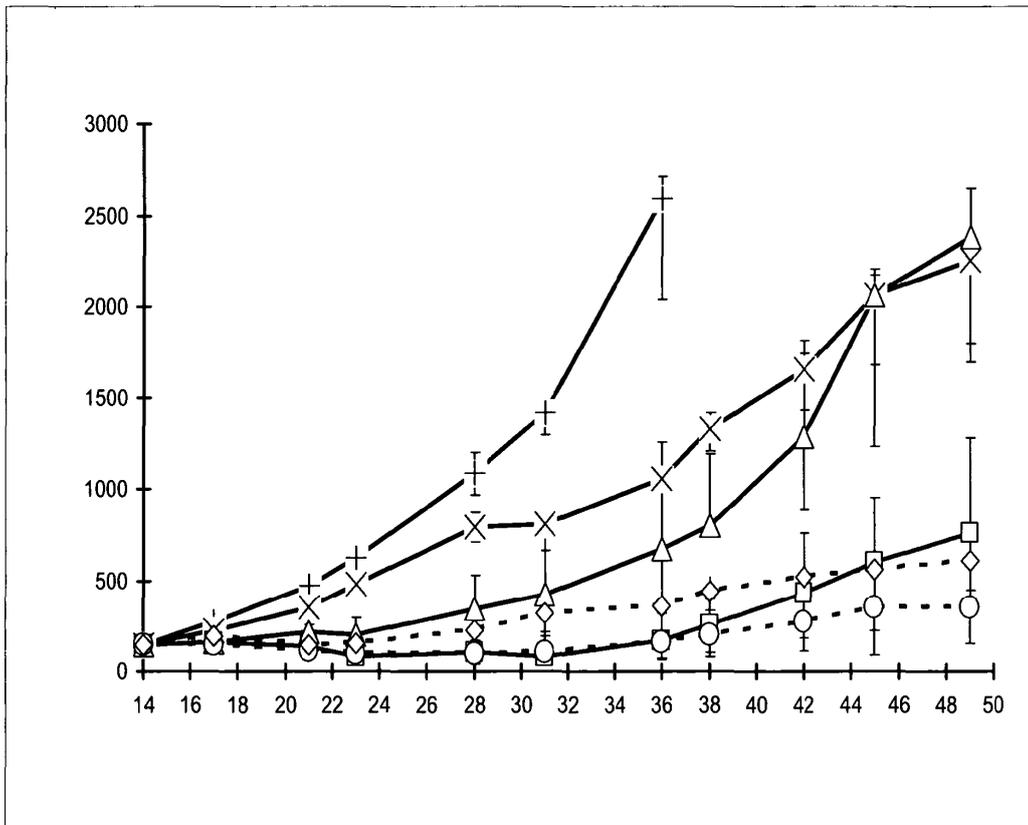


Fig. 4

