

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 158**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 31/4184** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2010 PCT/EP2010/004939**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.02.2011 WO11018224**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2010 E 10747168 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2464382**

54 Título: **Terapia combinada de un anticuerpo CD20 afucosilado con bendamustina**

30 Prioridad:

**14.08.2009 EP 09010489**

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

**18.08.2017**

73 Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)  
Wagistrasse 18  
8952 Schlieren-Zuerich, CH**

72 Inventor/es:

**HERTING, FRANK y  
KLEIN, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 630 158 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Terapia combinada de un anticuerpo CD20 afucosilado con bendamustina

5 La presente invención está dirigida a la terapia combinada de un anticuerpo CD20 afucosilado con bendamustina para el tratamiento del cáncer.

**Antecedentes de la invención**

10 **Anticuerpos afucosilados**

Las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales se pueden potenciar mediante ingeniería genética de su componente oligosacárido, como se describe en Umaña, P. et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; y el documento US 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos más utilizados en la inmunoterapia contra el cáncer, son glicoproteínas que tienen un sitio de glicosilación unido por enlaces N conservado, en el Asn297 de cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos complejos biantenarios unidos a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico y su presencia es esencial para que el anticuerpo pueda mediar en funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely, M.R. et al., Glycobiology 5 (1995) 813-822; Jefferis, R. et al., Immunol. Rev. 163 (1998) 59-76; Wright, A. y Morrison, S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32). Umaña, P. et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 y el documento WO 99/154342 mostraron que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III («GnTIII»), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados, aumenta significativamente la actividad ADCC *in vitro* de los anticuerpos. Las alteraciones en la composición del carbohidrato N297 o su eliminación afectan también la unión a Fc que se une a Fc $\gamma$ R y C1q (Umaña, P. et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; Davies, J. et al., Biotechnol. Bioeng. 74 (2001) 288-294; Mimura, Y. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 45539-45547; Radaev, S. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 16478-16483; Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 277 (2002) 26733-26740; Simmons, L.C. et al., J. Immunol. Methods 263 (2002) 133-147).

30 Se ha informado de estudios que analizan las actividades de los anticuerpos afucosilados y fucosilados, incluyendo anticuerpos anti-CD20, (por ejemplo, lida, S. et al., Clin. Cancer Res. 12 (2006) 2879-2887; Natsume, A. et al., J. Immunol. Methods 306 (2005) 93-103; Satoh, M. et al., Expert Opin. Biol. Ther. 6 (2006) 1161-1173; Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2004) 680-688; Davies, J. et al., Biotechnol. Bioeng. 74 (2001) 288-294.

35 **Anticuerpos CD20 y anti-CD20**

La molécula CD20 (también llamada antígeno de diferenciación restringido a los linfocitos B o Bp35) es una proteína transmembrana hidrófoba localizada en linfocitos pre-B y linfocitos B maduros que se ha descrito extensamente (Valentine, M.A. et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 11282-11287; Einfeld, D.A. et al., EMBO J. 7 (1988) 711-717; Tedder, T.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (1988) 208-12; Stamenkovic, I. et al., J. Exp. Med. 167 (1988) 1975-80; Tedder, T.F. et al., J. Immunol. 142 (1989) 2560-8). CD20 se expresa en más del 90 % de los linfomas no Hodgkin (LNH) de linfocitos B (Anderson, K.C. et al., Blood 63 (1984) 1424-1433), pero no se encuentra en células madre hematopoyéticas, linfocitos pro-B, células plasmáticas normales u otros tejidos normales (Tedder, T.F. et al., J. Immunol. 135(2) (1985) 973-979).

45 Existen dos tipos diferentes de anticuerpos anti-CD20 que difieren significativamente en su modo de unión a CD20 y actividades biológicas (Cragg, M.S. et al., Blood 103 (2004) 2738-2743; y Cragg, M.S. et al., Blood 101 (2003) 1045-1051). Los anticuerpos de tipo I, como por ejemplo rituximab, son potentes en cuanto a citotoxicidad mediada por complemento, mientras que los anticuerpos de tipo II, como por ejemplo tositumomab (B1), 11B8, AT80 o anticuerpos B-Ly1 humanizados, inician eficazmente la muerte de las células diana mediante apoptosis independiente de caspasas con exposición concomitante a fosfatidilserina.

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

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

<b>Anticuerpos anti-CD20 de tipo I</b>	<b>Anticuerpos anti-CD20 de tipo II</b>
epítipo CD20 de tipo I	epítipo CD20 de tipo II
localizan la CD20 en balsas lípidas	no localizan la CD20 en balsas lípidas
CDC aumentada (si es isotipo IgG1)	CDC reducida (si es isotipo IgG1)
actividad de ADCC (si es isotipo IgG1)	actividad de ADCC (si es isotipo IgG1)
plena capacidad de unión	capacidad reducida de unión
agregación homotípica	agregación homotípica más fuerte

inducción de apoptosis después de unión cruzada	fuerte inducción de muerte celular sin unión cruzada
---	--

El documento WO 2009/053038 se refiere a la terapia combinada de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II con un inhibidor de proteasoma.

## 5 **Bendamustina**

La bendamustina (nombres comerciales Ribomustin y Treanda; también conocida como SDX-105) es una mostaza nitrogenada usada en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC) (Kath, R. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 127 (2001) 48-54) y linfoma no Hodgkin (LNH). Pertenece a la familia de fármacos llamados agentes alquilantes. También se está estudiando para el tratamiento del sarcoma (Bagchi, S., Lancet Oncol. 8 (2007) 674).

La bendamustina se ha usado como un agente terapéutico con otros agentes diferentes, incluyendo rituximab (Cheson, B.D. et al., J Clin Oncol. 27(9) 2009 1492-501; Knauf, W., Expert Rev Anticancer Ther. (2) 9 (2009) 165-74; Plosker, G.L. et al., Drugs. 68(18) (2008) 2645-60).

## 15 **Resumen de la invención**

Sorprendentemente, hemos descubierto ahora que la combinación de bendamustina con un anticuerpo anti-CD20 afucosilado, en la que dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 20, mostró efectos antiproliferativos sinérgicos (por ejemplo, incluso más que aditivos) en comparación con la combinación con el anticuerpo CD20 no afucosilado rituximab.

La invención comprende el uso de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa CD20 en combinación con bendamustina.

Otro aspecto de la invención es dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297, para uso en el tratamiento de un cáncer que expresa CD20 en combinación con bendamustina.

En un modo de realización, la cantidad de fucosa es entre un 40 % y un 60 % de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297.

35 En otro modo de realización, la cantidad de fucosa es un 0 % de la cantidad total de oligosacáridos en Asn297.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo IgG1.

40 En otro modo de realización, dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B.

En un modo de realización, el anticuerpo B-Ly1 humanizado se administra en una dosis de 800 a 1200 mg el día 1, 8 y 15 de un ciclo de dosificación de 6 semanas y luego en una dosis de 800 a 1200 mg el día 1 de hasta cinco ciclos de dosificación de 4 semanas, y la bendamustina se administra en una dosis de 80 mg/m<sup>2</sup> a 110 mg/m<sup>2</sup> el día 1 y 2 de hasta seis ciclos de dosificación de 4 semanas.

45 También se divulga una composición que comprende un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos y bendamustina para el tratamiento del cáncer.

## 50 **Descripción detallada de la invención**

La invención comprende el uso de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado de isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente de isotipo IgG1) con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297, en la que dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 20, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa CD20 en combinación con bendamustina. En un modo de realización, el anticuerpo anti-CD20 afucosilado se une a CD20 con una K<sub>D</sub> de 10<sup>-9</sup> M a 10<sup>-13</sup> mol/l.

60 En un modo de realización, la cantidad de fucosa es entre un 40 % y un 60 % de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297.

El término «anticuerpo» abarca las diversas formas de anticuerpos que incluyen pero no se limitan a anticuerpos completos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos genéticamente modificados tales como anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos o anticuerpos recombinantes, así como fragmentos de dichos

anticuerpos, siempre y cuando se conserven las propiedades características de acuerdo con la invención. Los términos «anticuerpo monoclonal» o «composición de anticuerpo monoclonal» como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición de aminoácidos. Por consiguiente, el término «anticuerpo monoclonal humano» se refiere a anticuerpos que poseen una sola especificidad de unión, que tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En un modo de realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana, fusionados en una célula inmortalizada.

El término «anticuerpo quimérico» se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de una fuente o especie y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, que se prepara habitualmente por técnicas de ADN recombinante. Son especialmente preferentes los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana. Dichos anticuerpos quiméricos murino/humanos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina murina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de «anticuerpos quiméricos» abarcados por la presente invención son aquellas en las que la clase o subclase se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original. Dichos anticuerpos «quiméricos» se denominan también «anticuerpos de clase cambiada». Los procedimientos de obtención de anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección génica, que son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; documentos US 5.202.238 y US 5.204.244.

El término «anticuerpo humanizado» se refiere a anticuerpos en los que las regiones marco o «regiones determinantes de complementariedad» (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente con respecto a la de la inmunoglobulina original. En un modo de realización preferente, una CDR murina se injerta en la región marco de un anticuerpo humano para obtener el «anticuerpo humanizado». Véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al., Nature 332 (1988) 323-327 y Neuberger, M.S. et al., Nature 314 (1985) 268-270.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término «anticuerpo humano» incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374). Basándose en dicha tecnología se pueden producir anticuerpos humanos contra una gran variedad de dianas. Se describen ejemplos de anticuerpos humanos, por ejemplo, en Kellermann, S.A. et al., Curr Opin Biotechnol. 13 (2002) 593-597.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término «anticuerpo humano recombinante» incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos aislados de una célula hospedadora tal como una célula NS0 o CHO o de un animal (por ejemplo, un ratón), que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados empleando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana en forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención se han sometido a una hipermutación somática *in vivo*. Por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de las secuencias VH y VL de la línea germinal humana y guardan relación con ellas, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término «unión» o «unión específica» se refiere a la unión del anticuerpo a un epítipo del antígeno tumoral en un ensayo *in vitro*, preferentemente en un ensayo de resonancia plasmónica (BIAcore, GE Healthcare Uppsala, Suecia) con antígeno de tipo natural purificado. La afinidad de la unión se define por los términos  $k_a$  (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno),  $k_D$  (constante de disociación) y  $K_D$  ( $k_D/k_a$ ). La unión o unión específica significa una afinidad de unión ( $K_D$ ) de  $10^{-8}$  mol/l o menos, preferentemente  $10^{-9}$  M a  $10^{-13}$  mol/l. Por tanto, un anticuerpo afucosilado de acuerdo con la invención se une específicamente al antígeno tumoral con una afinidad de unión ( $K_D$ ) de  $10^{-8}$  mol/l o menos, preferentemente de  $10^{-9}$  M a  $10^{-13}$  mol/l.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término «molécula de ácido nucleico» incluya moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es un ADN bicatenario.

Los «dominios constantes» no intervienen directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero intervienen en las funciones efectoras (ADCC, unión a complemento y CDC).

La «región variable» (región variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)), tal

como se emplea en el presente documento, indica cualquier par de cadenas ligera y pesada que interviene directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de cadenas ligeras y pesadas humanas variables tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres «regiones hipervariables» (o regiones determinantes de la complementariedad, CDR). Las regiones marco adoptan una conformación de lámina  $\beta$  y las CDR pueden formar bucles que conectan con la estructura de lámina  $\beta$ . Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por regiones marco y, junto con las CDR de la otra cadena, forman el sitio de unión a antígeno.

Los términos «región hipervariable» o «porción de unión a antígeno de un anticuerpo», cuando se usan en el presente documento, se refieren a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son los responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácido de las «regiones determinantes de complementariedad» o «CDR». Las regiones «marco» o «FR» son aquellas regiones de dominio variable distintas de los residuos de región hipervariable, tal como se definen en el presente documento. Por consiguiente, las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden, del extremo N al extremo C, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. En especial, la CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión al antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición estándar de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un «bucle hipervariable».

La bendamustina es el ácido 4-[5-[bis(2-cloroetil)amino]-1-metilbencimidazol-2-il]butanoico. Los nombres comerciales son Ribomustin y Treanda; la bendamustina también se conoce como SDX-105). La bendamustina es una mostaza nitrogenada utilizada en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC) (Kath, R. et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127 (2001) 48-54) y linfoma no Hodgkin (LNH). Pertenece a la familia de fármacos llamados agentes alquilantes. También se está estudiando para el tratamiento del sarcoma (Bagchi, S., *Lancet Oncol.* 8 (2007) 674).

El término «anticuerpo afucosilado» se refiere a un anticuerpo de isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente de isotipo IgG1) con un patrón alterado de glicosilación en la región Fc en Asn297 que tiene un nivel reducido de residuos de fucosa. La glicosilación de IgG1 o IgG3 humana se produce en Asn297 como glicosilación con oligosacáridos complejos biantenarios fucosilados básicos terminada con hasta 2 residuos Gal. Estas estructuras se designan como residuos glicano G0, G1 ( $\alpha$ 1,6 o  $\alpha$ 1,3) o G2, dependiendo de la cantidad de residuos terminales de Gal (Raju, T.S., *BioProcess Int.* 1 (2003) 44-53). La glicosilación del tipo CHO de partes Fc del anticuerpo se describe, por ejemplo, en Routier, FH, *Glycoconjugate J.* 14 (1997) 201-207. Los anticuerpos que se expresan de forma recombinante en células hospedadoras CHO no glicomodificadas suelen estar fucosilados en Asn297 en una cantidad de al menos un 85 %. Se debe entender que el término «un anticuerpo afucosilado», tal como se usa en el presente documento, incluye un anticuerpo que no tiene fucosa en su patrón de glicosilación. Es comúnmente conocido que la posición típica de un residuo glicosilado en un anticuerpo es la asparagina en la posición 297, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE («Asn297»).

El «sistema de numeración de la UE» o «índice UE» se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice UE del que se informa en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) se incorpora expresamente en el presente documento como referencia).

Por tanto, un anticuerpo afucosilado de acuerdo con la invención significa un anticuerpo de isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente de isotipo IgG1) en el que la cantidad de fucosa es un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297 (lo que significa que al menos un 40 % o más de los oligosacáridos de la región Fc en Asn297 están afucosilados). En un modo de realización, la cantidad de fucosa es entre un 40 % y un 60 % de los oligosacáridos de la región Fc en Asn297. En otro modo de realización, la cantidad de fucosa es un 50 % o menos y, en otro modo de realización más, la cantidad de fucosa es un 30 % o menos de los oligosacáridos de la región Fc en Asn297. En un modo de realización alternativo, la cantidad de fucosa es un 0 % de los oligosacáridos de la región Fc en Asn297. De acuerdo con la invención, «cantidad de fucosa» significa la cantidad de dicho oligosacárido (fucosa) en la cadena de oligosacárido (azúcar) en Asn297, con respecto a la suma de todos los oligosacáridos (azúcares) unidos a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) medida por espectrometría de masas MALDI-TOF y calculada como valor promedio (un procedimiento detallado para determinar la cantidad de fucosa se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/077546). Además, en un modo de realización, los oligosacáridos de la región Fc están bisectados. El anticuerpo afucosilado de acuerdo con la invención se puede expresar en una célula hospedadora glicomodificada diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII en una cantidad suficiente para fucosilar parcialmente los oligosacáridos en la región Fc. En un modo de realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión. Alternativamente, la actividad  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa de la célula hospedadora se puede reducir o eliminar de acuerdo con el documento US 6.946.292 para generar células hospedadoras glicomodificadas. La cantidad de fucosilación del anticuerpo se puede predeterminar, por ejemplo, mediante condiciones de fermentación (por ejemplo, tiempo de fermentación) o mediante combinación de al menos dos anticuerpos con una cantidad de fucosilación diferente. Dichos anticuerpos afucosilados y los respectivos procedimientos de glicoingeniería se describen en los documentos WO 2005/044859, WO 2004/065540,

WO 2007/031875, Umaña, P. et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180, WO 99/154342, WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 97/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835, WO 2000/061739. Estos anticuerpos modificados por glicoingeniería tienen una ADCC aumentada. Otros procedimientos de glicoingeniería que producen anticuerpos afucosilados de acuerdo con la invención se describen, por ejemplo, en Niwa, R. et al., J. Immunol. Methods 306 (2005) 151-160; Shinkawa, T. et al., J. Biol. Chem, 278 (2003) 3466-3473; WO 03/055993 o US 2005/0249722.

Por lo tanto, un aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado de isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente de isotipo IgG1) que se une específicamente a CD20 con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297, comprendiendo dicho anticuerpo una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 20, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con bendamustina. En un modo de realización, la cantidad de fucosa es entre un 40 % y un 60 % de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297.

CD20 (también conocido como antígeno CD20 de linfocitos B, antígeno de superficie B1, Leu-16, Bp35, BM5 y LF5 de linfocitos B; la secuencia se caracteriza en la entrada P11836 de la base de datos SwissProt) es una proteína transmembrana hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD localizada en linfocitos pre-B y linfocitos B maduros. (Valentine, M.A. et al., J. Biol. Chem. 264(19) (1989) 11282-11287; Tedder, T.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 208-212; Stamenkovic, I. et al., J. Exp. Med. 167 (1988) 1975-80; Einfeld, D.A. et al., EMBO J. 7 (1988) 711-7; Tedder, T.F. et al., J. Immunol. 142 (1989) 2560-2568). El gen humano correspondiente es el miembro 1 de la subfamilia A de 4 dominios transmembrana, también conocido como *MS4A1*. Este gen codifica un miembro de la familia del gen 4A transmembrana. Los miembros de esta familia de proteínas nacieses se caracterizan por características estructurales comunes y límites de empalme intrón/exón similares y muestran patrones de expresión únicos entre células hematopoyéticas y tejidos no linfoides. Este gen codifica la molécula de superficie de linfocitos B que desempeña un papel en el desarrollo y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas. Este miembro de la familia está localizado en 11q12, entre un grupo de miembros de la familia. El empalme alternativo de este gen da lugar a dos variantes de transcripción que codifican la misma proteína.

Los términos «CD20» y «antígeno CD20» se emplean indistintamente en el presente documento e incluyen todas las variantes, isoformas y especies homólogas de CD20 humano, que se expresan de modo natural en células o se expresan en células transfectadas con el gen *CD20*. La unión de un anticuerpo de la invención al antígeno CD20 media en la muerte de células que expresan CD20 (por ejemplo, una célula tumoral), por inactivación del CD20. La muerte de las células que expresan CD20 puede ocurrir por uno o más de los siguientes mecanismos: inducción de muerte celular / apoptosis, ADCC y CDC.

Los sinónimos de CD20, tal como se reconocen en la técnica, incluyen antígeno CD20 de linfocitos B, antígeno de superficie B1 de linfocitos B, Leu-16, Bp35, BM5 y LF5.

El término «anticuerpo anti-CD20» de acuerdo con la invención es un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD20. En función de las propiedades de unión y de las actividades biológicas de los anticuerpos anti-CD20 con respecto al antígeno CD20, se pueden distinguir dos tipos de anticuerpos anti-CD20 (anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II) de acuerdo con Cragg, M.S. et al., Blood 103 (2004) 2738-2743; y Cragg, M.S. et al., Blood 101 (2003) 1045-1051, véase la Tabla 2.

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

Anticuerpos anti-CD20 de tipo I	Anticuerpos anti-CD20 de tipo II
epítipo CD20 de tipo I	epítipo CD20 de tipo II
localizan la CD20 en balsas lípidas	no localizan la CD20 en balsas lípidas
CDC aumentada (si es isotipo IgG1)	CDC reducida (si es isotipo IgG1)
actividad de ADCC (si es isotipo IgG1)	actividad de ADCC (si es isotipo IgG1)
plena capacidad de unión	capacidad reducida de unión
agregación homotípica	agregación homotípica más fuerte
inducción de apoptosis después de unión cruzada	fuerte inducción de muerte celular sin unión cruzada

Ejemplos de anticuerpos anti-CD20 de tipo II incluyen por ejemplo, anticuerpo IgG1 B-Ly1 humanizado (un anticuerpo IgG1 quimérico humanizado, tal como se divulga en WO 2005/044859), IgG1 11B8 (tal como se divulga en WO 2004/035607) e IgG1 AT80. Típicamente, los anticuerpos anti-CD20 de tipo II del isotipo IgG1 poseen propiedades de CDC características. Los anticuerpos anti-CD20 de tipo II tienen una CDC disminuida (si es isotipo IgG1) en comparación con los anticuerpos de tipo I del isotipo IgG1.

Ejemplos de anticuerpos anti-CD20 de tipo I incluyen, por ejemplo, rituximab, IgG3 HI47 (ECACC, hibridoma), IgG1

2C6 (tal como se divulga en el documento WO 2005/103081), IgG1 2F2 (tal como se divulga en los documentos WO 2004/035607 y WO 2005/103081) e IgG1 2H7 (tal como se divulga en el documento WO 2004/056312).

Los anticuerpos anti-CD20 afucosilados de acuerdo con la invención son, en un modo de realización, un anticuerpo anti-CD20 de tipo II; en un modo de realización más específico, el anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado.

Los anticuerpos anti-CD20 afucosilados de acuerdo con la invención tienen una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) aumentada, a diferencia de los anticuerpos anti-CD20 que no tienen la cantidad de fucosa reducida.

Por «anticuerpo anti-CD20 afucosilado que tiene una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) aumentada» se entiende un anticuerpo anti-CD20 afucosilado, conforme al término ya definido en el presente documento, que tiene una ADCC aumentada determinada por cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica. Un ensayo *in vitro* aceptado de ADCC es el siguiente:

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

2) el ensayo utiliza como células efectoras las células mononucleadas de sangre periférica humana (PBMC), aisladas de la sangre de un donante sano elegido al azar;

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

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

ii) las células diana se cultivan por procedimientos estándar de cultivo de tejidos, se recolectan de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad superior a un 90 %, se lavan en un medio de cultivo celular RPMI, se marcan con 100 microcurios 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 trasvasan 100 microlitros de la anterior suspensión final de células diana a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos;

iv) el anticuerpo se diluye en serie de 4000 ng/ml a 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, sometiendo a prueba por triplicado varias concentraciones de anticuerpo que abarcan la totalidad del intervalo de concentraciones anterior;

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

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

vii) después se centrifuga la placa de microtitulación de 96 pocillos a  $50 \times g$  durante 1 minuto y se incuba a  $4^\circ\text{C}$  durante 1 hora;

viii) se añaden 50 microlitros de la suspensión de PBMC (punto i anterior) a cada pocillo para obtener una proporción de células efectoras:diana de 25: 1 y las placas se colocan en una incubadora bajo atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5 % a  $37^\circ\text{C}$  durante 4 horas;

ix) se recoge el sobrenadante sin células de cada pocillo y se cuantifica la radiactividad liberada experimentalmente (ER) empleando un contador gamma;

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

4) «ADCC aumentada» se define como un incremento en el porcentaje máximo de lisis específica observado en el intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a prueba anterior y/o una reducción en la concentración de anticuerpo requerida para alcanzar la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observada en el intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a prueba anterior. El aumento en ADCC se refiere a la ADCC medida en el ensayo anterior, mediada por el mismo anticuerpo, producida por el mismo tipo de células hospedadoras, aplicando los mismos procedimientos estándar de producción, purificación, formulación y conservación, que son conocidos por los expertos en la técnica, pero que no se han producido en las células hospedadoras modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar GnTIII.

Dicha «ADCC aumentada» se puede obtener por glicoingeniería de dichos anticuerpos, es decir, potenciando dichas funciones efectoras naturales mediadas por células de los anticuerpos monoclonales mediante modificación por ingeniería genética de su componente oligosacárido, tal como se describe en Umaña, P. et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 y documento US 6.602.684.

El término «citotoxicidad dependiente de complemento» (CDC) se refiere a la lisis de células tumorales humanas diana por acción del anticuerpo de acuerdo con la invención en presencia de complemento. La CDC se mide

preferentemente mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan CD20 con un anticuerpo anti-CD20 de acuerdo con la invención en presencia de complemento. Se encuentra CDC si, con una concentración de 100 nM, el anticuerpo induce la lisis (muerte celular) de un 20 % o más de las células tumorales después de 4 horas. El ensayo se lleva a cabo preferentemente con células tumorales marcadas con <sup>51</sup>Cr o Eu y medición del <sup>51</sup>Cr o Eu liberados. Los controles incluyen la incubación de las células tumorales diana con complemento pero sin el anticuerpo.

El anticuerpo «rituximab» (anticuerpo de referencia; ejemplo de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I) es un anticuerpo monoclonal quimérico humano, modificado por ingeniería genética, que contiene el dominio constante murino gamma 1, dirigido contra el antígeno CD20 humano. Este anticuerpo quimérico contiene dominios constantes gamma 1 humanos y se identifica con el nombre «C2B8» en el documento US 5.736.137 (Andersen et. al.) publicado el 17 de abril de 1998, asignado a IDEC Pharmaceuticals Corporation. El rituximab ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin de linfocitos B, positivo para CD20, recidivante o resistente al tratamiento, de bajo grado o folicular. Los estudios *in vitro* del mecanismo de acción han demostrado que rituximab presenta citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) humano (Reff, M.E., et. al., Blood 83(2) (1994) 435-445). Además, presenta una actividad significativa en ensayos que miden la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). El rituximab no está afucosilado.

Anticuerpo	Cantidad de fucosa
Rituximab (no afucosilado)	>85 %
B-Ly1 humanizado de tipo natural afucosilado modificado por glicoingeniería (B-HH6-B-KV1) (no afucosilado)	>85 %
B-Ly1 humanizado afucosilado modificado por glicoingeniería (B-HH6-B-KV1 GE)	45-50 %

El término «anticuerpo B-Ly1 humanizado» se refiere al anticuerpo B-Ly1 humanizado divulgado en los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875, que se obtuvo a partir del anticuerpo monoclonal anti-CD20 murino B-Ly1 (región variable de la cadena pesada murina (VH): SEQ ID NO: 1; región variable de la cadena ligera murina (VL): SEQ ID NO: 2, véase Poppema, S. and Visser, L., Biotest Bulletin 3 (1987) 131-139 por quimerización con un dominio constante humano de IgG1 y posterior humanización (véanse los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). Estos «anticuerpos B-Ly1 humanizados» se divulgan en detalle en los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875.

El «anticuerpo B-Ly1 humanizado» divulgado en el presente documento tiene la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada entre el grupo de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:20 (de B-HH2 a B-HH9 y de B-HL8 a B-HL17 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). Son especialmente preferentes las SEQ ID NO: 3, 4, 7, 9, 11, 13 y 15 (B-HH2, B-HH3, B-HH6, B-HH8, B-HL8, B-HL11 y B-HL13 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). En un modo de realización específico, el «anticuerpo B-Ly1 humanizado» tiene una región variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 20 (B-KV1 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). En un modo de realización específico, el «anticuerpo B-Ly1 humanizado» tiene una región variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 7 (B-HH6 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875) y una región variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 20 (B-KV1 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). Además, en un modo de realización, el anticuerpo B-Ly1 humanizado es un anticuerpo IgG1. De acuerdo con la invención, dichos anticuerpos B-Ly1 humanizados afucosilados son productos de glicoingeniería (GE) de la región Fc de acuerdo con los procedimientos descritos en los documentos WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umaña, P. et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 y el documento WO 99/154342. En un modo de realización de la invención, el anticuerpo anti-CD20 usado es B-Ly1 humanizado afucosilado modificado por glicoingeniería, conocido como B-HH6-B-KV1 GE. Dichos anticuerpos B-Ly1 humanizados modificados por glicoingeniería tienen un patrón alterado de glicosilación en la región Fc, preferentemente tienen un nivel reducido de residuos de fucosa. En un modo de realización, la cantidad de fucosa es un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos en Asn297 (en un modo de realización la cantidad de fucosa es entre un 40 % y un 60 %, en otro modo de realización la cantidad de fucosa es un 50 % o menos, y en aún otro modo de realización la cantidad de fucosa es un 30 % o menos, y en otro modo de realización más la cantidad de fucosa es un 0 %). Además, en un modo de realización específico, los oligosacáridos de la región Fc están bisectados. Estos anticuerpos B-Ly1 humanizados modificados por glicoingeniería tienen una ADCC aumentada.

El componente oligosacárido puede afectar de modo significativo a las propiedades relevantes para la eficacia de una glicoproteína terapéutica, incluidas la estabilidad física, la resistencia al ataque de las proteasas, las interacciones con el sistema inmunitario, la farmacocinética y la actividad biológica específica. Dichas propiedades pueden depender no solo de la presencia o ausencia de los oligosacáridos, sino también de sus estructuras específicas. Se pueden hacer algunas generalizaciones entre la estructura de oligosacárido y la función de la glicoproteína. Por ejemplo, ciertas estructuras de oligosacárido median en la rápida eliminación de la glicoproteína del torrente sanguíneo gracias a las interacciones con las proteínas que se unen a carbohidratos específicos, mientras que otras se pueden unir a anticuerpos y desencadenar reacciones inmunitarias no deseadas (Jenkins, N. et al., Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-981).

Las células de mamífero son excelentes hospedadores para la producción de glicoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad para glicosilar proteínas de la forma más compatible para la aplicación humana (Cumming, D.A. et al., *Glycobiology* 1 (1991) 115-30; Jenkins, N. et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-981). Las bacterias muy raramente glicosilan proteínas y, al igual que otros tipos de hospedadores comunes, por ejemplo levaduras, hongos filamentosos, células de insectos y plantas, dan lugar a patrones de glicosilación asociados a la rápida eliminación del torrente sanguíneo, interacciones inmunitarias no deseables y, en algunos casos concretos, una actividad biológica reducida. Entre las células de mamífero, las que más se han utilizado durante las dos últimas décadas son las células de ovario de hámster chino (CHO). Además de dar patrones de glicosilación adecuados, estas células permiten la generación sistemática de líneas celulares clónicas muy productivas y genéticamente estables. Se pueden cultivar hasta densidades elevadas en biorreactores simples empleando medios sin suero y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales empleadas habitualmente son las células de riñón de cría de hámster (BHK) y las células de mieloma de ratón NSO y SP2/0. En fechas más recientes se ha probado también la producción a partir de animales transgénicos (Jenkins, N. et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-981).

Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidrato en posiciones conservadas de las regiones constantes de la cadena pesada, en las que cada isotipo posee un ordenamiento distinto de estructuras de carbohidrato con enlaces N, lo cual afecta de modo variable el ensamblamiento, la secreción o la actividad funcional de la proteína (Wright, A. y Morrison, S.L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). La estructura del carbohidrato unido por enlaces N varía de modo considerable en función del grado de procesado y puede incluir oligosacáridos de alto contenido en manosa, con ramificaciones múltiples, así como oligosacáridos complejos biantenarios (Wright, A. y Morrison, S.L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). Típicamente existe un procesado heterogéneo de las estructuras básicas de oligosacárido unidas en un sitio particular de glicosilación, de modo que incluso los anticuerpos monoclonales existen como glicofórmulas múltiples. De igual manera, se ha demostrado que se producen diferencias importantes en la glicosilación de anticuerpos entre líneas celulares e incluso se han observado diferencias menores en una línea celular determinada que se haya cultivado en condiciones diferentes (Lifely, M.R. et al., *Glycobiology* 5(8) (1995) 813-22).

Una manera de obtener importantes incrementos de potencia, manteniendo un proceso de producción sencillo y evitando potencialmente efectos secundarios indeseables significativos consiste en potenciar las funciones efectoras naturales mediadas por células de los anticuerpos monoclonales mediante modificación por ingeniería genética de su componente oligosacárido, tal como se describe en Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 y documento US 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos más utilizados en la inmunoterapia contra el cáncer, son glicoproteínas que tienen un sitio de glicosilación unido por enlaces N conservado, en el Asn297 de cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos complejos biantenarios unidos a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico y su presencia es esencial para que el anticuerpo pueda mediar en funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Lifely, M.R. et al., *Glycobiology* 5 (1995) 813-822; Jefferis, R. et al., *Immunol. Rev.* 163 (1998) 59-76; Wright, A. y Morrison, S.L., *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 26-32).

Se ha demostrado previamente que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III («GnTIII17y»), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados, aumenta significativamente la actividad ADCC *in vitro* de un anticuerpo monoclonal quimérico antineuroblastoma (chCE7) producido por células CHO modificadas por ingeniería genética (véase Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 y el documento WO 99/154342, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento en su totalidad por referencia). El anticuerpo chCE7 pertenece a un gran grupo de anticuerpos monoclonales no conjugados que tienen una gran afinidad y especificidad tumorales, pero tienen una potencia insuficiente para ser útiles clínicamente cuando se producen en líneas celulares industriales estándar que carecen de la enzima GnTIII (Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180). Ese estudio fue el primero en demostrar que se podrían obtener grandes aumentos en la actividad ADCC mediante modificación genética de las células productoras de anticuerpos para expresar GnTIII, lo que dio lugar también a un aumento en la proporción de oligosacáridos bisectados asociados a la región constante (Fc), incluyendo oligosacáridos bisectados no fucosilados, por encima de los niveles encontrados en anticuerpos naturales.

El término «cáncer», tal como se utiliza en el presente documento, incluye linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de pulmón bronquioloalveolar, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, 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 las trompas de Falopio, carcinoma endometrial, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de partes blandas, 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, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas,

meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma hipofisario, incluyendo versiones resistentes al tratamiento de cualquiera de los cánceres anteriores, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores. En un modo de realización, el término «cáncer» se refiere a un cáncer que expresa CD20.

5 El término «expresión del antígeno CD20» pretende indicar un nivel significativo de expresión del antígeno CD20 en una célula, preferentemente en la superficie celular de un linfocito T o B, más preferentemente de un linfocito B, en un tumor o cáncer, preferentemente un tumor no sólido. Los pacientes que tienen un «cáncer que expresa CD20» se pueden determinar por ensayos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión del antígeno CD20 se puede medir usando detección inmunohistoquímica (IHC), FACS o mediante detección basada en PCR del ARNm correspondiente.

10 El término «cáncer que expresa CD20», tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a todos los cánceres en los que las células cancerosas muestran una expresión del antígeno CD20. Preferentemente, «cáncer que expresa CD20» tal como se usa en el presente documento se refiere a linfomas (preferentemente linfomas no Hodgkin (LNH) de linfocitos B) y leucemias linfocíticas. Dichos linfomas y leucemias linfocíticas incluyen por ejemplo, 15 a) linfomas foliculares, b) linfomas de células pequeñas no hendidas / linfoma de Burkitt (incluyendo linfoma de Burkitt endémico, linfoma de Burkitt esporádico y linfoma no Burkitt), c) linfomas de zonas marginales (incluido linfoma de linfocitos B de zona marginal extraganglionar (linfomas de tejido linfoide asociado a mucosa, TLAM), linfoma de linfocitos B de zona marginal ganglionar y linfoma esplénico de zona marginal), d) linfoma de células del manto (LCM), e) linfoma de células grandes (incluido linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma difuso de células mixtas, linfoma inmunoblástico, linfoma primario mediastínico de linfocitos B, linfoma angiocéntrico / linfoma pulmonar de linfocitos B, f) leucemia de células pilosas, g) linfoma linfocítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, h) leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC) / linfoma linfocítico pequeño (LLP), leucemia prolinfocítica de linfocitos B, i) neoplasias de células plasmáticas, mieloma de células plasmáticas, 20 mieloma múltiple, plasmocitoma, j) enfermedad de Hodgkin.

25 En un modo de realización adicional, el cáncer que expresa CD20 es un linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B. En otro modo de realización, el cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células del manto (LCM), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma de Burkitt, linfoma de células pilosas, linfoma folicular, mieloma múltiple, linfoma de zona marginal, trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT), linfoma asociado al VIH, macroglobulinemia de Waldenstrom o linfoma primario del SNC.

30 El término «un procedimiento de tratamiento» o sus equivalentes, cuando se aplican, por ejemplo, al cáncer, se refiere a un procedimiento o modo de acción diseñado para reducir o eliminar el número de células cancerosas de un paciente o para aliviar los síntomas de un cáncer. «Un procedimiento de tratamiento» del cáncer o de otro trastorno proliferativo no significa necesariamente que las células cancerosas o de otros trastornos se eliminarán realmente, sino que el número de células o el trastorno se reducirán realmente o que los síntomas de un cáncer o de otro trastorno se aliviarán realmente. A menudo, un procedimiento de tratamiento del cáncer se efectuará incluso 35 cuando tenga poca probabilidad de éxito, pero que, dado el historial médico del paciente y la esperanza de supervivencia estimada del mismo, se considera que a pesar de todo inducirá un curso de acción beneficioso en su conjunto.

40 Los términos «coadministración» o «coadministrar» se refieren a la administración de dicho anti-CD20 afucosilado y de bendamustina como una formulación única o como dos formulaciones separadas. La coadministración puede ser simultánea o secuencial en cualquier orden, en el que preferentemente existe un período de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Dicho anticuerpo afucosilado anti-CD20 y bendamustina se coadministran simultáneamente o secuencialmente (por ejemplo, por vía intravenosa (iv) a través de una infusión continua (una para el anticuerpo anti-CD20 y eventualmente una para la bendamustina). 45 Cuando ambos agentes terapéuticos se coadministran secuencialmente, 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 entre el día 2 y el 4. Por lo tanto, el término «secuencialmente» significa dentro de los 7 días siguientes a la dosis del primer componente (bendamustina o anticuerpo), preferentemente en los 4 días siguientes a la dosis del primer componente; y el término «simultáneamente» significa al mismo tiempo. El término «coadministración» con respecto a las dosis de mantenimiento de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado y bendamustina significa que las dosis de mantenimiento se pueden coadministrar simultáneamente, si el ciclo de tratamiento es apropiado para ambos fármacos, por ejemplo, cada semana. O la bendamustina se administra, por ejemplo, cada uno a tres días y dicho anticuerpo afucosilado se administra cada semana. O las dosis de mantenimiento se coadministran secuencialmente, en un período de uno o de varios días. 50 55 60

65 Es evidente que los anticuerpos se administran al paciente en una «cantidad terapéuticamente eficaz» (o simplemente «cantidad eficaz») que es la cantidad del compuesto o combinación respectiva que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que el investigador, veterinario, médico u otro clínico están buscando.

La cantidad de dicho anticuerpo afucosilado anti-CD20 y bendamustina que se va a coadministrar y el momento de

coadministración dependerán del tipo (especie, sexo, edad, peso, etc.) y del estado del paciente que se va a tratar y de la severidad de la enfermedad o afección que se va a tratar. Dicho anticuerpo afucosilado anti-CD20 y bendamustina se coadministran de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

5 Si la administración es intravenosa, el tiempo de infusión inicial para dicho anticuerpo afucosilado anti-CD20 o bendamustina puede ser más largo que los siguientes tiempos de infusión, por ejemplo, aproximadamente 90 minutos para la infusión inicial y aproximadamente 30 minutos para infusiones subsiguientes (si la infusión inicial se tolera bien).

10 En función del tipo y severidad de la enfermedad, una dosis inicial candidata para la coadministración de ambos fármacos al paciente es de aproximadamente 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado y de 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de bendamustina. En un modo de realización, la dosis preferente de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado (preferentemente el anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado) estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg. Por lo tanto, se podrá coadministrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). En un modo de realización, la dosis de bendamustina estará en el intervalo de 0,01 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, por ejemplo, de 0,1 mg/kg a 10,0 mg/kg. Dependiendo del tipo (especie, sexo, edad, peso, etc.) y del estado del paciente y del tipo de anticuerpo anti-CD20 afucosilado, la dosificación y el calendario de administración de dicho anticuerpo afucosilado y bendamustina pueden diferir, por ejemplo, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado se puede administrar, por ejemplo, cada una a tres semanas y la bendamustina se puede administrar diariamente o cada 2 a 10 días. También se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis más bajas.

25 En un modo de realización preferente, la dosis preferente de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado (preferentemente el anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado) será de 800 a 1200 mg el día 1, 8 y 15 de un ciclo de dosificación de 6 semanas y, posteriormente, en una dosis de 800 a 1200 mg el día 1 de hasta cinco ciclos de dosificación de 4 semanas y la dosis preferente de bendamustina será, por ejemplo, de 80 mg/m<sup>2</sup> a 110 mg/m<sup>2</sup> (en un modo de realización será de 110 mg/m<sup>2</sup>, en otro modo de realización será de 90 mg/m<sup>2</sup>) el día 1 y 2 (infusión intravenosa durante 30 minutos los días 1 y 2) de hasta seis ciclos de dosificación de 4 semanas. Alternativamente, la dosis de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado puede ser de 800 a 1200 mg (por ejemplo, 1000 mg) el día 1 hasta ocho ciclos de dosificación de 3 semanas.

35 En un modo de realización preferente, el medicamento es útil para prevenir o reducir la metástasis o la diseminación adicional en dicho paciente que sufre un cáncer, preferentemente un cáncer que expresa CD20. El medicamento es útil para aumentar la duración de la supervivencia de dicho paciente, aumentar la supervivencia libre de progresión de dicho paciente, aumentar la duración de la respuesta, lo cual se traduce en una mejoría estadísticamente significativa y clínicamente notable del paciente tratado, que se mide por la duración de la supervivencia, la supervivencia sin progresión, la tasa de respuesta o la duración de la respuesta. En un modo de realización específico, el medicamento es útil para aumentar la tasa de respuesta en un grupo de pacientes.

40 En el contexto de la presente invención, se pueden utilizar otros agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o antineoplásicos adicionales o compuestos que potencian los efectos de dichos agentes (por ejemplo, citocinas) en el tratamiento combinado del cáncer con el anticuerpo anti-CD20 afucosilado y bendamustina. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto. En un modo de realización, dicho tratamiento combinado con anticuerpo anti-CD20 afucosilado y bendamustina se usa sin dichos otros agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o antineoplásicos adicionales o compuestos que potencian los efectos de dichos agentes.

50 Dichos agentes incluyen, por ejemplo: agentes alquilantes o agentes que tienen acción alquilante, tales como ciclofosfamida (CTX; por ejemplo, Cytoxan®), clorambucilo (CHL; por ejemplo, Leukeran®), cisplatino (CisP; por ejemplo, Platinol®), busulfano (por ejemplo, Mileran®), melfalán, carmustina (BCNU), estreptozotocina, trietilenmelamina (TEM), mitomicina C y similares; antimetabolitos tales como metotrexato (MTX), etopósido (VP16; por ejemplo, Vepesid®), 6-mercaptopurina (6MP), 6-tioguanina (6TG), citarabina (Ara-C), 5-fluoruracilo (5-FU), capecitabina (por ejemplo, Xeloda®), dacarbazina (DTIC) y similares; antibióticos tales como actinomicina D, doxorubicina (DXR; por ejemplo, Adriamicina®), daunorubicina (daunomicina), bleomicina, mitramicina y similares; alcaloides tales como alcaloides de la vinca tales como vincristina (VCR), vinblastina y similares; y otros agentes antitumorales tales como paclitaxel (por ejemplo, Taxol®) y derivados de paclitaxel; los agentes citostáticos, glucocorticoides tales como dexametasona (DEX; por ejemplo, Decadron®) y corticosteroides tales como prednisona; inhibidores enzimáticos nucleosídicos tales como hidroxiaurea, enzimas que eliminan aminoácidos tales como asparaginasa, leucovorina y otros derivados de ácido fólico y agentes antitumorales similares diversos. Los siguientes agentes se pueden emplear también como agentes adicionales: arnifostina (por ejemplo, EthyoI®), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), doxorubicina lipo (por ejemplo, Doxil®), gemcitabina (por ejemplo, Gemzar®), daunorubicina lipo (por ejemplo, Daunoxome®), procarbazina, mitomicina, docetaxel (por ejemplo, Taxotere®), aldesleucina, carboplatino, oxaliplatino, cladribina, campotecina, CPT 11 (irinotecán), 10-hidroxi-7-etil-campotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, ifosfamida, idarubicina, mesna, interferón beta, interferón alfa, mitoxantrona, topotecán, leuprolida,

megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo. Preferentemente, el tratamiento combinado con anticuerpo anti-CD20 afucosilado y bendamustina se realiza sin dichos agentes adicionales.

5 El uso de los agentes citotóxicos y antineoplásicos descritos anteriormente, así como de fármacos antineoplásicos antiproliferativos específicos de su diana, por ejemplo, inhibidores de proteína-quinasas, en regímenes quimioterapéuticos está en general bien caracterizado en las técnicas de terapia contra el cáncer y su uso en el presente documento está sujeto a las mismas consideraciones de vigilancia de la tolerabilidad y de la eficacia y de control de las vías de administración y de las dosificaciones, con algunos ajustes. Por ejemplo, las dosificaciones reales de los agentes citotóxicos pueden variar en función de la respuesta de las células cultivadas del paciente determinada por procedimientos de histocultivo. En general, la dosificación se reducirá en comparación con la cantidad que se emplea en ausencia de otros agentes adicionales.

10 15 Las dosificaciones típicas de un agente citotóxico eficaz se pueden situar dentro de los intervalos recomendados por el fabricante y, cuando proceda por las respuestas *in vitro* o las respuestas obtenidas en modelos animales, se pueden reducir en hasta aproximadamente un orden de magnitud de concentración o cantidad. Por lo tanto, la dosificación real dependerá del criterio del facultativo que atiende al paciente, del estado del paciente y de la eficacia del procedimiento terapéutico basado en la capacidad de respuesta *in vitro* del cultivo primario de células malignas o de la muestra de tejido histocultivado o de las respuestas observadas en modelos animales apropiados.

20 En el contexto de la presente invención, se podrá aplicar una cantidad eficaz de radiación ionizante y/o se podrá utilizar un radiofármaco además del tratamiento combinado con anticuerpo anti-CD20 afucosilado y bendamustina de un cáncer que expresa CD20. La fuente de radiación puede ser interna o externa al paciente que está siendo tratado. Si la fuente es externa al paciente, la terapia se conoce como radioterapia de haz externo (EBRT). Cuando la fuente de radiación es interna al paciente, el tratamiento se denomina braquiterapia (BT). Los átomos radiactivos empleados en el contexto de la presente invención se pueden seleccionar entre el grupo que incluye, pero no se limita a, radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yodo-123, yodo-131 e indio-111. También es posible marcar el anticuerpo con dichos isótopos radiactivos. Preferentemente, el tratamiento combinado con anticuerpo anti-CD20 afucosilado y bendamustina se realiza sin dicha radiación ionizante.

25 30 La radioterapia es un tratamiento estándar para controlar tumores no resecables o inoperables y/o metástasis tumorales. Se han observado mejores resultados cuando la radioterapia se combina con quimioterapia. La radioterapia se basa en el principio de que la radiación en dosis elevadas suministrada a una zona diana producirá la muerte de las células reproductoras tanto en el tejido tumoral como en el tejido normal. El régimen de dosificación de radiación se define, en general, en términos de dosis de radiación absorbida (Gy), tiempo y fraccionamiento y el oncólogo tendrá que definirlo cuidadosamente. La cantidad de radiación que recibe un paciente dependerá de varias consideraciones, pero las dos más importantes son la ubicación del tumor con respecto a otras estructuras u órganos críticos del organismo y el grado de diseminación del tumor. Un curso típico de tratamiento para un paciente sometido a radioterapia será un régimen de tratamiento durante un período de 1 a 6 semanas, con una dosis total comprendida entre 10 y 80 Gy, administrada al paciente en una sola fracción diaria de aproximadamente 1,8 a 2,0 Gy, 5 días a la semana. En un modo de realización preferente de la presente invención se observa sinergia cuando los tumores de pacientes humanos se tratan con el tratamiento combinado de la invención y radiación. En otras palabras, la inhibición del crecimiento tumoral mediante los agentes que comprenden la combinación de la invención se potencia cuando se combina con radiación, opcionalmente con agentes quimioterapéuticos o antineoplásicos adicionales. Los parámetros de las radioterapias adyuvantes se incluyen, por ejemplo, en el documento WO 99/60023.

35 40 45 Los anticuerpos anti-CD20 afucosilados se pueden administrar a un paciente de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como mediante administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial o intratecal. En un modo de realización, dichos anticuerpos se administran por administración intravenosa o subcutánea.

50 55 La bendamustina se puede administrar a un paciente de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como mediante administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal o peroral. De acuerdo con un modo de realización, dicho anticuerpo se administra por administración intravenosa o intraperitoneal.

60 65 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que un «vehículo farmacéuticamente aceptable» incluya cualquiera y todos los materiales compatibles con la administración farmacéutica, incluyendo disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y otros materiales y compuestos compatibles con la administración farmacéutica. Excepto en la medida en que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones de la invención. En las composiciones también se pueden incorporar compuestos activos complementarios.

**Composiciones farmacéuticas**

5 Las composiciones farmacéuticas se pueden obtener procesando el anticuerpo anti-CD20 y/o bendamustina de acuerdo con la presente invención con vehículos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Se puede usar lactosa, almidón de maíz o derivados del mismo, talco, ácido esteárico o sus sales y similares, por ejemplo, como dichos vehículos para comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas y cápsulas de gelatina dura. Por ejemplo, los vehículos adecuados para cápsulas de gelatina blanda son aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos y líquidos y similares. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de la sustancia activa, habitualmente  
10 no se requieren vehículos en el caso de cápsulas de gelatina blanda. Los vehículos adecuados para la producción de soluciones y jarabes son, por ejemplo, agua, polioles, glicerol, aceite vegetal y similares. Los vehículos adecuados para supositorios son, por ejemplo, aceites naturales o endurecidos, ceras, grasas, polioles semilíquidos o líquidos y similares.

15 Además, las composiciones farmacéuticas pueden contener conservantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, sales para variar la presión osmótica, tampones, agentes de enmascaramiento o antioxidantes. También pueden contener todavía otras sustancias terapéuticamente valiosas.

20 Se divulga una composición que comprende tanto dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos (en un modo de realización, dicho anticuerpo es un anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado) y bendamustina para uso en el tratamiento del cáncer, en particular, cáncer que expresa CD20.

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

La presente invención divulga además una composición farmacéutica, en particular para uso en cáncer, que comprende (i) una primera cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa es un 60 % o menos (en un modo de realización, un anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado) y (ii) una segunda cantidad eficaz de bendamustina. Dicha composición opcionalmente comprende vehículos y/o excipientes farmacéuticamente  
30 aceptables.

Las composiciones farmacéuticas del anticuerpo anti-CD20 afucosilado solo se preparan para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tenga el grado deseado de pureza con los vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A., (ed.)  
35 (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los destinatarios a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (p.ej., complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).  
45

Las composiciones farmacéuticas de bendamustina pueden ser similares a las descritas anteriormente para el anticuerpo anti-CD20 afucosilado.  
50

En un modo de realización adicional de la invención, el anticuerpo anti-CD20 afucosilado y la bendamustina se formulan en dos formulaciones separadas.

Los principios activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. (ed.) (1980).  
55

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, en las que dichas matrices se encuentran en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, polo(2-hidroxoetolmetacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato, copolímeros no degradables de etileno-acetato de vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico  
60  
65

tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

5 Las formulaciones que se vayan a usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

También se divulga un procedimiento para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento (i) una primera cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa es un 60 % o menos (en un modo de realización, un anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado) y (ii) una  
10 segunda cantidad eficaz de bendamustina.

En un modo de realización, la cantidad de fucosa es entre un 40 % y un 60 %.

15 Preferentemente, dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20.

Preferentemente, dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B.

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

20 Preferentemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo B-Ly1 humanizado.

Preferentemente, dicho anticuerpo B-Ly1 humanizado se administra en una dosis de 800 a 1200 mg el día 1, 8 y 15 de un ciclo de dosificación de 6 semanas y luego en una dosis de 800 a 1200 mg el día 1 de hasta cinco ciclos de dosificación de 4 semanas, y la bendamustina se administra en una dosis de 80 mg/m<sup>2</sup> a 110 mg/m<sup>2</sup> el día 1 y 2 de  
25 hasta seis ciclos de dosificación de 4 semanas.

Como se usa en el presente documento, el término «paciente» se refiere preferentemente a un ser humano que necesita tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 afucosilado (por ejemplo, un paciente que sufre un cáncer que expresa CD20) para cualquier fin y más preferentemente un ser humano que necesita dicho tratamiento para tratar  
30 el cáncer, o una afección o lesión precancerosa. No obstante, el término «paciente» también se puede referir 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 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos, en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de  
35 SEQ ID NO: 20, para uso en el tratamiento de un cáncer que expresa CD20 en combinación con bendamustina.

La invención comprende además un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos, en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de  
40 SEQ ID NO: 20 y bendamustina para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa CD20.

45 Preferentemente, el cáncer que expresa CD20 es un linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B.

Preferentemente, dicho anticuerpo B-Ly1 humanizado se administra en una dosis de 800 a 1200 mg el día 1, 8 y 15 de un ciclo de dosificación de 6 semanas y luego en una dosis de 800 a 1200 mg el día 1 de hasta cinco ciclos de dosificación de 4 semanas y la bendamustina se administra en una dosis de 80mg/m<sup>2</sup> a 110 mg/m<sup>2</sup> el día 1 y 2 de  
50 hasta seis ciclos de dosificación de 4 semanas.

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

#### **Listado de secuencias**

55 **SEQ ID NO: 1** secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 B-Ly1.

60 **SEQ ID NO: 2** secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 B-Ly1.

**SEQ ID NO: 3-19** secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpos B-Ly1 humanizados (B-HH2 a B-HH9, B-HL8 y B-HL10 a B-HL17).

65 **SEQ ID NO: 20** secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo B-Ly1 humanizado B-KV1.

**Descripción de las figuras**

5 **Figura 1** Actividad antitumoral *in vivo* del tratamiento combinado de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado de tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) con bendamustina (en comparación con la combinación de rituximab (anticuerpo anti-CD20 de tipo I fucosilado) con bendamustina y en comparación con las respectivas monoterapias.

**Procedimientos experimentales**

10 **Procedimientos experimentales**

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

15 **Agentes de prueba**

20 El anticuerpo anti-CD20 afucosilado B-HH6-B-KV1 GE (B-Ly1 humanizado afucosilado, B-HH6-B-KV1 modificado por glicoingeniería, véase el documento WO 2005/044859 y WO 2007/031875) se proporcionó como solución madre (9,4 mg/ml) de GlycArt, Schlieren, Suiza. El tampón de anticuerpo incluía histidina, trehalosa y polisorbato 20. La solución de anticuerpo se diluyó apropiadamente en PBS de nuestras existencias para inyecciones previas.

El rituximab de grado clínico (Mabthera) se obtuvo de Hoffmann La Roche, Basilea, Suiza.

25 La bendamustina (Ribomustin®) se adquirió a Mundipharma GmbH, Limburg an der Lahn, Alemania. Las diluciones requeridas se ajustaron a partir de la solución madre fabricada de 2,5 mg/ml.

**Líneas celulares y condiciones de cultivo**

30 La línea celular de linfoma de células del manto Z138 humano se cultivó rutinariamente en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % (PAA Laboratories, Austria) y L-glutamina 2 mM a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO<sub>2</sub> al 8 %. El paso 4 se utilizó para el trasplante. Las células se coinyectaron con Matrigel.

**Animales**

35 Ratones hembra SCID beige; 3-4 semanas de edad en el momento de su llegada (adquiridos a Charles River, Sulzfeld, Alemania) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz y 12 h de oscuridad de acuerdo con las directrices acordadas (GV-Solas, Felasa, TierschG). El protocolo del estudio experimental fue revisado y aprobado por el gobierno local. Después de la llegada, los animales se mantuvieron en la parte de cuarentena de la instalación para animales durante una semana para acostumbrarse a un nuevo entorno y para su observación. La monitorización continua de la salud se llevó a cabo de manera regular. Se proporcionaron ad libitum alimentos (Provimi Kliba 3337) y agua (pH acidificado de 2,5-3).

**Monitorización**

45 Los animales fueron controlados diariamente para detectar síntomas clínicos y efectos adversos. Para la monitorización a lo largo del experimento, el peso corporal de los animales se documentó dos veces a la semana y el volumen del tumor se midió con un calibre después de la estadificación.

**Tratamiento de los animales**

50 El tratamiento de los animales comenzó el día de la aleatorización 19 días después de la inoculación de células tumorales. El anticuerpo anti-CD20 afucosilado humanizado B-HH6-B-KV1 GE o el rituximab se administraron como agentes únicos i.p. cada 7 días el día de estudio 19 y 26 en la dosis indicada de 1 mg/kg. El vehículo correspondiente se administró en los mismos días. La bendamustina se administró i.p. los días 19, 20, 21 y 22 en una dosis de 3 mg/kg.

En los grupos de terapia combinada, el agente quimioterapéutico se administró 8 horas después de ambos anticuerpos al día 19.

60 **Estudio de inhibición del crecimiento tumoral *in vivo***

65 Al final del experimento 33 días después de la inoculación de células tumorales, se produjo una inhibición del crecimiento tumoral (ICT) según se indica en la Tabla 1 en los animales a los que se les administró rituximab, anticuerpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE, combinación de rituximab y bendamustina o combinación de anticuerpo anti-CD20 y bendamustina, respectivamente, en comparación con el grupo de control. El tratamiento con bendamustina sola no mostró ninguna actividad antitumoral en el presente experimento.

Se produjo un efecto más que aditivo al comparar el grupo de combinación con anticuerpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE / bendamustina con el tratamiento con anticuerpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE solo.

## 5 Evaluación estadística

El estudio se dio por finalizado el día 33. La evaluación estadística se basó en el sAUC. Se observó una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento tumoral en el grupo 2 (B-HH6-B-KV1 GE, 1 mg/kg, una vez a la semana, i.p.) indicada por un valor de TCR de 0,72 (IC 0,59-0,86), en el grupo 3 (rituximab, 1 mg/kg, una vez a la semana, i.p.) indicado por un valor de TCR de 0,78 (IC 0,65-0,93), en el grupo 5 (B-HH6-B-KV1 GE, 1 mg/kg, una vez a la semana, i.p. en combinación con bendamustina, 3 mg/kg, días de estudio 19-22, i.p.) indicado por un valor de TCR de 0,46 (IC 0,34-0,59) y en el grupo 6 (rituximab, 1 mg/kg, una vez a la semana, i.p. en combinación con bendamustina, 3 mg/kg, días de estudio 19-22, i.p.) indicado por un valor de TCR de 0,67 (IC 0,54-0,81) en comparación con el grupo de vehículo (grupo 1). El grupo 4 (bendamustina, 3 mg/kg, días de estudio 19-22, i.p.) mostró un crecimiento tumoral comparable al del grupo de control al final del estudio.

La combinación de B-HH6-B-KV1 GE con bendamustina mostró un efecto más que aditivo (sinérgico) y estadísticamente significativo sobre la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con los tratamientos únicos analizados por la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0,001$ ) (véanse la Tabla 1 y Figura 1)

**Tabla 1:** TCR paramétrico con bajo y alto intervalo de confianza (IC) basado en sAUC e ICT (%)

Grupo	Programa de tratamiento	TCR	IC del 95 % vs. grupo 1	ICT (%)
2	B-HH6-B-KV1 GE (una vez a la semana, 1 mg/kg)	0,72	[0,59-0,86]	47
3	Rituximab (una vez a la semana, 1 mg/kg)	0,78	[0,65-0,93]	29
4	Bendamustina Días de estudio 19-22, 3 mg/kg	0,9	[0,76-1,06]	0
5	B-HH6-B-KV1 GE (una vez a la semana, 1 mg/kg) + Bendamustina (días de estudio 19-22, 3 mg/kg)	0,46	[0,34-0,59]	72
6	Rituximab (una vez a la semana, 1 mg/kg) + Bendamustina (días de estudio 19-22, 3 mg/kg)	0,67	[0,54-0,81]	42

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 5 <110> Roche Glycart AG
- <120> Tratamiento combinado de un anticuerpo CD20 afucosilado con bendamustina
- <130> 26255
- 10 <150> EP 09010489.4
- <151> 14-08-2009
- <160> 27
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 112
- <212> PRT
- 20 <213> Mus sp.
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 B-Ly1.
- 25 <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

- 30 <210> 2
- <211> 103
- <212> PRT
- <213> Mus sp.

- 35 <220>
- <221> MISC\_FEATURE

# ES 2 630 158 T3

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

<400> 2

5

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100

<210> 3

<211> 119

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-HH2)

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser



ES 2 630 158 T3

50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 5  
<211> 119  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH4)

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

15

ES 2 630 158 T3

5 <210> 6  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH5)  
 <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

15 <210> 7  
 <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-HH6)  
 <400> 7

25

ES 2 630 158 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 8  
 <211> 119  
 5 <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-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

ES 2 630 158 T3

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 9  
 <211> 119  
 5 <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-HH8)

<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

ES 2 630 158 T3

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 10  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH9)

<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

15 <210> 11  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>

# ES 2 630 158 T3

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

<400> 11

5

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
          115

<210> 12

<211> 119

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-HL10)

<400> 12

ES 2 630 158 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe 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  
 <211> 119  
 5 <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)

<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

ES 2 630 158 T3

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 14  
 <211> 119  
 5 <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)

<400> 14

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

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

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

15

ES 2 630 158 T3

<210> 15  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL13)

10 <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

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> 16  
 <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-HL14)

<400> 16

ES 2 630 158 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 17  
 <211> 119  
 5 <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-HL15)

<400> 17

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

ES 2 630 158 T3

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  
 <211> 119  
 5 <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

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

ES 2 630 158 T3

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> 19

<211> 119

5 <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-HL17)

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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> 20

<211> 115

<212> PRT

20 <213> Artificial

ES 2 630 158 T3

<220>

<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo B-Ly1 humanizado B-KV1.

5 <400> 20

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn  
85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg Thr Val  
115

10 <210> 21

<211> 144

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 21

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile



ES 2 630 158 T3

50

55

60

Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys  
65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met  
85 90 95

Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser  
100 105 110

Cys Ala Thr Gln Thr Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys  
115 120 125

Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu  
130 135 140

<210> 23

<211> 152

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

Met Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Val Arg Pro  
1 5 10 15

Gly Leu Gln Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Pro Leu Lys Thr Ser Trp  
20 25 30

Val Asn Cys Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu Lys Gln  
35 40 45

Pro Pro Leu Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu Asp Gln  
50 55 60

Asp Ile Leu Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe  
65 70 75 80

Asn Arg Ala Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile  
85 90 95

10 Leu Lys Asn Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr

ES 2 630 158 T3

100

105

110

Arg His Pro Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg  
 115 120 125

Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln  
 130 135 140

Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile Phe  
 145 150

<210> 24

<211> 152

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

Met Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Val Arg Pro  
 1 5 10 15

Gly Leu Gln Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Ser Leu Lys Thr Ser Trp  
 20 25 30

Val Asn Cys Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu Lys Gln  
 35 40 45

Pro Pro Leu Pro Leu Leu Asp Phe Asn Ser Leu Asn Gly Glu Asp Gln  
 50 55 60

Asp Ile Leu Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe  
 65 70 75 80

Asn Arg Ala Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile  
 85 90 95

Leu Lys Asn Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr  
 100 105 110

Arg His Pro Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg  
 115 120 125

10 Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln  
 130 135 140

Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile Phe  
 145 150

ES 2 630 158 T3

<210> 25  
 <211> 152  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 25

Met Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Val Arg Pro  
 1 5 10 15

Gly Leu Gln Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Ser Leu Lys Thr Ser Trp  
 20 25 30

Val Asn Cys Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr Arg Leu Lys Gln  
 35 40 45

Pro Pro Leu Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu Asp Gln  
 50 55 60

Asp Ile Leu Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe  
 65 70 75 80

Asn Arg Ala Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile  
 85 90 95

Leu Lys Asn Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr  
 100 105 110

Arg His Pro Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg  
 115 120 125

Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln  
 130 135 140

Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile Phe  
 145 150

10

<210> 26  
 <211> 554  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 26

ES 2 630 158 T3

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu  
 1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu  
 35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln  
 50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys  
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr  
 85 90 95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu  
 100 105 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu  
 115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln  
 130 135 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu  
 145 150 155 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala  
 165 170 175

Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu  
 180 185 190

Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His

ES 2 630 158 T3

195	200	205																				
Gln	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Met	Ala	Pro	Val	Ala	Gly	Leu	Thr	Trp	Glu							
210						215						220										
Asp	Ser	Glu	Gly	Thr	Glu	Gly	Ser	Ser	Leu	Leu	Pro	Gly	Glu	Gln	Pro							
225						230						235										
Leu	His	Thr	Val	Asp	Pro	Gly	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Pro	Pro	Arg	Ser							
				245						250												
Thr	Cys	Gln	Ser	Phe	Glu	Pro	Pro	Glu	Thr	Pro	Val	Val	Lys	Asp	Ser							
				260						265												
Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Pro	Gln	Pro	Arg	Pro	Ser	Val	Gly	Ala	Phe	Asn							
		275						280						285								
Pro	Gly	Met	Glu	Asp	Ile	Leu	Asp	Ser	Ala	Met	Gly	Thr	Asn	Trp	Val							
		290						295						300								
Pro	Glu	Glu	Ala	Ser	Gly	Glu	Ala	Ser	Glu	Ile	Pro	Val	Pro	Gln	Gly							
305						310						315										
Thr	Glu	Leu	Ser	Pro	Ser	Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Met	Gln	Thr	Glu							
				325						330												
Pro	Ala	Arg	Pro	Ser	Asn	Phe	Leu	Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Leu	Pro	Ala							
				340						345												
Ser	Ala	Lys	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Asp	Val	Thr	Gly	Thr	Ala	Leu	Pro							
		355						360						365								
Arg	Val	Gly	Pro	Val	Arg	Pro	Thr	Gly	Gln	Asp	Trp	Asn	His	Thr	Pro							
		370						375						380								
Gln	Lys	Thr	Asp	His	Pro	Ser	Ala	Leu	Leu	Arg	Asp	Pro	Pro	Glu	Pro							
385						390						395										
Gly	Ser	Pro	Arg	Ile	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro	Gln	Gly	Leu	Ser	Asn	Pro							
				405						410												

ES 2 630 158 T3

Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly  
 420 425 430

Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp  
 435 440 445

Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala  
 450 455 460

Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly  
 465 470 475 480

His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser  
 485 490 495

Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val  
 500 505 510

Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro  
 515 520 525

Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr  
 530 535 540

Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val  
 545 550

<210> 27  
 <211> 554  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 27

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu  
 1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu  
 35 40 45

10

ES 2 630 158 T3

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln  
50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys  
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr  
85 90 95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu  
100 105 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu  
115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln  
130 135 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu  
145 150 155 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala  
165 170 175

Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu  
180 185 190

Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His  
195 200 205

Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu  
210 215 220

Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro  
225 230 235 240

Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser  
245 250 255

Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser  
260 265 270

ES 2 630 158 T3

Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn  
 275 280 285

Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val  
 290 295 300

Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly  
 305 310 315 320

Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu  
 325 330 335

Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala  
 340 345 350

Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro  
 355 360 365

Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro  
 370 375 380

Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro  
 385 390 395 400

Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro  
 405 410 415

Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly  
 420 425 430

Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp  
 435 440 445

Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala  
 450 455 460

Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly  
 465 470 475 480

His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Phe Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser  
 485 490 495

ES 2 630 158 T3

Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val  
500 505 510

Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro  
515 520 525

Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr  
530 535 540

Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val  
545 550

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con bendamustina, caracterizado por que dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20 y por que dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 20.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la cantidad de fucosa es entre un 40 % y un 60 %.
3. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B.
- 15 4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se administran uno o más agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o antineoplásicos adicionales o compuestos o radiación ionizante que potencian los efectos de dichos agentes.
- 20 5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que dicho anticuerpo se administra en una dosis de 800 a 1200 mg el día 1, 8 y 15 de un ciclo de dosificación de 6 semanas y luego en una dosis de 800 a 1200 mg el día 1 de hasta cinco ciclos de dosificación de 4 semanas, y la bendamustina se administra en una dosis de 80 mg/m<sup>2</sup> a 110 mg/m<sup>2</sup> el día 1 y 2 de hasta seis ciclos de dosificación de 4 semanas.
- 25 6. Un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297, para uso en el tratamiento del cáncer en combinación con bendamustina, caracterizado por que dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20 y por que dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 20.
- 30 7. El anticuerpo de acuerdo con el uso de la reivindicación 6, caracterizado por que la cantidad de fucosa es entre un 40 % y un 60 %.
8. El anticuerpo de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, caracterizado por que dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B.
- 35 9. El anticuerpo de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado por que se administran uno o más agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o antineoplásicos adicionales o compuestos o radiación ionizante que potencian los efectos de dichos agentes.
- 40 10. El anticuerpo de acuerdo con el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado por que dicho anticuerpo se administra en una dosis de 800 a 1200 mg el día 1, 8 y 15 de un ciclo de dosificación de 6 semanas y luego en una dosis de 800 a 1200 mg el día 1 de hasta cinco ciclos de dosificación de 4 semanas, y la bendamustina se administra en una dosis de 80 mg/m<sup>2</sup> a 110 mg/m<sup>2</sup> el día 1 y 2 de hasta seis ciclos de dosificación de 4 semanas.

