

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 350**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 31/522 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2014 PCT/EP2014/073640**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15067586**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2014 E 14796468 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3066126**

54 Título: **Politerapia de un anticuerpo para CD20 afucosilado con un inhibidor de la BTK**

30 Prioridad:

07.11.2013 EP 13192006

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2019

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)
Grenzacherstrasse 124**

**4002 Basel, CH y
ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KLEIN, CHRISTIAN;
TOSHIO, YOSHIZAWA y
TOMOKO, YASUHIRO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 728 350 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

Politerapia de un anticuerpo para CD20 afucosilado con un inhibidor de la BTK

- 5 La presente invención se dirige a la politerapia de un anticuerpo para CD20 afucosilado con un inhibidor de la BTK para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención10 **Anticuerpos afucosilados**

Las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales se pueden potenciar genomaniplando 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 comúnmente usados en la inmunoterapia contra el cáncer, son glucoproteínas que tienen un sitio de glucosilación unido a N conservado en Asn297 de cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos acoplados a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, formando extensos contactos con la cadena principal polipeptídica, y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie en las funciones efectoras, tales como 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 glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisecados, incrementa significativamente la actividad de ADCC *in vitro* de los anticuerpos. Las alteraciones en la composición del carbohidrato en N297 o su eliminación también afectan a la unión de Fc que se une a Fc γ 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).

Se ha informado de estudios que analizan las actividades de anticuerpos afucosilados y fucosilados, incluyendo anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, Iida, 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 (2006) 680-688; Davies, J., *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 74 (2001) 288-294).

35 **CD20 y anticuerpos anti-CD20**

La molécula CD20 (también llamada antígeno de diferenciación restringido a linfocitos B humanos o Bp35) es una proteína transmembranaria hidrófoba localizada en los linfocitos pre-B y B maduros que se ha descrito extensamente (Valentine, M.A., *et al.*, J. Biol. Chem. 264 (1989) 11282-11287; y 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) 208-212; Stamenkovic, I., *et al.*, J. Exp. Med. 167 (1988) 1975-1980; Tedder, T.F., *et al.*, J. Immunol. 142 (1989) 2560-2568). CD20 se expresa en más de un 90 % de los linfomas no Hodgkinianos (LNH) de linfocitos B (Anderson, K.C., *et al.*, Blood 63 (1984) 1424-1433) pero no se encuentra en las células madre hematopoyéticas, linfocitos pro-B, células plasmáticas normales u otros tejidos normales (Tedder, T.F., *et al.*, J. Immunol. 135 (1985) 973-979).

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) 1045-1052). Los anticuerpos de tipo I, como, por ejemplo, rituximab (un anticuerpo no afucosilado con una cantidad de fucosa de un 85 % o más alta), son potentes en la citotoxicidad mediada por el complemento.

Los anticuerpos de tipo II, como, por ejemplo, los anticuerpos Tositumomab (B1), 11B8, AT80 o B-Ly1 humanizado, inician eficazmente la muerte de las células diana por medio de la inducción de la muerte de las células independiente de caspasa con exposición a fosfatidilserina simultánea.

55 **BTK e inhibidores de la BTK**

La tirosina cinasa de Bruton o tirosina cinasa de agammaglobulinemia de Bruton (abreviada Btk o BTK) es un miembro de la familia TEC de cinasas. BTK se asocia con la enfermedad de inmunodeficiencia primaria agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (agammaglobulinemia de Bruton). El mecanismo de acción exacto es desconocido. El gen BTK codifica la proteína BTK, que es fundamental para el desarrollo y la maduración de los linfocitos B como activación de los mastocitos a través del receptor de IgE de afinidad alta. Los pacientes con agammaglobulinemia ligada al cromosoma X tienen poblaciones de linfocitos pre-B normales en la médula ósea, sin embargo, estas células ni maduran ni entran en la circulación. El gen BTK se localiza en el cromosoma X. Se han identificado más de 400 mutaciones del gen BTK.

BTK se activa en dirección 5' mediante las cinasas de la familia Src Blk, Lyn y Fyn y da lugar a la activación en dirección 3' de vías de supervivencia celular esenciales, tales como NF-κB y cinasas MAP. BTK contiene un dominio de homología con pleckstrina (PH) que se une a (3,4,5)-trifosfato de fosfatidilinositol (PI(3,4,5)P₃). La unión a PI(3,4,5)P₃ induce a Btk a fosforilar la fosfolipasa Cγ (PLCγ), que, a su vez, hidroliza PI(4,5)P₂, un fosfatidilinositol, en dos segundos mensajeros, trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG), que, a continuación, proceden a modular la actividad de las proteínas en dirección 3' durante la señalización de los linfocitos B. Posteriormente, se moviliza Ca²⁺ y se activan las vías de NF-κB y cinasas MAP.

Un inhibidor de la BTK ejemplar descrito en la técnica es ibrutinib (PCI-32765; Advani *et al.*; J Clin Oncol. 2013; 1 de enero; 31(1), página 88-94) que es un inhibidor de la BTK irreversible de molécula pequeña.

Burger *et al.* (Lancet Oncology, vol. 15, n.º 10, 15 de septiembre de 2014, páginas 1090-1099) divulgan la seguridad y actividad de rituximab en combinación con ibrutinib en el tratamiento de la LLC (fig. 1).

Damler *et al.* (Cancer Research, vol. 73, n.º 8, abril de 2013, página 3531) divulgan la eficacia terapéutica en 27 de 28 pacientes con LLC que usan rituximab y bendamustina (BR) en combinación con ibrutinib.

Hoellenriegel *et al.* (Blood, vol. 120, n.º 21, noviembre de 2012, página 186) divulgan la eficacia terapéutica usando una combinación de ibrutinib y rituximab en cuarenta pacientes con LLC de riesgo alto.

Golay *et al.* (Blood, vol. 122, n.º 20, 8 de octubre de 2013, páginas 3482-3491) divulgan que obinutuzumab es superior a rituximab y ofatumumab en modelos preclínicos *in vitro* y modelos preclínicos *in vivo*.

Sumario de la invención

Ahora se ha descubierto que la combinación de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II afucosilado con un inhibidor de la BTK demostró efectos antiproliferativos significativamente potenciados. De forma sorprendente, esta combinación es más que aditiva, es decir, altamente sinérgica. La materia objeto de la invención se define mediante las reivindicaciones y se refiere a una combinación de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I u obinutuzumab y 6-amino-9-[3R]-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal de la misma en el tratamiento del cáncer.

Un aspecto de la descripción es un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, para el tratamiento del cáncer en combinación con un inhibidor de la BTK.

Otro aspecto de la descripción es el uso de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con un inhibidor de la BTK.

Otro aspecto de la descripción es un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece cáncer administrando un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, en combinación con un inhibidor de la BTK, a un paciente que necesita dicho tratamiento.

En un aspecto de la descripción, la cantidad de fucosa está entre un 40 % y un 60 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297. En otro aspecto de la descripción, la cantidad de fucosa es de un 0 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297.

En un aspecto de la descripción, el anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo IgG1. En otro aspecto, dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20, preferentemente un linfoma o leucemia linfocítica. En un aspecto de la descripción, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo B-Ly1 humanizado. En otro aspecto de la descripción, dicho anticuerpo afucosilado es un anticuerpo anti-CD20 de tipo II.

En un aspecto, dicho inhibidor de la BTK es un compuesto seleccionado de los compuestos descritos en los documentos WO2011/152351 y WO2013/081016. Dicho inhibidor de la BTK es preferentemente un compuesto de acuerdo con la fórmula I o de acuerdo con la fórmula I-1 como se divulga en el presente documento. Preferentemente, el inhibidor de la BTK es 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal de la misma.

En un aspecto de la descripción, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo B-Ly1 humanizado y dicho inhibidor de la BTK se selecciona del grupo que consiste en: los compuestos descritos en los documentos WO2011/152351 y WO2013/081016. Dicho inhibidor de la BTK es preferentemente un compuesto de acuerdo con la fórmula I o de acuerdo con la fórmula I-1 como se divulga en el presente documento. Preferentemente, el inhibidor de la BTK es 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal de la misma, y dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20, en un modo de realización, un linfoma o

leucemia linfocítica.

En un aspecto, el anticuerpo anti-CD20 afucosilado se une a CD20 con una KD de 10^{-8} M a 10^{-13} M.

5 Un aspecto de la descripción de la divulgación es una composición farmacéutica que comprende una combinación de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, (en un aspecto de la descripción, un anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado) y un inhibidor de la BTK (en un aspecto, el inhibidor de la BTK se selecciona del grupo que consiste en: los compuestos descritos en los documentos WO2011/152351 y WO2013/081016). Dicho inhibidor de la BTK es preferentemente un compuesto de acuerdo con la fórmula I o de acuerdo con la fórmula I-1 como se divulga en el presente documento. Preferentemente, el inhibidor de la BTK es 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal de la misma) para el tratamiento del cáncer.

Descripción de las figuras

15 **Figura 1: Estudio de actividad antitumoral: curvas de volumen tumoral medio (a) y curvas de la mediana del volumen tumoral (b) de ratones portadores de células TMD8 subcutáneas.**

20 Los ratones se xenoinjertaron el D0. La aleatorización se realizó el D14 (día 0 como se indica en la figura 1). Los ratones recibieron una administración v.o. del vehículo y compuesto A a 10 mg/kg dos veces al día (Q0,5D x 24) sola o en combinación con una inyección i.v. de GA101 a 1 y 3 mg/kg una vez a la semana (Q7D x 4). Los ratones recibieron una inyección i.v. de Rituximab (a 3 mg/kg) o una inyección i.v. de GA101 (a 1 y 3 mg/kg) una vez a la semana (D14 (día 0), 21 (día 7), 28 (día 14) y D35 (día 21): Q7D x 4). Los volúmenes tumorales se supervisaron y registraron dos veces a la semana.

25 **Figura 2: Estudio de actividad antitumoral: curvas de volumen tumoral medio (a) y curvas de la mediana del volumen tumoral (b) de ratones portadores de células TMD8 subcutáneas.**

30 Los ratones se xenoinjertaron el D0. La aleatorización se realizó el D14 (400-450 mm³: día 0, como se indica en la figura 2). Los ratones recibieron una administración v.o. del vehículo y compuesto A a 10 mg/kg dos veces al día (Q0,5D x 24) sola o en combinación con una inyección i.v. de GA101/RTX a 1 y 3 mg/kg una vez a la semana (Q7D x 4). Los ratones recibieron una inyección i.v. de Rituximab (a 3 mg/kg) o una inyección i.v. de GA101 (a 3 mg/kg) una vez a la semana (D14 (día 0), 21 (día 7), 28 (día 14) y 35 (día 21): Q7D x 4). Los volúmenes tumorales se supervisaron y registraron dos veces a la semana.

Descripción detallada de la invención

35 La divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD20 afucosilado de isotipo IgG1 o IgG3 con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, para el tratamiento del cáncer en combinación con un inhibidor de la BTK.

40 La divulgación proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado de isotipo IgG1 o IgG3 con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con un inhibidor de la BTK.

45 En un aspecto de la descripción, la cantidad de fucosa está entre un 40 % y un 60 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297.

50 El término "anticuerpo" engloba las diversas formas de anticuerpos que incluyen, pero que no están limitados a, anticuerpos completos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos genomanipulados, como anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos o anticuerpos recombinantes, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que se retengan las propiedades características de acuerdo con la invención. Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición de aminoácidos única. En consecuencia, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una especificidad de unión única que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En un aspecto, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido a partir 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 a una célula inmortal.

60 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, preparado normalmente mediante técnicas de ADN recombinante. Son especialmente preferentes los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana. Dichos anticuerpos quiméricos murinos/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" englobadas por la presente invención son aquellas en las que la clase o subclase se ha modificado o cambiado a partir de la del anticuerpo original. Dichos anticuerpos "quiméricos" también se denominan

5 "anticuerpos de cambio de clase". Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas de ADN recombinante y transfección génica convencionales actualmente bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Morrison, S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; los documentos US 5.202.238 y US 5.204.244.

10 El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que se han modificado la región estructural o las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) para comprender la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina original. En un aspecto preferente de la descripción, se injerta una CDR murina en la región estructural de un anticuerpo humano para preparar el

15 "anticuerpo humanizado". Véanse, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.*, Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S. *et al.*, Nature 314 (1985) 268-270. Las CDR preferentes en particular se corresponden con las que representan secuencias que reconocen los antígenos indicados anteriormente para anticuerpos bi- o multiespecíficos y quiméricos.

20 Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "anticuerpo humano" incluya anticuerpos que tengan 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. in Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). En base a dicha tecnología, se pueden producir anticuerpos expresados frente a una gran variedad de dianas. Los ejemplos de anticuerpos humanos se describen, por ejemplo, en

25 Kellermann, S.A., *et al.*, Curr Opin Biotechnol. 13 (2002) 593-597.

30 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 mediante medios recombinantes, tales como los anticuerpos aislados de una célula huésped, tal como una célula NS0 o CHO, o de un animal (por ejemplo, un ratón) que sea transgénico para los genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped. 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 hipermutación somática *in vivo*. Por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y se relacionan con las secuencias

35 de VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

40 El término "anticuerpo bi- o multiespecífico" como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados aspectos, una de las especificidades de unión es para CD20 y la otra es para cualquier otro antígeno. En determinados aspectos, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítomos diferentes de CD20. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos con respecto a las células que expresan CD20. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

45 Como se usa 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 de plasmón (BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Suecia) con antígeno natural purificado. La afinidad de la unión se define mediante 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). Unión o unión específica significa una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} M o menos, preferentemente de 10^{-8} M a 10^{-13} M (en un aspecto, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). 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^{-8} M a 10^{-13} M (en un aspecto, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

50

55 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 ADN bicatenario.

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

65 La "región variable" (región variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) como se usa en el presente documento indica cualquiera del par de cadenas ligera y pesada que está implicado directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de las cadenas ligera y pesada humanas variables tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones estructurales (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones

determinantes de la complementariedad, CDR). Las regiones estructurales adoptan una conformación de lámina β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional mediante las regiones estructurales y forman, conjuntamente con las CDR de la otra cadena, el sitio de unión a antígeno.

El término "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácido de las "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Las regiones "estructurales" o "FR" son aquellas regiones del dominio variable distintas de los residuos de la región hipervariable como se define en el presente documento. Por lo tanto, las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden, desde el extremo N al C, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Especialmente, el CDR3 de la cadena ligera es la región que más contribuye a la unión a antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición estándar de Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y/o los residuos de un "bucle hipervariable".

El término "anticuerpo afucosilado" se refiere a un anticuerpo de isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente de isotipo IgG1) con un patrón de glucosilación alterado en la región Fc en Asn297 que tiene una cantidad reducida de residuos de fucosa. La glucosilación de IgG1 o IgG3 humana se produce en Asn297 como glucosilación de oligosacáridos complejos biantenarios fucosilados nucleares terminada con hasta 2 residuos Gal. Estas estructuras se designan como los residuos de glucano G0, G1 (α 1,6 o α 1,3) o G2, dependiendo de la cantidad de residuos de Gal terminales (Raju, T.S., BioProcess Int. 1 (2003) 44-53). La glucosilación de tipo CHO de las partes Fc de un anticuerpo se describe, por ejemplo, por Routier, F.H., Glycoconjugate J. 14 (1997) 201-207. Los anticuerpos que se expresan de forma recombinante en células huésped CHO no glucomodificadas normalmente están fucosilados en Asn297 en una cantidad de al menos un 85 %. Se debe entender que el término anticuerpo afucosilado como se usa en el presente documento incluye un anticuerpo que no tiene ninguna fucosa en su patrón de glucosilación. Comúnmente se sabe que la posición del residuo glucosilado típica en un anticuerpo es la asparagina en la posición 297 de acuerdo con el sistema de numeración EU ("Asn297").

En general, se usa el "sistema de numeración EU" o "índice EU" cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU que se informa en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

Por tanto, un anticuerpo afucosilado para su uso 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 de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) 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 aspecto de la descripción, la cantidad de fucosa está entre un 40 % y un 60 % de los oligosacáridos de la región Fc en Asn297. En otro aspecto de la descripción, la cantidad de fucosa es de un 50 % o menos, y todavía en otro aspecto de la descripción, la cantidad de fucosa es de un 30 % o menos de los oligosacáridos de la región Fc en Asn297. La "cantidad de fucosa" significa la cantidad de dicho oligosacárido (fucosa) en la cadena de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297 en relación con la suma de todos los oligosacáridos (glúcidos) acoplados a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) medida mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y calculada como valor promedio (para un procedimiento detallado para determinar la cantidad de fucosa, véase, por ejemplo, el documento WO 2008/077546). Además, en un aspecto de la descripción, los oligosacáridos de la región Fc están bisecados. El anticuerpo afucosilado para su uso de acuerdo con la invención se puede expresar en una célula huésped glucomodificada genomanipulada 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 aspecto de la descripción, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión. De forma alternativa, se puede disminuir o eliminar la actividad α 1,6-fucosiltransferasa de la célula huésped de acuerdo con el documento US 6.946.292 para generar células huésped glucomodificadas. La cantidad de fucosilación del anticuerpo se puede predeterminar, por ejemplo, mediante condiciones de fermentación (por ejemplo, tiempo de fermentación) o bien mediante combinación de al menos dos anticuerpos con diferente cantidad de fucosilación. Dichos anticuerpos afucosilados y respectivos procedimientos de glucomanipulación se describen en los documentos WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana, 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 glucomanipulados tienen una ADCC incrementada. Otros procedimientos de glucomanipulación que proporcionan 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; los documentos WO 03/055993 o US 2005/0249722.

Por tanto, un aspecto de la descripción es 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 (glúcidos) en Asn297, para el tratamiento del cáncer en combinación con un inhibidor de la BTK. Otro aspecto de la descripción 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 (glúcidos) en Asn297, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con un inhibidor de la BTK. En un aspecto de la descripción, la cantidad de fucosa está entre un 60 % y un 20 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297. En un aspecto de la descripción, la cantidad de fucosa está entre un 60 % y un 40 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297. En un aspecto de la descripción, la cantidad de fucosa es de un 0 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297.

CD20 (también conocido como antígeno CD20 de los linfocitos B, antígeno de superficie de los linfocitos B B1, Leu-16, Bp35, BM5 y LF5; la secuencia se caracteriza por la entrada en la base de datos SwissProt P11836) es una proteína transmembranaria hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD localizada en los linfocitos pre-B y B maduros (Valentine, M.A. *et al.*, J. Biol. Chem. 264 (1989) 11282-11287; Tedder, T.F., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (1988) 208-212; Stamenkovic, I., *et al.*, J. Exp. Med. 167 (1988) 1975-1980; Einfeld, D.A., *et al.*, EMBO J. 7 (1988) 711-717; Tedder, T.F., *et al.*, J. Immunol. 142 (1989) 2560-2568). El gen humano correspondiente es el de 4 dominios que atraviesan la membrana, subfamilia A, miembro 1, también conocido como MS4A1. Este gen codifica un miembro de la familia de genes 4A que atraviesan la membrana. Los miembros de esta familia de proteínas naciescentes se caracterizan por rasgos característicos estructurales comunes y límites de ajuste entre intrones/exones similares y presentan patrones de expresión únicos entre células hematopoyéticas y tejidos no linfáticos. Este gen codifica la molécula de superficie de los linfocitos B que desempeña un papel en el desarrollo y diferenciación de los linfocitos B en las células plasmáticas. Este miembro de la familia se localiza en 11q12, entre un grupo de miembros de la familia. El ajuste alternativo de este gen da como resultado dos variantes de transcripción que codifican la misma proteína.

Los términos "CD20" y "antígeno CD20" se usan de manera intercambiable en el presente documento e incluyen cualquier variante, isoforma y homólogo de especie del CD20 humano que se expresen de forma natural por células o se expresen en células transfectadas con el gen CD20. La unión de un anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención al antígeno CD20 media en la destrucción de las células que expresan CD20 (por ejemplo, una célula tumoral) inactivando CD20. La destrucción de las células que expresan CD20 se puede producir mediante uno o más de los siguientes mecanismos: inducción de la muerte de las células/apoptosis, ADCC y CDC.

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

El término "anticuerpo anti-CD20" como se usa en la invención es un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD20. Dependiendo de las propiedades de unión y 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 de tipo II) de acuerdo con Cragg, M.S., *et al.*, Blood 103 (2004) 2738-2743; y Cragg, M.S., *et al.*, Blood 101 (2003) 1045-1052, véase la tabla 1.

Tabla 1: 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 de CD20 de tipo I	epítipo de CD20 de tipo II
Localizan CD20 en balsas lipídicas	No localizan CD20 en balsas lipídicas
CDC incrementada (en caso de isotipo IgG1)	CDC disminuida (en caso de isotipo IgG1)
actividad de ADCC (en caso de isotipo IgG1)	actividad de ADCC (en caso de isotipo IgG1)
Capacidad de unión completa	Capacidad de unión reducida
Agregación homotípica	Agregación homotípica más fuerte
Inducción de la apoptosis tras la reticulación	Fuerte inducción de la muerte de las células sin reticulación

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

Los ejemplos de anticuerpos anti-CD20 de tipo I incluyen, por ejemplo, rituximab, IgG3 HI47 (ECACC, hibridoma), IgG1 2C6 (como se divulga en el documento WO 2005/103081), IgG1 2F2 (como se divulga en los documentos WO 2004/035607 y WO 2005/103081) e IgG1 2H7 (como se divulga en el documento WO 2004/056312).

Los anticuerpos anti-CD20 afucosilados de acuerdo con la descripción, en un aspecto de la descripción, son un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, en otro aspecto de la descripción, un anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado.

Los anticuerpos anti-CD20 afucosilados para su uso de acuerdo con la invención tienen una citotoxicidad celular

dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada, a diferencia de los anticuerpos anti-CD20 que no tienen ninguna cantidad reducida de fucosa.

Por "anticuerpo anti-CD20 afucosilado con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada" se entiende un anticuerpo anti-CD20 afucosilado, como se define el término en el presente documento, que tiene una ADCC incrementada como se determina mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica. Un ensayo de ADCC *in vitro* aceptado es como sigue:

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

2) el ensayo usa células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas, aisladas de la sangre de un donante sano elegido al azar, como células efectoras;

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

i) las PBMC se aíslan usando procedimientos de centrifugación por densidad estándar y se suspenden a 5×10^6 células/ml en medio de cultivo celular RPMI;

ii) las células diana se cultivan mediante procedimientos de cultivo tisular estándar, se recogen de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad más alta de un 90 %, se lavan en medio de cultivo celular RPMI, se marcan con 100 microcurios de ^{51}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) 100 microlitros de la suspensión de células diana final anterior se transfieren a cada pocillo de una placa de microvaloración 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 microvaloración de 96 pocillos, sometiendo a prueba por triplicado diversas concentraciones de anticuerpo que abarcan todo el intervalo de concentraciones anterior;

v) para los controles de liberación máxima (MR), 3 pocillos adicionales en la placa que contiene las células diana marcadas reciben 50 microlitros de una solución acuosa al 2 % (VN) de 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 en la placa que contiene las células diana marcadas reciben 50 microlitros de medio de cultivo celular RPMI en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);

vii) a continuación, la placa de microvaloración de 96 pocillos se centrifuga a $50 \times g$ durante 1 minuto y se incuba durante 1 hora a 4°C ;

viii) 50 microlitros de la suspensión de PBMC (punto i anterior) se añaden a cada pocillo para proporcionar una proporción de células efectoras:diana de 25:1 y las placas se disponen en una estufa de incubación en una atmósfera con un 5 % de CO_2 a 37°C durante 4 horas;

ix) el sobrenadante libre de células de cada pocillo se recoge y la radioactividad liberada experimentalmente (ER) se cuantifica usando un contador gamma;

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

4) la "ADCC incrementada" se define como tanto un incremento del porcentaje máximo de lisis específica observado en el intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a prueba anterior y/o como una reducción de la concentración de anticuerpo requerida para lograr la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observado en el intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a prueba anterior. El incremento de la ADCC es relativo a la ADCC, medida con el ensayo anterior, mediada por el mismo anticuerpo, producido por el mismo tipo de células huésped, usando los mismos procedimientos estándar de producción, purificación, formulación y almacenamiento, que son conocidos por los expertos en la técnica, pero que no se ha producido por células huésped genomanipuladas para sobreexpresar GnTIII.

Se puede obtener dicha "ADCC incrementada" glucomanipulando dichos anticuerpos, lo que significa potenciar

dichas funciones efectoras naturales mediadas por células de los anticuerpos monoclonales genomaniplando su componente oligosacárido como se describe en Umana, P., *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 y el documento US 6.602.684.

5 El término "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" se refiere a la lisis de las células diana tumorales humanas por el anticuerpo de acuerdo con la invención en presencia del complemento. La CDC se mide preferentemente mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan CD20 con un anticuerpo anti-CD20 de acuerdo con la invención en presencia del complemento. Se encuentra la CDC si el anticuerpo induce, a una concentración de 100 nM, la lisis (muerte de las células) de un 20 % o más de las células tumorales después de 4 horas. El ensayo se realiza preferentemente con células tumorales marcadas con ⁵¹Cr o Eu y medición de ⁵¹Cr o Eu liberado. Los controles incluyen la incubación de las células diana tumorales con complemento, pero sin el anticuerpo.

15 El anticuerpo "rituximab" (anticuerpo de referencia; ejemplo de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I) es un dominio constante murino gamma 1 humano quimérico genomaniplado que contiene un anticuerpo monoclonal dirigido frente al antígeno CD20 humano.

20 El anticuerpo "rituximab" (anticuerpo de referencia; ejemplo de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I) es un dominio constante murino gamma 1 humano quimérico genomaniplado que contiene un anticuerpo monoclonal dirigido frente al antígeno CD20 humano. Este anticuerpo quimérico contiene dominios constantes gamma 1 humanos y se identifica con el nombre de "C2B8" en el documento US 5.736.137 (Anderson *et. al.*) publicado el 17 de abril de 1998, asignado a IDEC Pharmaceuticals Corporation. Rituximab está aprobado para el tratamiento de pacientes con linfoma no hodgkiniano de linfocitos B, positivo para CD20, de escasa malignidad o folicular y recidivante o resistente al tratamiento. Los estudios *in vitro* del mecanismo de acción han demostrado que rituximab presenta citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) humano (Reff, M.E., *et. al.*, Blood 83 (1994) 435-445). Adicionalmente, presenta una actividad significativa en ensayos que miden la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Rituximab no está afucosilado.

Tabla 2

30

Anticuerpo	Cantidad de fucosa
Rituximab (no afucosilado)	>85 %
B-Ly1 humanizado glucomaniplado afucosilado (B-HH6-B-KV1) natural (no afucosilado)	>85 %
B-Ly1 humanizado glucomaniplado afucosilado (B-HH6-B-KV1 GM)	45-50 %

35 El término "anticuerpo B-Ly1 humanizado" se refiere a un anticuerpo B-Ly1 humanizado, como se divulga en los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875, que se obtuvo a partir del anticuerpo anti-CD20 monoclonal murino B-Ly1 (región variable de la cadena pesada (VH) murina: SEQ ID NO:1; región variable de la cadena ligera (VL) murina: SEQ ID NO:2 (véase Poppema, S. y Visser, L., Biotest Bulletin 3 (1987) 131-139) mediante quimerización con un dominio constante humano de IgG1 y seguido de 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.

40 En un aspecto de la descripción, el "anticuerpo B-Ly1 humanizado" tiene una región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada del grupo de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:19 (B-HH2 a B-HH9 y B-HL8 a B-HL17 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). En un aspecto específico de la descripción, dicho dominio variable se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:15 (B-HH2, BHH-3, B-HH6, B-HH8, B-HL8, B-HL11 y B-HL13 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). En un aspecto específico de la descripción, 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 aspecto específico de la descripción, 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 aspecto de la descripción, el anticuerpo B-Ly1 humanizado es un anticuerpo IgG1. Dichos anticuerpos B-Ly1 humanizados afucosilados para su uso de acuerdo con la invención se glucomaniplan (GM) en la región Fc de acuerdo con los procedimientos descritos en los documentos WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana, P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 y WO 99/154342. En un aspecto de la descripción, el B-Ly1 humanizado glucomaniplado afucosilado es B-HH6-B-KV1 GM. En un modo de realización, el anticuerpo anti-CD20 es obinutuzumab (DCI recomendada, WHO Drug Information, vol. 26, n.º 4, 2012, p. 453). Como se usa en el presente documento, obinutuzumab es sinónimo de GA101. El nombre comercial es GAZYVA. El documento WHO Drug Information reemplaza todas las versiones previas (por ejemplo, vol. 25, n.º 1, 2011, p. 75-76) y es conocido antiguamente

como afutuzumab (DCI recomendada, WHO Drug Information, vol. 23, n.º 2, 2009, p. 176; vol. 22, n.º 2, 2008, p. 124).

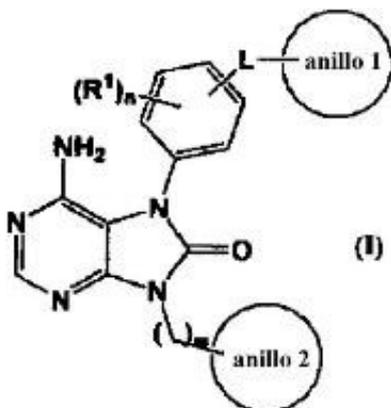
5 BTK como se usa en el presente documento es la "tirosina cinasa de Bruton" o "tirosina cinasa de agammaglobulinemia de Bruton" (abreviada Btk o BTK), que es un miembro de la familia TEC de cinasas. El gen BTK codifica la proteína BTK, que es fundamental para el desarrollo y la maduración de los linfocitos B como activación de los mastocitos a través del receptor de IgE de afinidad alta. El gen BTK se localiza en el cromosoma X. Se han identificado más de 400 mutaciones del gen BTK.

10 El término "inhibidor de la BTK" se refiere a agentes que previenen la actividad cinasa de BTK con una CI50 de 0,001 μ M a aproximadamente 2 μ M, en un aspecto, con 0,002 μ M a aproximadamente 2 μ M. En un aspecto, los inhibidores de la BTK son anticuerpos, oligonucleótidos antisentido, péptidos.

15 En otro aspecto, los inhibidores de la BTK son compuestos de peso molecular pequeño con un peso molecular (PM) de menos de 1500 dalton (Da).

En un aspecto, dichos compuestos inhibidores de la BTK de peso molecular pequeño son los compuestos descritos en los documentos WO2011/152351 y WO2013/081016.

20 En un aspecto, un compuesto inhibidor de la BTK de peso molecular pequeño de acuerdo con la invención se caracteriza por la fórmula general (I)



25 En la fórmula, L representa (1) -O-, (2) -S-, (3) -SO-, (4) -SO₂-, (5) -NH-, (6) -C(O)-, (7) -CH₂-O-, (8) -O-CH₂-, (9) -CH₂- o (10) -CH(OH)-;

R¹ representa (1) un átomo de halógeno, (2) un grupo alquilo C₁₋₄, (3) un grupo alcoxi C₁₋₄, (4) un grupo haloalquilo C₁₋₄ o (5) un grupo haloalcoxi C₁₋₄;

30 el anillo 1 representa un grupo cíclico de 4 a 7 miembros, que puede estar sustituido con de uno a cinco sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en (1) átomos de halógeno, (2) grupos alquilo C₁₋₄, (3) grupos alcoxi C₁₋₄, (4) nitrilo, (5) grupos haloalquilo C₁₋₄ y (6) grupos haloalcoxi C₁₋₄, en el que cuando están presentes dos o más sustituyentes en el anillo 1, estos sustituyentes pueden formar un grupo cíclico de 4 a 7 miembros conjuntamente con los átomos en el anillo 1 al que están enlazados estos sustituyentes;

35 el anillo 2 representa un heterociclo saturado de 4 a 7 miembros, que puede estar sustituido con de uno a tres -K-R²;

40 K representa (1) un enlace, (2) un alquileo C₁₋₄, (3) -C(O)-, (4) -C(O)-CH₂-, (5) -CH₂-C(O)-, (6) -C(O)O- o (7) -SO₂- (en los que el enlace a la izquierda está enlazado al anillo 2);

45 R² representa (1) un alquilo C₁₋₄, (2) un alquenido C₂₋₄ o (3) un grupo alquínilo C₂₋₄, cada uno de los cuales puede estar sustituido con de uno a cinco sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en (1) NR³R⁴, (2) átomos de halógeno, (3) CONR⁵R⁶, (4) CO₂R⁷ y (5) OR⁸;

R³ y R⁴ representan cada uno independientemente (1) un átomo de hidrógeno o (2) un grupo alquilo C₁₋₄ que puede estar sustituido con OR⁹ o CONR¹⁰R¹¹;

50 R³ y R⁴, conjuntamente con el átomo de nitrógeno al que están enlazados, pueden formar un heterociclo saturado nitrogenado de 4 a 7 miembros, que puede estar sustituido con un grupo oxo o un grupo hidroxilo;

R⁵ y R⁶ representan cada uno independientemente (1) un átomo de hidrógeno, (2) un grupo alquilo C₁₋₄ o (3) un grupo fenilo;

R⁷ representa (1) un átomo de hidrógeno o (2) un grupo alquilo C₁₋₄;

R⁸ representa (1) un átomo de hidrógeno, (2) un grupo alquilo C₁₋₄, (3) un grupo fenilo o (4) un grupo benzotriazolilo;

R⁹ representa (1) un átomo de hidrógeno o (2) un grupo alquilo C₁₋₄;

R¹⁰ y R¹¹ representan cada uno independientemente (1) un átomo de hidrógeno o (2) un grupo alquilo C₁₋₄;

n representa un número entero de 0 a 4;

m representa un número entero de 0 a 2; y

cuando n es dos o más, los R¹ pueden ser iguales entre sí o pueden ser diferentes entre sí),

un isómero óptico de los mismos o su mezcla, una sal de los mismos, un solvato de los mismos, un N-óxido de los mismos o un profármaco de los mismos;

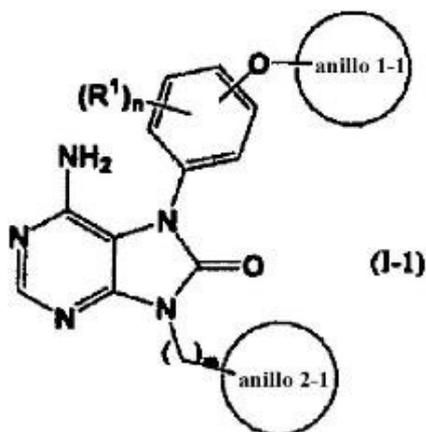
[2] el compuesto de acuerdo con [1] anterior, en el que R² es un grupo alquenilo C₂₋₄ o un grupo alquinilo C₂₋₄, cada uno de los cuales puede estar sustituido con de uno a cinco sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en (1) NR³R⁴, (2) átomos de halógeno, (3) CONR⁵R⁶, (4) CO₂R⁷ y (5) OR⁸;

[3] el compuesto de acuerdo con [1] anterior, en el que el anillo 1 es un anillo de benceno, ciclohexano o piridina, cada uno de los cuales puede estar sustituido con de uno a cinco sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en (1) átomos de halógeno, (2) grupos alquilo C₁₋₄, (3) grupos alcoxi C₁₋₄, (4) nitrilo y (5) CF₃;

[4] el compuesto de acuerdo con [1] anterior, en el que el anillo 2 es un heterociclo saturado nitrogenado de 4 a 7 miembros, que puede estar sustituido con de uno a tres -K-R²;

[5] el compuesto de acuerdo con [4] anterior, en el que el heterociclo saturado nitrogenado de 4 a 7 miembros es un anillo de azetidina, pirrolidina o piperidina;

[6] el compuesto de acuerdo con [1] anterior, representado mediante la fórmula general (I-1)



En la fórmula, el anillo 1-1 representa un anillo de benceno, ciclohexano o piridina, cada uno de los cuales puede estar sustituido con de uno a cinco sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en (1) átomos de halógeno, (2) grupos alquilo C₁₋₄, (3) grupos alcoxi C₁₋₄, (4) nitrilo y (5) CF₃, y el anillo 2-1 representa un heterociclo saturado nitrogenado de 4 a 7 miembros, que puede estar sustituido con de uno a tres -K-R², en el que los demás símbolos tienen las mismas definiciones que anteriormente);

[7] el compuesto de acuerdo con [6] anterior, en el que R² es un grupo alquenilo C₂₋₄ o un grupo alquinilo C₂₋₄, cada uno de los cuales puede estar sustituido con de uno a cinco sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en (1) NR³R⁴, (2) átomos de halógeno, (3) CONR⁵R⁶, (4) CO₂R⁷ y (5) OR⁸;

[8] el compuesto de acuerdo con [1] anterior, que es (1) 9-(1-acriloil-3-azetidil)-6-amino-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (2) 6-amino-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (3) 9-[(1-acriloil-4-piperidinil)metil]-6-amino-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (4) 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (5) 6-amino-9-[(3S)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (6) 6-amino-7-[4-(3-clorofenoxi)fenil]-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (7) 6-amino-9-[1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona u (8) 6-amino-9-[(1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o un isómero óptico de los mismos o su mezcla;

Preferentemente, el inhibidor de la BTK de acuerdo con la invención es 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal de la misma.

La preparación del inhibidor de la BTK para su uso de acuerdo con la invención se lleva a cabo como se divulga en el documento WO2011/152351.

"Sal" se refiere a las sales de los compuestos como una sal farmacéuticamente aceptable. Dichas sales se pueden ejemplificar mediante las sales con metales alcalinos (potasio, sodio y similares), sales con metales alcalinotérreos (calcio, magnesio y similares), la sal de amonio, sales con aminos orgánicas farmacéuticamente aceptables (tetrametilamonio, trietilamina, metilamina, dimetilamina, ciclopentilamina, bencilamina, fenetilamina, piperidina, monoetanolamina, dietanolamina, tris(hidroximetil)aminometano, lisina, arginina, N-metil-D-glucamina y similares), y sales de adición de ácidos (sales de ácidos inorgánicos (el clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, fosfato, nitrato y similares) y sales de ácidos orgánicos (el acetato, trifluoroacetato, lactato, tartrato, oxalato, fumarato, maleato, benzoato, citrato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, isetionato, glucuronato, gluconato y similares)).

La "CI50" se refiere a la concentración de un compuesto particular requerida para inhibir un 50 % de una actividad medida específica. La CI50 de los inhibidores de la BTK que inhiben la actividad cinasa de BTK se puede medir, entre otros, como se describe posteriormente.

Ensayo de actividad *in vitro* para la determinación de la CI50 de un inhibidor de la BTK:

Se midió la actividad inhibidora de la enzima Btk en base al protocolo proporcionado por el fabricante, usando Btk (Invitrogen Corporation) y el kit de ensayo para cinasas Z'-LYTE™-péptido Tyr1 (Invitrogen Corporation), que contenía los siguientes reactivos: péptido Tyr-1, fosfopéptido Thy-1, tampón cinasa 5x, ATP, reactivo de desarrollo B, tampón de desarrollo y reactivo de detención. Se distribuyeron 5 µl/pocillo de una solución de un inhibidor de la BTK diluida con dimetilsulfóxido (DMSO), o DMSO, y 10 µl/pocillo de la solución de mezcla de sustrato/enzima en una placa de ensayo de 96 pocillos y se llevó a cabo una reacción durante 20 minutos a 30 °C. Se preparó la solución de mezcla de sustrato/enzima mediante dilución con el tampón cinasa (DL-ditiotreitol (DTT, 2,7 mM), tampón cinasa 1,33x) para proporcionar una concentración final para el péptido Tyr-1 de 4 µM y una concentración de Btk final de 5 nM. A continuación, se añadieron 5 µl/pocillo de trifosfato de adenosina (ATP, concentración final = 36 µM) y se llevó a cabo una reacción durante 1 hora a 30 °C. Después del final de la reacción, se añadieron 10 µl de una solución de desarrollo, proporcionada diluyendo el reactivo de desarrollo B a 128x usando el tampón de desarrollo, y se llevó a cabo una reacción durante 1 hora adicional a 30 °C. A continuación, se detuvo la reacción enzimática añadiendo 10 µl de la solución de detención. Se midió la intensidad de fluorescencia a 445 nm y 520 nm en cada pocillo usando un lector de placas de fluorescencia Fusion Universal Microplate Analyzer (PerkinElmer Inc.). Se determinó el porcentaje de fosforilación usando la proporción de la emisión a 445 nm (emisión de cumarina) con respecto a la emisión a 520 nm (emisión de fluoresceína) de acuerdo con el protocolo proporcionado con el kit.

El porcentaje de inhibición (%) mediante un inhibidor de la BTK se calculó usando la siguiente ecuación.

porcentaje de inhibición (%) de la fosforilación = $1 - \frac{(AC - AX)}{(AC - AB)} \times 100$

AX : % de fosforilación cuando se ha añadido un inhibidor de la BTK

AB : % de fosforilación en ausencia de adición de ATP (blanco)

AC : % de fosforilación cuando solo se ha añadido DMSO (control)

Se determinó el valor de inhibición del 50 % (valor de CI50) para un inhibidor de la BTK a partir de la curva de inhibición en base al % de inhibición a cada concentración de un inhibidor de la BTK.

El componente oligosacárido puede afectar significativamente a las propiedades pertinentes a la eficacia de una glucoproteína terapéutica, incluyendo la estabilidad física, la resistencia al ataque por 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, sino también de las estructuras específicas de los oligosacáridos. Se pueden realizar algunas generalizaciones entre la estructura de oligosacárido y la función de la glucoproteína. Por ejemplo, determinadas estructuras de oligosacárido median en el rápido aclaramiento de la glucoproteína de la circulación sanguínea a través de interacciones con proteínas de unión a carbohidrato específicas, mientras que otras se pueden unir mediante anticuerpos y desencadenar reacciones inmunitarias no deseadas (Jenkins, N., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-981).

Las células de mamífero son huéspedes excelentes para la producción de glucoproteínas terapéuticas debido a su capacidad de glucosilar proteínas en la forma más compatible para su aplicación en seres humanos (Cumming, D.A., *et al.*, *Glycobiology* 1 (1991) 115-130; Jenkins, N., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-981). Las bacterias casi nunca glucosilan proteínas y, como otros tipos de huéspedes comunes, tales como levaduras, hongos filamentosos, células vegetales y de insecto, proporcionan patrones de glucosilación asociados con el rápido aclaramiento de la circulación sanguínea, interacciones inmunitarias no deseables y, en algunos casos específicos, una actividad biológica reducida. Entre las células de mamífero, más comúnmente se han usado las células de ovario de hámster chino (CHO) durante las últimas dos décadas. Además de proporcionar patrones de glucosilación adecuados, estas células permiten la generación consistente de líneas de células clonales genéticamente estables y altamente productivas. Se pueden cultivar a densidades altas en biorreactores simples usando medios libres de suero y permiten el desarrollo de bioprocedimientos seguros y reproducibles. Otras células animales comúnmente usadas incluyen las células de riñón de cría de hámster (BHK), las células de mieloma de ratón NS0 y SP2/0. Más recientemente, también se ha sometido a prueba la producción de animales transgénicos (Jenkins, N., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-981).

Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidrato en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada, poseyendo cada isotipo un conjunto distinto de estructuras de carbohidrato unido a N, que afectan de forma variable al ensamblaje, secreción o actividad funcional de las proteínas (Wright, A., y Morrison, S.L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). La estructura del carbohidrato unido a N acoplado varía considerablemente dependiendo del grado de procesamiento 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 procesamiento heterogéneo de las estructuras de oligosacárido nuclear acopladas en un sitio de glucosilación particular, de tal manera que incluso los anticuerpos monoclonales existan como glucoformas múltiples. Asimismo, se ha demostrado que se producen diferencias importantes en la glucosilación de anticuerpos entre líneas de células e incluso se observan diferencias leves para una línea de células dada cultivada en condiciones de cultivo diferentes (Lifely, M.R., *et al.*, *Glycobiology* 5 (1995) 813-822).

Una forma de obtener grandes incrementos de la potencia, mientras se mantiene un procedimiento de producción simple y se evitan potencialmente los efectos secundarios no deseables significativos, es potenciar las funciones efectoras naturales mediadas por células de los anticuerpos monoclonales genomaniplando su componente oligosacárido como se describe en Umana, P. *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 y el documento US 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos más comúnmente usados en la inmunoterapia contra el cáncer, son glucoproteínas que tienen un sitio de glucosilación unido a N conservado en Asn297 de cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos acoplados a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, formando extensos contactos con la cadena principal polipeptídica, y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie en las funciones efectoras, tales como 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).

Se demostró previamente que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII γ "), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisecados, incrementa significativamente la actividad en ADCC *in vitro* de un anticuerpo antineuroblastoma monoclonal quimérico (chCE7) producido por las células CHO genomanipladas (véase Umana, P. *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180; y el documento WO 99/154342). El anticuerpo chCE7 pertenece a una gran clase de anticuerpos monoclonales no conjugados que tienen afinidad y especificidad tumorales altas, pero tienen muy poca potencia para ser útiles clínicamente cuando se producen en líneas de células industriales estándar que carecen de la enzima GnTIII (Umana, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180). Este estudio fue el primero en demostrar que se podían obtener grandes incrementos de la actividad en ADCC genomaniplando las células productoras de anticuerpos para expresar GnTIII, lo que también dio lugar a un incremento de la proporción de oligosacáridos bisecados asociados a la región constante (Fc), incluyendo oligosacáridos bisecados no fucosilados, por encima de las cantidades encontradas en anticuerpos naturales.

El término "cáncer" como se usa en el presente documento incluye linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de pulmón de tipo bronquioloalveolar, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de

5 cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula 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 de la médula espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma hipofisario, incluyendo las 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.

15 El término "expresión del antígeno CD20" pretende indicar un nivel de expresión significativo del antígeno CD20 en una célula, preferentemente en la superficie celular de un linfocito T o B, más preferentemente un linfocito B, de un tumor o cáncer, respectivamente, preferentemente una neoplasia hematológica. Se pueden determinar los pacientes que tienen un "cáncer que expresa CD20" mediante ensayos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede medir la expresión del antígeno CD20 usando detección inmunohistoquímica (IHQ), FACS o por medio de detección basada en PCR del ARNm correspondiente.

20 El término "cáncer que expresa CD20" como se usa 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 como se usa en el presente documento se refiere a linfomas (preferentemente linfomas no hodgkinianos (LNH) de linfocitos B) y leucemias linfocíticas. Dichos linfomas y leucemias linfocíticas incluyen, por ejemplo, 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 la zona marginal (incluyendo linfoma de linfocitos B de la zona marginal extraganglionar (linfomas de tejido linfático asociado a mucosa, TLAM), linfoma de linfocitos B de la zona marginal ganglionar y linfoma de la zona marginal esplénica), d) linfoma de células del manto (LCM), e) linfoma de células grandes (incluyendo linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), linfoma difuso de células mixtas, linfoma inmunoblástico, linfoma primario mediastínico de linfocitos B, linfoma angiocéntrico-linfoma pulmonar de linfocitos B, f) tricoleucemia, g) linfoma linfocítico, macroglobulinemia de Waldenström, 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, mieloma múltiple, plasmocitoma, j) enfermedad de Hodgkin.

35 En un modo de realización, el cáncer que expresa CD20 es un linfoma no hodgkiniano (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 (DLBCL), linfoma de Burkitt, tricoleucemia, linfoma folicular, mieloma múltiple, linfoma de la zona marginal, trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante (PTLD), linfoma asociado al VIH, macroglobulinemia de Waldenström o linfoma primario del SNC.

40 El término "un procedimiento de tratamiento" o sus equivalentes, cuando, por ejemplo, se aplica al cáncer, se refiere a un procedimiento o acción que está diseñado para reducir o eliminar el número de células cancerosas en un paciente o para aliviar los síntomas de un cáncer. "Un procedimiento de tratamiento" del cáncer u otro trastorno proliferativo no significa necesariamente que las células cancerosas u otro trastorno se eliminarán realmente, que el número de células o trastorno se reducirán realmente o que los síntomas de un cáncer u otro trastorno se aliviarán realmente. A menudo, un procedimiento de tratamiento del cáncer se realizará incluso con una probabilidad de éxito baja, pero, dados los antecedentes médicos y la expectativa de supervivencia estimada de un paciente, se considera, no obstante, que induce una acción beneficiosa global.

50 Los términos "combinación", "coadministración" o "coadministrar" se refieren a la administración de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho inhibidor de la BTK como dos formulaciones separadas (o como una formulación única). La coadministración puede ser simultánea o secuencial en cualquier orden, en la que preferentemente existe un periodo de tiempo durante el que ambos (o todos los) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Dicho anticuerpo afucosilado anti-CD20 y dicho inhibidor de la BTK se coadministran simultánea o bien secuencialmente (por ejemplo, por vía intravenosa (i.v.) a través de una infusión continua (una para el anticuerpo anti-CD20 y finalmente una para dicho inhibidor de la BTK; o, por ejemplo, el anticuerpo anti-CD20 se administra por vía intravenosa (i.v.) a través de una infusión continua y dicho inhibidor de la BTK se administra por vía oral). Cuando ambos agentes terapéuticos se coadministran secuencialmente, la dosis se administra el mismo día en dos administraciones separadas o bien uno de los agentes se administra el día 1 y el segundo se coadministra del día 2 al día 7, preferentemente del día 2 al 4. Por tanto, en un aspecto, el término "secuencialmente" significa en los 7 días después de la dosis del primer componente (anticuerpo anti-CD20 o inhibidor de la BTK), preferentemente en los 4 días después de 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 dicho inhibidor de la BTK significa que las dosis de mantenimiento también se pueden coadministrar simultáneamente, si el ciclo de tratamiento es apropiado para ambos fármacos, por ejemplo, cada semana. O el inhibidor de la BTK se administra, por ejemplo, cada primer a

tercer día y dicho anticuerpo afucosilado se administra cada semana. O las dosis de mantenimiento se coadministran secuencialmente, en uno o bien en varios días.

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

10 La cantidad de coadministración de dicho anticuerpo afucosilado anti-CD20 y dicho inhibidor de la BTK y el tiempo de coadministración dependerán del tipo (especie, sexo, edad, peso, etc.) y estado del paciente que se va a tratar y la gravedad de la enfermedad o afección que se trata. Dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho inhibidor de la BTK se coadministran adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos, por ejemplo, el mismo día o al día siguiente.

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

20 Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 0,1 mg/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 dicho inhibidor de la BTK es una dosificación experimental inicial para la coadministración de ambos fármacos al paciente. En un aspecto, la dosificación preferente de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado (preferentemente el anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado, más preferentemente obinutuzumab) estará en el intervalo de
25 aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg. Por tanto, se pueden 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 aspecto, la dosificación preferente de dicho inhibidor de la BTK (preferentemente 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal de la misma) estará en el
30 intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg. Por tanto, se pueden 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).

35 Dependiendo del tipo (especie, sexo, edad, peso, etc.) y estado del paciente y del tipo de anticuerpo anti-CD20 afucosilado, preferentemente el anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado, más preferentemente obinutuzumab, la dosificación y la pauta posológica de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado puede diferir de dicho inhibidor de la BTK. Por ejemplo, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado se puede administrar, por ejemplo, cada una a tres semanas y dicho inhibidor de la BTK 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.

40 En un aspecto, la dosificación preferente de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado (preferentemente el anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado, más preferentemente obinutuzumab) será de 800 a 1600 mg (en un aspecto, de 800 a 1200 mg) el día 1, 8, 15 de un ciclo de dosificación de 3 a 6 semanas y, a continuación, en una dosificación de 400 a 1200 (en un aspecto, de 800 a 1200 mg el día 1 de hasta nueve ciclos de dosificación de 3 a 4 semanas).

45 En un aspecto, la dosis para dicho inhibidor de la BTK seleccionado del grupo que consiste en: (1) 9-(1-acriloil-3-azetidil)-6-amino-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (2) 6-amino-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (3) 9-[(1-acriloil-4-piperidinil)metil]-6-amino-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (4) 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (5) 6-amino-9-[(3S)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (6) 6-amino-7-[4-(3-clorofenoxi)fenil]-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (7) 6-amino-9-[1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona y (8) 6-amino-9-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona es como sigue. La dosis para dicho inhibidor de la BTK seleccionado del grupo de un isómero óptico de dichos compuestos (1) a (8) y la mezcla de los mismos es como sigue. La dosis para dicho inhibidor de la BTK
55 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal de la misma es como sigue. Dicha dosis de acuerdo con la invención es de 10 mg/kg a 70 mg/kg, preferentemente de 20 mg/kg a 55 mg/kg, una vez diariamente o cada dos días como administración oral.

60 La dosis recomendada puede variar si existe otra coadministración de agente quimioterápico y se basa en el tipo de agente quimioterápico.

65 En un modo de realización, la presente invención es útil para prevenir o reducir las metástasis u otra diseminación en dicho paciente que padece cáncer, preferentemente un cáncer que expresa CD20. La presente invención es útil para incrementar la duración de la supervivencia de dicho paciente, incrementar la supervivencia sin progresión de dicho paciente, incrementar la duración de la respuesta, dando como resultado una mejora estadísticamente significativa y clínicamente valiosa del paciente tratado como se mide mediante la duración de la supervivencia, la

supervivencia sin progresión, la tasa de respuesta o la duración de la respuesta. En un modo de realización preferente, la presente invención es útil para incrementar la tasa de respuesta en un grupo de pacientes.

En el contexto de la presente invención, otros agentes citotóxicos, quimioterápicos o antineoplásicos adicionales, o compuestos o radiación ionizante que potencian los efectos de dichos agentes (por ejemplo, citocinas) se pueden usar en la politerapia con el anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho inhibidor de la BTK del cáncer. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que sean eficaces para el propósito pretendido. En un aspecto de la descripción, dicha politerapia con anticuerpo anti-CD20 afucosilado, preferentemente el anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado, más preferentemente obinutuzumab del modo de realización, y dicho inhibidor de la BTK se usa sin dichos agentes citotóxicos, quimioterápicos o antineoplásicos adicionales, o compuestos que potencian los efectos de dichos agentes adicionales.

Dichos agentes adicionales incluyen, por ejemplo: agentes alquilantes o agentes con una acción alquilante, tales como ciclofosfamida (CTX; por ejemplo, cytoxan®), clorambucilo (CHL; por ejemplo, leukeran®), cisplatino (CisP; por ejemplo, platino®), busulfano (por ejemplo, myleran®), melfalán, carmustina (BCNU), estreptozocina, trietilenomelamina (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-fluorouracilo (5-FU), capecitabina (por ejemplo, Xeloda®), dacarbazina (DTIC) y similares; antibióticos, tales como actinomicina D, doxorubicina (DXR; por ejemplo, adriamycin®), daunorubicina (daunomicina), bleomicina, mitramicina y similares; alcaloides, tales como 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 corticoesteroides, tales como prednisona, inhibidores enzimáticos nucleosídicos, tales como hidroxiaurea, enzimas que degradan aminoácidos, tales como asparaginasa, ácido fólico y otros derivados del ácido fólico y diversos agentes antitumorales similares. También se pueden usar los siguientes agentes como agentes adicionales: amifostina (por ejemplo, ethyl®), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), doxorubicina liposómica (por ejemplo, doxil®), gemcitabina (por ejemplo, gemzar®), daunorubicina liposómica (por ejemplo, daunoxome®), procarbazona, mitomicina, docetaxel (por ejemplo, taxotere®), aldesleucina, carboplatino, oxaliplatino, cladribina, camptotecina, CPT 11 (irinotecán), 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, ifosfamida, idarubicina, mesna, interferón beta, interferón alfa, mitoxantrona, topotecán, leuprorelina, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, uramustina, vinorelbina, clorambucilo. En un modo de realización, la politerapia con el anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho inhibidor de la BTK se usa sin dichos agentes adicionales.

El uso de los agentes citotóxicos y antineoplásicos descritos anteriormente, así como de los fármacos antineoplásicos antiproliferativos específicos de diana, como los inhibidores de proteínas cinasas, en tratamientos quimioterápicos, en general, está bien caracterizado en las técnicas de tratamiento del cáncer y su uso en el presente documento se encuentra bajo las mismas consideraciones para supervisar la tolerabilidad y eficacia y para controlar las vías de administración y dosificaciones, con algunos ajustes. Por ejemplo, las dosificaciones reales de los agentes citotóxicos pueden variar dependiendo de la respuesta de las células cultivadas del paciente determinado usando procedimientos de histocultivo. En general, la dosificación se reducirá en comparación con la cantidad usada en ausencia de otros agentes adicionales.

Las dosificaciones típicas de un agente citotóxico eficaz pueden estar en los intervalos recomendados por el fabricante y, cuando se indique por las respuestas *in vitro* o las respuestas en modelos animales, se pueden reducir en hasta aproximadamente un orden de magnitud de concentración o cantidad. Por tanto, la dosificación real dependerá del juicio del médico, el estado del paciente y la eficacia del procedimiento terapéutico en base a la reactividad *in vitro* de las células malignas cultivadas primarias o la muestra de tejido histocultivado, o las respuestas observadas en modelos animales apropiados.

En el contexto de la presente invención, se puede aplicar una cantidad eficaz de radiación ionizante y/o se puede usar un radiofármaco además de la politerapia con el anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho inhibidor de la BTK del cáncer que expresa CD20. La fuente de radiación puede ser externa o bien interna al paciente que se trata. Cuando la fuente es externa al paciente, el tratamiento es conocido como radioterapia de haz externo (RHE). Cuando la fuente de radiación es interna al paciente, el tratamiento se llama braquiritradioterapia (BT). Los átomos radiactivos para su uso en el contexto de la presente invención se pueden seleccionar del grupo que incluye, pero que no está limitado a, radio, itrio 90, 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 radioactivos. En un aspecto, la politerapia con el anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho inhibidor de la BTK se usa sin dicha radiación ionizante.

La radioterapia es un tratamiento estándar para controlar tumores y/o metástasis tumorales irresecables o inoperables. Se han observado resultados mejorados cuando la radioterapia se ha combinado con quimioterapia. La radioterapia se basa en el principio de que la radiación de dosis alta administrada a un área diana dará como resultado la muerte de células reproductoras tanto en los tejidos tumorales como en los normales. La pauta de

dosificación de radiación se define, en general, en términos de dosis de radiación absorbida (Gy), tiempo y fraccionamiento, y se debe definir cuidadosamente por el oncólogo. La cantidad de radiación que recibe un paciente dependerá de diversas consideraciones, pero las dos más importantes son la localización del tumor en relación con otras estructuras u órganos críticos del cuerpo y la extensión a la que se ha propagado el tumor. Un ciclo de tratamiento típico para un paciente que se somete a radioterapia será un plan de tratamiento durante un periodo de 1 a 6 semanas, con una dosis total de entre 10 y 80 Gy, administrada al paciente en una fracción diaria única de aproximadamente 1,8 a 2,0 Gy, 5 días a la semana. En un aspecto preferente de la descripción de la presente invención, existe una sinergia cuando los tumores en pacientes humanos se tratan con la politerapia de la invención y radiación. En otras palabras, la inhibición del crecimiento tumoral por medio de los agentes que comprenden la combinación para su uso en la invención se potencia al combinarse con radiación, opcionalmente con agentes quimioterápicos o antineoplásicos adicionales. Los parámetros de las radioterapias posquirúrgicas, por ejemplo, están contenidos en el documento WO 99/60023.

Los anticuerpos anti-CD20 afucosilados se administran a un paciente de acuerdo con procedimientos conocidos, mediante administración intravenosa como una infusión intravenosa rápida o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intrarticular, intrasinovial o intratecal. En un aspecto de la descripción, la administración del anticuerpo es intravenosa o subcutánea.

El inhibidor de la BTK se administra a un paciente de acuerdo con procedimientos conocidos, mediante administración intravenosa como una infusión intravenosa rápida o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía oral, mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intrarticular, intrasinovial o intratecal. En un aspecto de la descripción, la administración del inhibidor de la BTK es intravenosa o por vía oral.

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 medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones de la invención. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

Composiciones farmacéuticas:

Las composiciones farmacéuticas se pueden obtener procesando el anticuerpo anti-CD20 y/o el inhibidor de la BTK con vehículos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Se pueden 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. Los vehículos adecuados para las cápsulas de gelatina blanda, por ejemplo, son grasas vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos y líquidos y similares. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de la sustancia activa, normalmente no se requiere ningún vehículo en el caso de las cápsulas de gelatina blanda. Los vehículos adecuados para la producción de soluciones y jarabes, por ejemplo, son agua, polioles, glicerol, grasa vegetal y similares. Los vehículos adecuados para supositorios, por ejemplo, son aceites naturales o hidrogenados, ceras, grasas, polioles semilíquidos o líquidos y similares.

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. Todavía también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas.

En un aspecto de la descripción, la composición comprende tanto dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos (preferentemente el anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado, más preferentemente obinutuzumab) como dicho inhibidor de la BTK para su uso en el tratamiento del cáncer, en particular, de cáncer que expresa CD20 (preferentemente un linfoma o leucemia linfocítica, más preferentemente un linfoma no hodgkiniano (LNH) de linfocitos B, linfoma de células del manto (LCM), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (LLDLBG), linfoma de Burkitt, tricoleucemia, linfoma folicular, mieloma múltiple, linfoma de la zona marginal, trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante (PTLD), linfoma asociado al VIH, macroglobulinemia de Waldenström o linfoma primario del SNC).

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

La presente descripción proporciona además una composición farmacéutica, por ejemplo, para su uso en el cáncer, que comprende (i) una primera cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos, (preferentemente un anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado); y (ii) una segunda cantidad eficaz de un inhibidor de la BTK. Dicha composición comprende opcionalmente vehículos y/o excipientes

farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas del anticuerpo anti-CD20 afucosilado solo usadas de acuerdo con la presente invención se preparan para su almacenamiento mezclando un anticuerpo que tenga el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. (ed.) (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones 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; alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno; 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; glúcidos, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Las composiciones farmacéuticas de los inhibidores de la BTK pueden ser similares a las descritas anteriormente para el anticuerpo anti-CD20 afucosilado.

Las composiciones farmacéuticas del inhibidor de la BTK de molécula pequeña incluyen las adecuadas para su administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las composiciones se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica de farmacia. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped que se trata, así como del modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única, en general, será la cantidad de un inhibidor de la BTK que produce un efecto terapéutico. En general, de un cien por ciento, esta cantidad variará desde aproximadamente un 1 por ciento a aproximadamente un noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferentemente desde aproximadamente un 5 por ciento a aproximadamente un 70 por ciento, lo más preferentemente desde aproximadamente un 10 por ciento a aproximadamente un 30 por ciento. Los procedimientos de preparación de estas composiciones incluyen la etapa de asociar un inhibidor de la BTK con el vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes auxiliares. En general, las composiciones farmacéuticas del inhibidor de la BTK se preparan asociando uniforme e íntimamente un inhibidor de la BTK con vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y, a continuación, si es necesario, conformando el producto. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración oral pueden estar en forma de cápsulas, obleas, sobres, pastillas, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base con sabor, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto), polvos, granulados, o como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica) y/o como enjuagues bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un inhibidor de la BTK como ingrediente activo. También se puede administrar un inhibidor de la BTK como una infusión intravenosa rápida, electuario o pasta.

En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo anti-CD20 afucosilado y el inhibidor de la BTK se formulan en dos composiciones farmacéuticas separadas.

Los ingredientes activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), 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 16.^a edición, Osol, A. (ed.) (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación mantenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (documento US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, de ácido láctico-glicólico degradables, tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-glicólico y acetato de leuprorelina) y poli(ácido D-(-)-3-hidroxi-butírico).

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Un aspecto de la descripción es una composición farmacéutica que comprende una combinación de un anticuerpo B-Ly1 humanizado que está afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297 y 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal de la misma, para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto proporciona un procedimiento para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento (i) una primera cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos, (preferentemente un anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado); y (ii) una segunda cantidad eficaz de un inhibidor de la BTK.

En un aspecto de la descripción, la cantidad de fucosa está entre un 40 % y un 60 %.

Preferentemente, dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20.

Preferentemente, dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma o leucemia linfocítica.

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

Preferentemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo B-Ly1 humanizado como se divulga en el presente documento.

Preferentemente, dicho anticuerpo es obinutuzumab.

Preferentemente, dicho inhibidor de la BTK se selecciona del grupo que consiste en: (1) 9-(1-acriloil-3-azetidil)-6-amino-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (2) 6-amino-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (3) 9-[(1-acriloil-4-piperidinil)metil]-6-amino-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (4) 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (5) 6-amino-9-[(3S)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (6) 6-amino-7-[4-(3-clorofenoxi)fenil]-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (7) 6-amino-9-[1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona y (8) 6-amino-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona. También, preferentemente, dicho inhibidor de la BTK se selecciona del grupo de un isómero óptico de dichos compuestos (1) a (8) y la mezcla de los mismos.

Preferentemente, dicho inhibidor de la BTK es 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal de la misma.

Preferentemente, dicha sal es un clorhidrato.

Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo B-Ly1 humanizado y dicho inhibidor de la BTK se selecciona del grupo que consiste en: (1) 9-(1-acriloil-3-azetidil)-6-amino-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (2) 6-amino-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (3) 9-[(1-acriloil-4-piperidinil)metil]-6-amino-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (4) 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (5) 6-amino-9-[(3S)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (6) 6-amino-7-[4-(3-clorofenoxi)fenil]-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (7) 6-amino-9-[1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona y (8) 6-amino-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona. También, preferentemente, dicho inhibidor de la BTK se selecciona del grupo de un isómero óptico de dichos compuestos (1) a (8) y la mezcla de los mismos. Preferentemente, dicho inhibidor de la BTK es 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal de la misma y dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20, preferentemente un linfoma o leucemia linfocítica.

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 padece un cáncer que expresa CD20) para cualquier propósito y, más preferentemente un ser humano que necesita dicho tratamiento para tratar el cáncer, o una afección o lesión precancerosa. Sin embargo, 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.

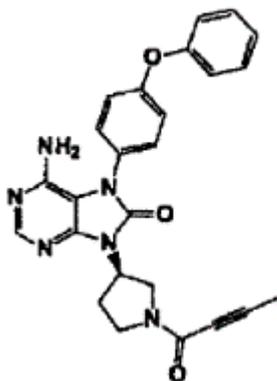
En un modo de realización, la invención hace uso de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos y un inhibidor de la BTK para su uso en el tratamiento del cáncer.

Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo B-Ly1 humanizado.

Preferentemente, dicho anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado es obinutuzumab.

Preferentemente, dicho inhibidor de la BTK se selecciona del grupo que consiste en: (1) 9-(1-acriloil-3-azetidil)-6-amino-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (2) 6-amino-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (3) 9-[(1-acriloil-4-piperidinil)metil]-6-amino-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (4) 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (5) 6-amino-9-[(3S)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (6) 6-amino-7-[4-(3-clorofenoxi)fenil]-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (7) 6-amino-9-[1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona y (8) 6-amino-9-[1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona. También, preferentemente, dicho inhibidor de la BTK se selecciona del grupo de un isómero óptico de dichos compuestos (1) a (8) y la mezcla de los mismos.

Preferentemente, dicho inhibidor de la BTK es 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal de la misma. Dicho compuesto también se muestra como la siguiente estructura:



Preferentemente, dicha sal es un clorhidrato.

Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo B-Ly1 humanizado, más preferentemente obinutuzumab, y dicho inhibidor de la BTK se selecciona del grupo que consiste en: (1) 9-(1-acriloil-3-azetidil)-6-amino-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (2) 6-amino-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (3) 9-[(1-acriloil-4-piperidinil)metil]-6-amino-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (4) 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (5) 6-amino-9-[(3S)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (6) 6-amino-7-[4-(3-clorofenoxi)fenil]-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, (7) 6-amino-9-[1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona y (8) 6-amino-9-[1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona. También, preferentemente, dicho inhibidor de la BTK se selecciona del grupo de un isómero óptico de dichos compuestos (1) a (8) y la mezcla de los mismos. Preferentemente, dicho inhibidor de la BTK es 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal de la misma y dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20, preferentemente un linfoma o leucemia linfocítica.

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras para ayudar al entendimiento de la presente invención, exponiéndose su verdadero alcance en las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

- 5 **SEQ ID NO: 1** secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo anti-CD20 monoclonal murino B-Ly1.
- 10 **SEQ ID NO: 2** secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo anti-CD20 monoclonal murino B-Ly1.
- 10 **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)
- 15 **SEQ ID NO: 20** secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo B-Ly1 humanizado B-KV1

15 **Procedimientos experimentales****Ejemplo 1:**

20 Estudio de la eficacia antitumoral del inhibidor de la BTK en combinación con Ab anti-CD20 en ratones SCID xenoinjertados por vía subcutánea con células TMD8 (LDLBG-LBA)

1. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

25 1.1. Sustancias de prueba

La sustancia de prueba clorhidrato de 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona (a continuación en el presente documento denominada "compuesto A") se almacenó en recipientes sellados a temperatura ambiente, protegida de la luz.

30 Se suministraron GA101 (obinutuzumab, comercializado en EE. UU. con el nombre comercial Gadzyva): 500 mg, Rituximab (RTX, comercializado con los nombres comerciales Rituxan y MabThera): 200 mg, por Roche Glycart AG y se almacenaron a 4 °C.

35 1.2. Sustancia vehículo

El compuesto A se pesó y suspendió en una solución de 400 cP de metilcelulosa al 0,5 % p/v (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., a continuación en el presente documento denominada "MC al 0,5 %"), usando un mortero y una mano de mortero, para obtener una suspensión de 1 mg/ml. La suspensión se usó en los 7 días de su preparación. Se confirmó que la suspensión era estable y uniforme durante 7 días en refrigeración, protegida de la luz, y durante otras 24 horas a temperatura ambiente expuesta a iluminación interior.

40 Se mantuvieron las soluciones madre de tanto GA101 (25 mg/ml) como Rituximab (10 mg/ml) a 4 °C. Antes de su administración a ratones, se diluyeron las soluciones madre en NaCl al 0,9 % a 0,3, 1 y 3 mg/ml para el estudio de búsqueda de dosis y a 0,1 mg/ml y 0,3 mg/ml para el estudio de combinación.

45 1.3. Vía de administración de los fármacos

El compuesto A se administró por vía oral (v.o.) a los ratones dos veces diariamente mediante sonda oral por medio de una aguja de alimentación oral desechable (Fuchigami Kikai Co.) a 10 ml/kg. GA101/Rituximab se inyectaron por vía intravenosa (i.v.) a 10 ml/kg en la vena sacra media de los ratones. Para todos los tratamientos, se adaptaron los volúmenes de administración de acuerdo con la medida más cercana del peso corporal individual para cada ratón. El grupo con compuesto A dos veces al día y el grupo con vehículo recibieron el compuesto A y MC al 0,5 %, respectivamente, por la mañana y por la tarde en un intervalo de 8 h o más.

55 2. Animales

Se usaron ratones C.B-17/lcr-SCID/SCIDJcl hembra (Clea Japan Inc., edad al inicio del experimento: 6 semanas; a continuación en el presente documento denominados "ratones Scid"). Los ratones se mantuvieron en jaulas de metal para ratones, de 3 a 5 por jaula, y se sometieron a un periodo de aclimatación de aproximadamente 1 semana antes de someterse al experimento. Mientras se encontraban en nuestras instalaciones, a los animales se les dio a voluntad alimentación sólida, CRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd.) y agua corriente (de un distribuidor automático). Se procesó su excremento con un sistema de limpieza automatizado. Se observó el estado general de los animales tras su recepción y al final de su aclimatación. Los animales que no tenían ningún problema con su estado general se usaron en el experimento. Los animales se mantuvieron en habitaciones en condiciones de temperatura controladas: 24 ± 2 °C, humedad: 55 ± 15 %, ventilación: 15 ± 5 ciclos/h con un 100 % de aire puro exterior, iluminación: ciclos de oscuridad/luz de 12 h con iluminación de luces fluorescentes (luz: 08:00 a 20:00).

3. Líneas de células cancerosas y condiciones de cultivo

5 Se estableció la TMD8 a partir de las células de un paciente con linfoma difuso de linfocitos B grandes (Tohda S *et al.*, Leuk Res., 2006, 30: 1385-90). Se preparó el medio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, a continuación en el presente documento denominado "RPMI") que contenía FBS inactivado al 10 % en volumen y penicilina-estreptomicina líquida al 1 % en volumen (Invitrogen Corporation) y se usó como medio. El medio se almacenó a 5 °C (intervalo permisible: de 1 °C a 9 °C). La suspensión de células de 4×10^6 a $2,0 \times 10^7$ células por placa se inoculó en una placa de 150 mm que contenía el medio. Las placas se incubaron a 37 °C, un 5 % de CO₂, un 95 %
10 de aire. Se contaron las células en un hemocitómetro y su viabilidad fue de al menos un 90 % el día de la inyección de las células.

4. Inoculación de las células

15 El día 0, se suspendió el sedimento en RPMI previamente enfriado en hielo para obtener una suspensión de células de 2×10^8 células/ml. Se combinaron la suspensión de células en RPMI y el volumen equivalente de BD Matrigel GFR (BD Biosciences) para preparar una suspensión de células de 1×10^8 células/ml. Esta se usó como la suspensión de células para la implantación. A continuación, se inyectaron por vía subcutánea 0,1 ml de suspensión de células en el costado derecho de los ratones bajo anestesia con pentobarbital, usando una aguja de calibre 25
20 (Terumo Corporation).

5. Plan de tratamiento

25 Cuando el volumen tumoral medio alcanzó de 100 a 200 mm³ y de 300 a 400 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos de 8-10 de acuerdo con sus volúmenes tumorales individuales y se inició el tratamiento. El volumen tumoral medio de cada grupo no fue diferente de los demás (análisis de la varianza).

6. Observación del estado de los animales portadores de xenoinjertos

30 Después de la implantación de TMD8, se registró cada día el estado general de todos los animales para medir el volumen tumoral.

7. Medición de los diámetros tumorales

35 Se midieron el eje largo y el eje corto de los tumores con calibradores electrónicos (Mitutoyo Corporation) cada 2 o 4 días desde la implantación de TMD8 hasta el día de la evaluación final.

8. Criterios de valoración y procedimientos de evaluación

40 El criterio de valoración primario fue el volumen tumoral el día de la evaluación final. Además, se calculó la tasa de inhibición del crecimiento tumoral (ICT, %) en los grupos de tratamiento frente al grupo con vehículo. Se usaron el cambio temporal en el volumen tumoral y el peso corporal a partir del día 0 como criterios de valoración secundarios. Se calculó el volumen tumoral con la siguiente fórmula.

45
$$\text{Volumen tumoral} = \text{eje largo del tumor} \times (\text{eje corto del tumor})^2 \times 0,5$$

Los volúmenes tumorales individuales se calcularon con un decimal.

50 Finalmente, se sacrificaron los ratones y se realizó su autopsia cuando los tumores alcanzaron un máximo de 3000 mm³.

9. Expresión y tratamiento de los datos

9.1. Expresión de los datos

55 Se expresaron el volumen tumoral y el peso corporal en cada grupo como la media \pm error estándar (EE). La ICT (%) en el grupo tratado se presentó con un decimal.

9.2. Análisis estadístico

60 Se usó Microsoft Office Excel 2007 SP-1 para calcular las medias y los errores estándar y para preparar las tablas y los gráficos. Se realizaron las pruebas estadísticas con un sistema EXSUS, ver. 7.7.1 (CAC Corporation), que se basa en SAS 9.2 TS2M3 (SAS Institute Japan). Se usó la prueba de la *t* de Student para comparar los volúmenes tumorales en la monoterapia con GA101 y en la politerapia con GA101 y el compuesto A. Todas las
65 pruebas estadísticas fueron bilaterales, con un nivel de significación de un 5 %.

10. Resultados

Composición de los grupos experimentales

5 Tabla 3

Grupo	Dosis (10 ml/kg) y vía del fármaco administrado	Plan de tratamiento	N.º de animales
Grupo con vehículo	NaCl al 0,9 % / i.v. MC al 0,5 % / v.o.	Q7D x 4 Q0,5D x 24	10
GA101 grupo de 1 mg/kg	GA101, 0,1 mg/ml / i.v. MC al 0,5 % / v.o.	Q7D x 4 Q0,5D x 24	10
GA101 grupo de 3 mg/kg	GA101, 0,3 mg/ml / i.v. MC al 0,5 % / v.o.	Q7D x 4 Q0,5D x 24	10
compuesto A grupo de 10 mg/kg	NaCl al 0,9 % / i.v. compuesto A, 1 mg/ml / v.o.	Q7D x 4 Q0,5D x 24	10
GA101, 1 mg/kg + compuesto A grupo de 10 mg/kg	GA101, 0,1 mg/ml / i.v. compuesto A, 1 mg/ml / v.o.	Q7D x 4 Q0,5D x 24	10
GA101, 3 mg/kg + compuesto A grupo de 10 mg/kg	GA101, 0,3 mg/ml / i.v. compuesto A, 1 mg/ml / v.o.	Q7D x 4 Q0,5D x 24	10
Rituximab grupo de 3 mg/kg	RTX, 0,3 mg/ml / i.v. MC al 0,5 % / v.o.	Q7D x 4 Q0,5D x 24	10

La figura 1 muestra el estudio de actividad antitumoral del compuesto A en combinación con GA101 en el modelo de xenoinjerto de TMD8. El D14, cuando el volumen tumoral medio era de 400-450 mm³, se produjo la aleatorización de los ratones en 7 grupos de 10 ratones de acuerdo con el volumen tumoral producido. Como se muestra en la figura 1, la monoterapia con GA101 mostró un efecto antitumoral. Sin embargo, los grupos con politerapia parecían más activos que los correspondientes con monoterapia. Se observó la significación estadística los días 14, 17, 21 y 24. El D35 (día 21), se sacrificaron 4 ratones tratados con vehículo cuando su volumen tumoral fue más alto de 3000 mm³. Se sacrificaron todos los ratones el D38 (día 24).

En este estudio, la combinación de GA101-compuesto A fue significativamente mejor que la monoterapia indicada (análisis estadístico mostrado a continuación).

De forma sorprendente, se observó la regresión de los volúmenes tumorales en una parte de los individuos de D 14 y 21 en grupos de 3 mg/kg de GA101 combinado con 10 mg/kg de compuesto A, mientras que no se observó ninguna remisión tumoral completa en el grupo con monoterapia. Estos resultados indican claramente que la politerapia podría ser más eficaz frente al modelo tumoral avanzado.

Ejemplo 2:

El experimento en el ejemplo 2 se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1, excepto por la siguiente "sustancia vehículo" y "plan de tratamiento".

1.1. Sustancia vehículo

El compuesto A se pesó y suspendió en una solución de 400 cP de metilcelulosa al 0,5 % p/v (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., a continuación en el presente documento denominada "MC al 0,5 %"), usando un mortero y una mano de mortero, para obtener una suspensión de 1 mg/ml (10 mg/kg). La suspensión se usó en los 7 días de su preparación. Se confirmó que la suspensión era estable y uniforme durante 7 días en refrigeración, protegida de la luz, y durante otras 24 horas a temperatura ambiente expuesta a iluminación interior.

Se mantuvieron las soluciones madre de tanto GA101 (25 mg/ml) como Rituximab (10 mg/ml) a 4 °C. Antes de su administración a ratones, se diluyeron las soluciones madre en NaCl al 0,9 % a 0,3 mg/ml (3 mg/kg) para este estudio.

1.2. Plan de tratamiento

Cuando el volumen tumoral medio alcanzó de 400 a 450 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos de 6 de acuerdo con sus volúmenes tumorales individuales y se inició el tratamiento. El volumen tumoral medio de cada grupo no fue diferente de los demás (análisis de la varianza).

2. Resultados

Composición de los grupos experimentales

Tabla 4

5

Grupo	Dosis (10 ml/kg) y vía del fármaco administrado	Plan de tratamiento	N.º de animales
Grupo con vehículo	NaCl al 0,9 % / i.v. MC al 0,5 % / v.o.	Q7D x 4 Q0,5D x 24	10
GA101 grupo de 3 mg/kg	GA101, 0,3 mg/ml / i.v. MC al 0,5 % / v.o.	Q7D x 4 Q0,5D x 24	10
RTX grupo de 3 mg/kg	RTX, 0,3 mg/ml / i.v. MC al 0,5 % / v.o.	Q7D x 4 Q0,5D x 24	10
compuesto A grupo de 10 mg/kg	NaCl al 0,9 % / i.v. compuesto A, 1 mg/ml / v.o.	Q7D x 4 Q0,5D x 24	10
GA101, 3 mg/kg + compuesto A grupo de 10 mg/kg	GA101, 0,3 mg/ml / i.v. compuesto A, 1 mg/ml / v.o.	Q7D x 4 Q0,5D x 24	10
RTX, 3 mg/kg + compuesto A grupo de 10 mg/kg	RTX, 0,3 mg/ml / i.v. compuesto A, 1 mg/ml / v.o.	Q7D x 4 Q0,5D x 24	10

La figura 2 muestra el estudio de actividad antitumoral del compuesto A en combinación con GA101/RTX en el modelo de xenoinjerto de TMD8. El D14 (día 0), cuando el volumen tumoral medio era de 400-450 mm³, se produjo la aleatorización de los ratones en 6 grupos de 10 ratones de acuerdo con el volumen tumoral producido. Como se muestra en la figura 2, cada monoterapia mostró un efecto antitumoral. Se observó una significación estadística después del día 4 para GA101 y RTX y después del día 11 para el compuesto A. Además, el compuesto A combinado con GA101 o RTX a una dosis subóptima de 3 mg/kg una vez semanalmente dio como resultado una inhibición significativa del crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de TMD8. También se observó una significación estadística entre la monoterapia y la politerapia con el compuesto A, lo que indica que el compuesto A combinado con GA101 o RTX a una dosis subóptima fue significativamente mejor que los respectivos Ab o compuesto A dados como monoterapia. El D35 (día 21), se sacrificaron 3 ratones tratados con vehículo cuando su volumen tumoral fue más alto de 3000 mm³. Se sacrificaron todos los ratones en el D39 (día 25).

La inhibición del crecimiento tumoral (ICT) los días 0, 4, 7, 11, 14, 18 y 21 de cada grupo se muestra a continuación. La monoterapia con GA101 demostró una actividad antitumoral superior en comparación con la monoterapia con RTX en términos de inhibición del crecimiento tumoral (ICT, un 77,9 % frente a un 54,3 % el día 21).

Inhibición del crecimiento tumoral (ICT)

25 Tabla 5

Grupo/días después de la inoculación	0	4	7	11	14	18	21
GA101, 3 mg/kg, i.v.	1,7	30,9	45,0	53,3	63,3	72,2	77,9
RTX, 3 mg/kg, i.v.	0,7	25,8	33,2	36,7	42,4	42,7	54,3
compuesto A, 10 mg/kg	0,0	13,7	17,6	34,0	45,8	46,4	62,6
GA101, 3 mg/kg, i.v. + compuesto A, 10 mg/kg	0,5	27,0	47,4	62,2	75,6	84,6	90,2
RTX, 3 mg/kg, i.v. + compuesto A, 10 mg/kg	1,4	25,4	40,1	55,8	69,3	78,4	86,4

Se midió el diámetro tumoral y se calculó el volumen tumoral cada 3 o 4 días después de la asignación del grupo. La inhibición del crecimiento tumoral (ICT, %) en el grupo tratado indicado, en base al volumen tumoral en el grupo tratado con vehículo en cada día de medición, se presenta con un decimal.

Conclusiones

Como resultado del ejemplo 1 y del ejemplo 2, el tratamiento con el compuesto A en combinación con GA101 o RTX puede ser un tratamiento eficaz para el LDLBG-LBA. Además, el compuesto A combinado con GA101 es más eficaz que el compuesto A combinado con RTX en este modelo de xenoinjerto de LDLBG, lo que indica la razón fundamental para usar esta combinación en el entorno clínico.

SECUENCIAS

SEQ ID NO:1

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

Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu
Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp
Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr
Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly
Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

10

SEQ ID NO:2

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

Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn
Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr
Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

SEQ ID NO:3

secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH2)

5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:4

10

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

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

15

SEQ ID NO:5

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

5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:6

10 **secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH5)**

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

15

SEQ ID NO:7

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

5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:8

10 **secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH7)**

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
15 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:9

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

5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:10

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

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
15 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:11

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

5
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:12

10 **secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL10)**

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
15 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:13

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

5 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:14

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

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

15

SEQ ID NO:15

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

5
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:16

10 **secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL14)**

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Lys Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

15

SEQ ID NO:17

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

5 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ser
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

10 **SEQ ID NO:18**

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

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
15 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:19

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

5
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:20

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

10
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
Arg Thr Val

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
Arg Thr Val

SEQ ID NO:11

- 5 **secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL8)**

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

- 10 **SEQ ID NO:12**

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

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

- 15 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:13

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

5 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:14

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

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

15

SEQ ID NO:15

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

5
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:16

10 **secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL14)**

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Lys Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

15

SEQ ID NO:17

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

5
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ser
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:18

10 **secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL16)**

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

15

SEQ ID NO:19

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

5
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:20

10 **secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo B-Ly1 humanizado B-KV1**

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
Arg Thr Val

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-CD20 seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD20 de tipo I y obinutuzumab para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con una 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal de la misma.
2. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20.
- 10 3. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma o leucemia linfocítica.
4. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab.
- 15 5. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que se administran uno o más de otros agentes citotóxicos, quimioterápicos o antineoplásicos adicionales, o compuestos o radiación ionizante que potencian los efectos de dichos agentes.
- 20 6. Una composición farmacéutica que comprende una combinación de un anticuerpo anti-CD20 seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD20 de tipo I y obinutuzumab, y un inhibidor de la BTK que se selecciona del grupo que consiste en 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona y una sal de la misma para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 25 7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada por que dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab.
- 30 8. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la combinación del anticuerpo anti-CD20 de tipo I u obinutuzumab y 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal de la misma se administra como dos formulaciones separadas.

Figura 1(a)

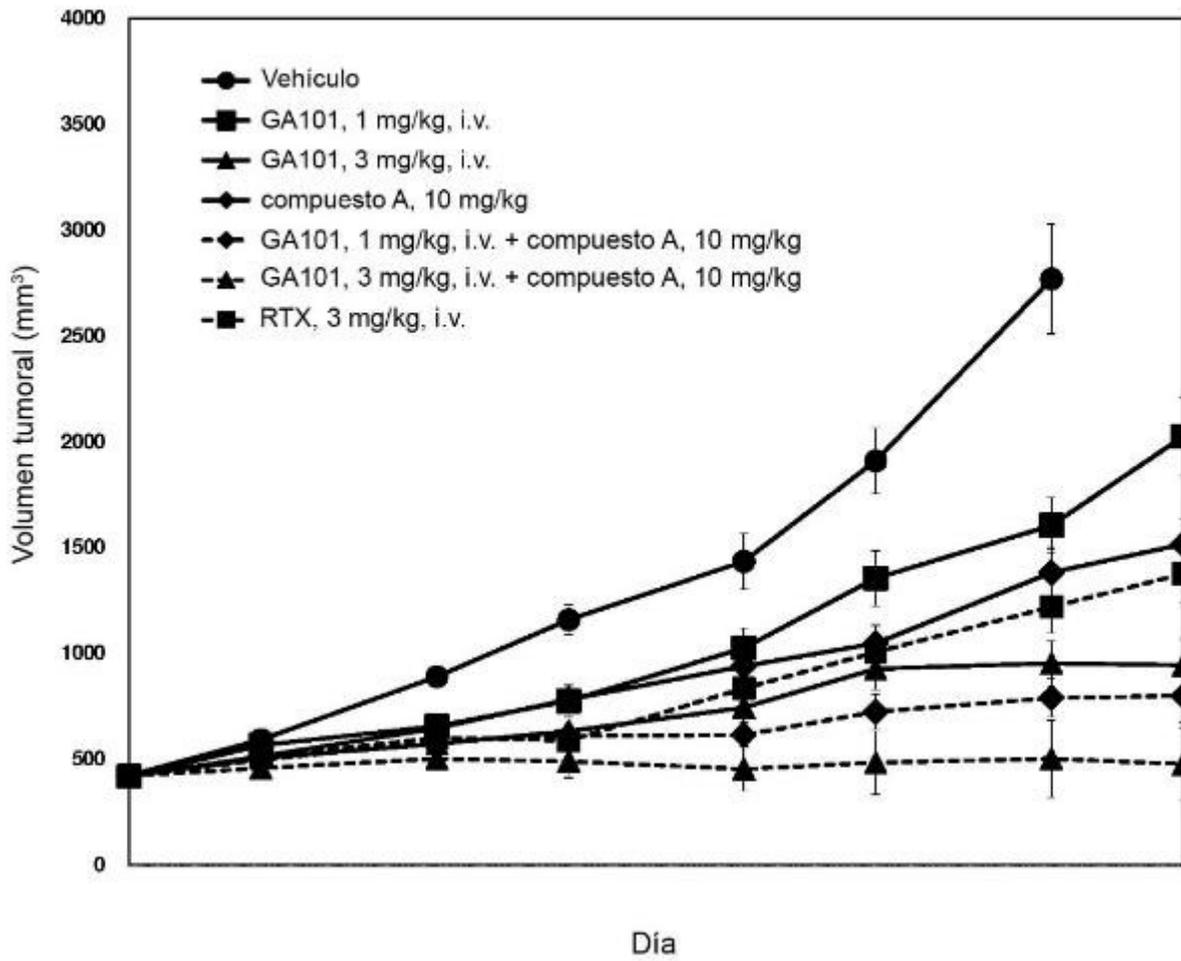


Figura 1(b)

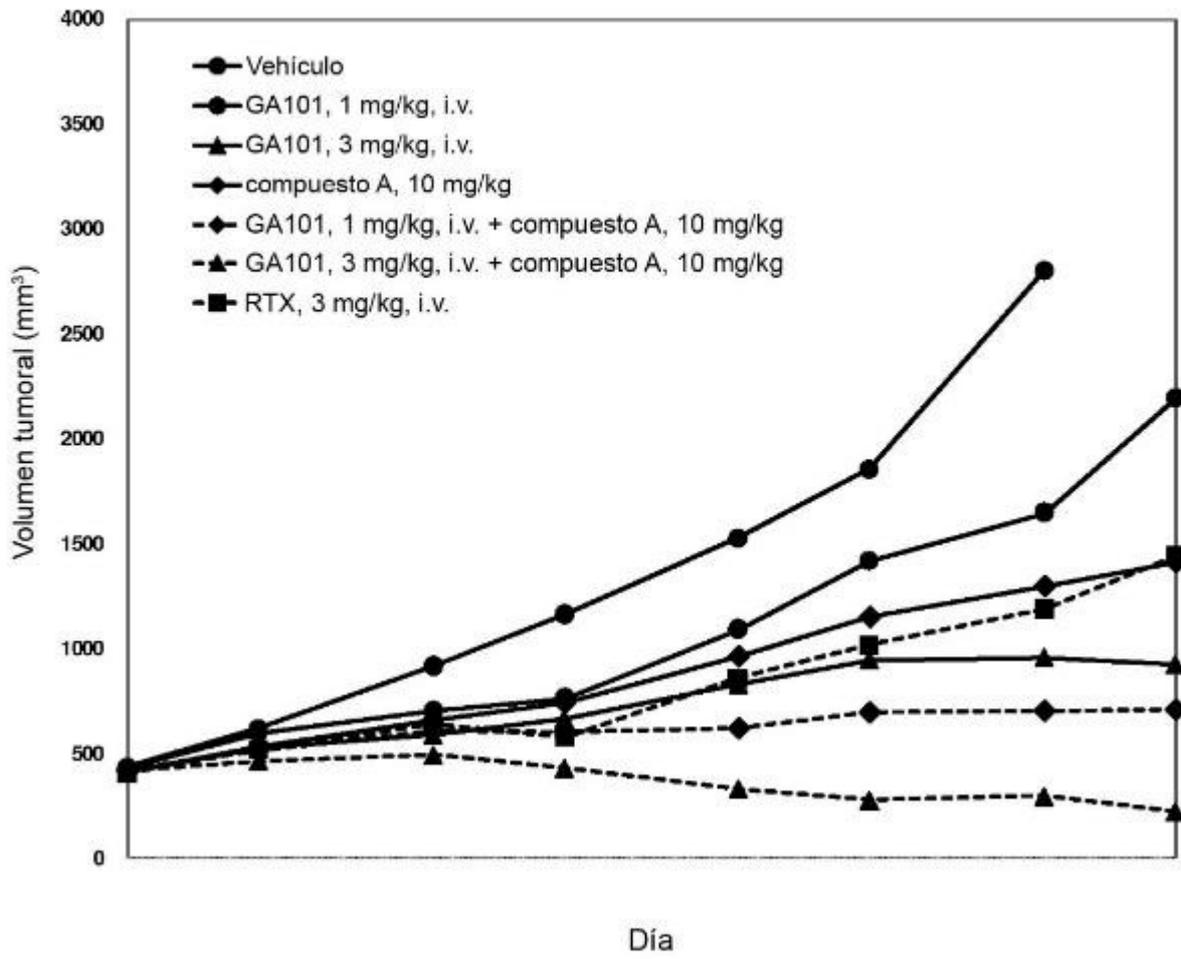


Figura 2(a)

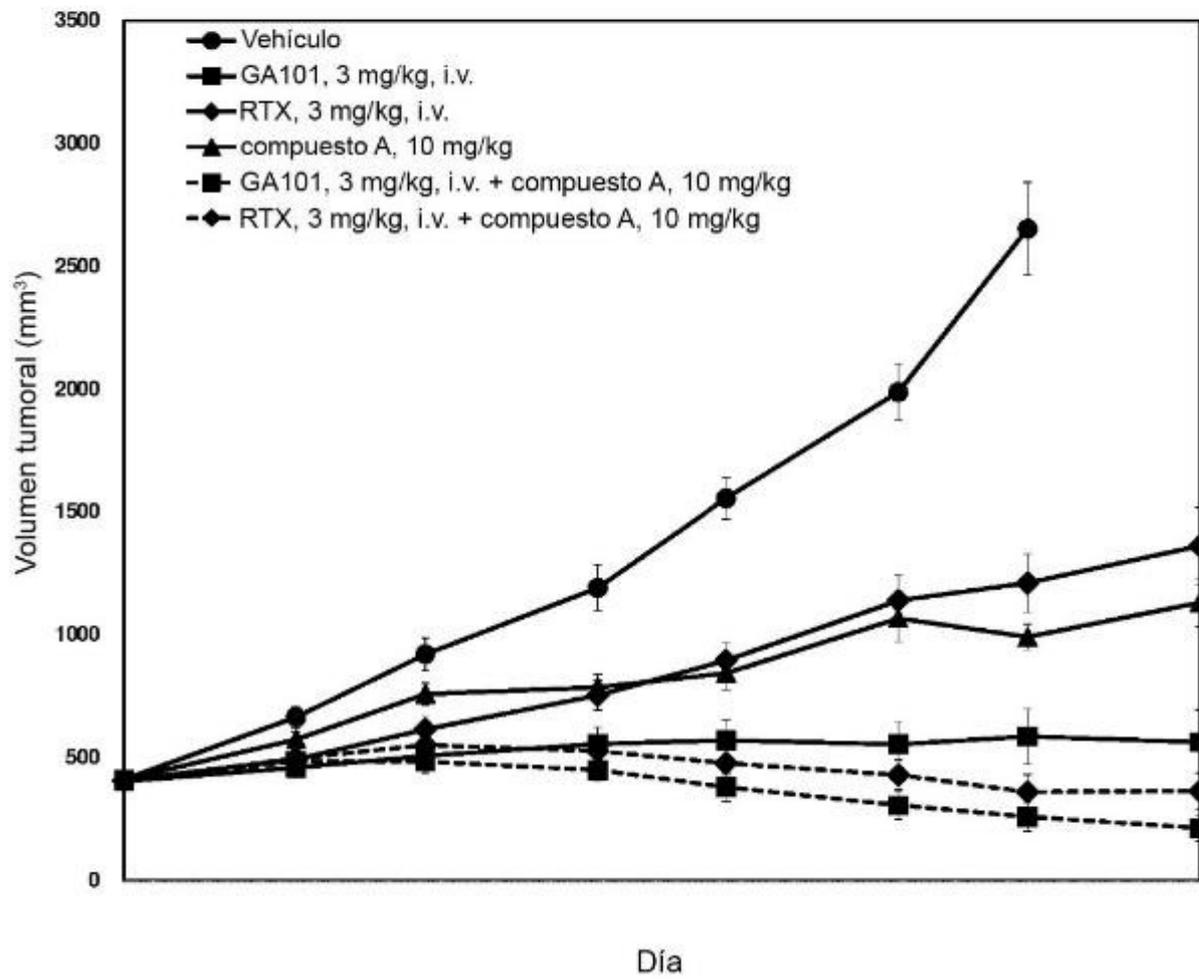


Figura 2(b)

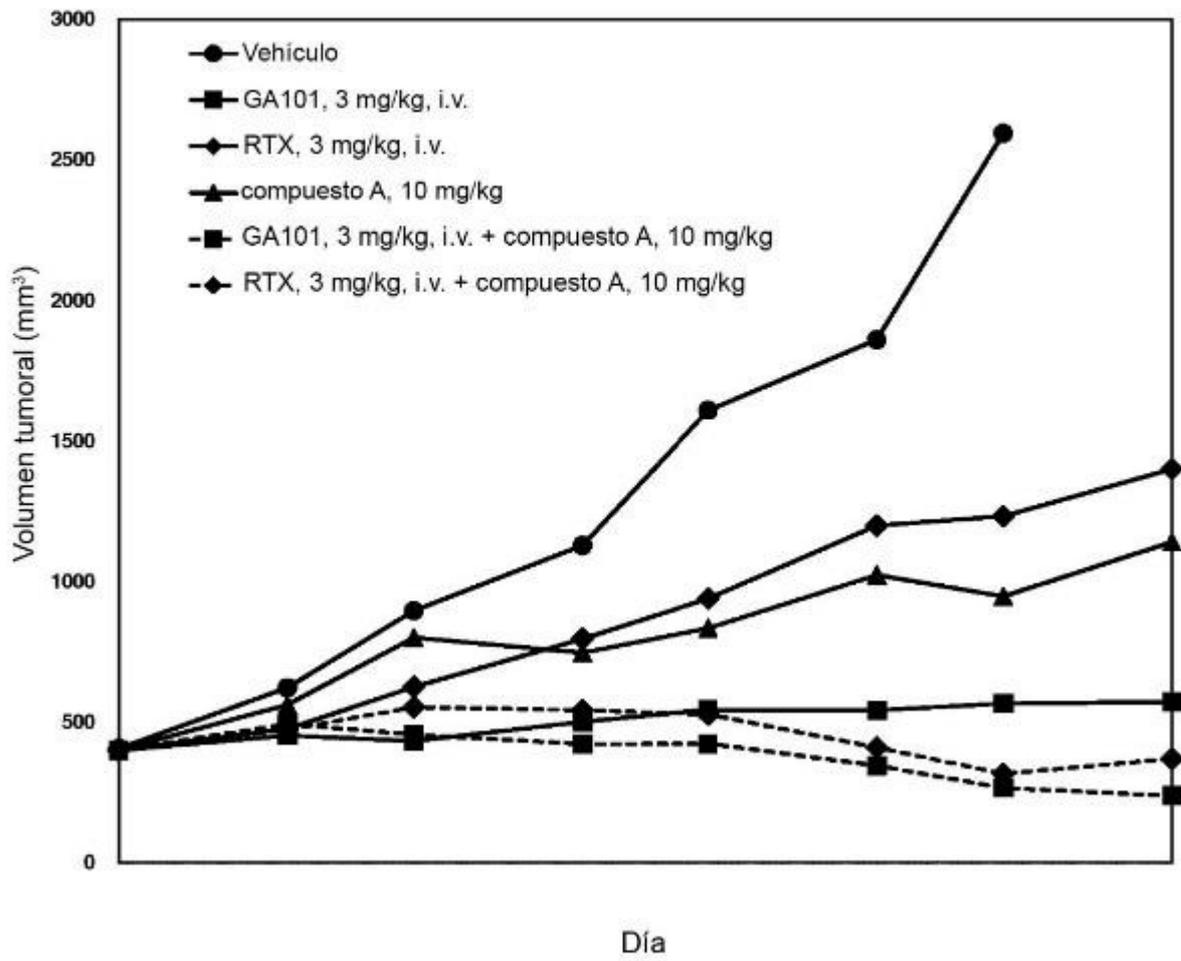


Figura 3

