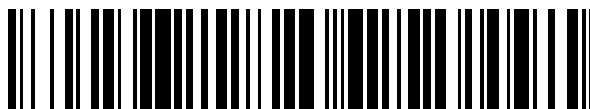


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 624**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2016** **PCT/EP2016/061517**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2016** **WO16188935**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2016** **E 16725104 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** **EP 3302549**

54 Título: **Politerapia de un anticuerpo anti-CD20 con un inhibidor de Bcl-2 y un inhibidor de MDM2**

30 Prioridad:

26.05.2015 EP 15169199

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

25.02.2020

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

KLEIN, CHRISTIAN;
HERTING, FRANK y
DANGL, MARKUS

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 744 624 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 anti-CD20 con un inhibidor de Bcl-2 y un inhibidor de MDM2

- 5 La presente invención se refiere a la politerapia de un anticuerpo anti-CD20 con un inhibidor de Bcl-2 y un inhibidor de MDM2 para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención10 **Anticuerpos afucosilados**

Las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales se pueden potenciar genomanipulando 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 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos acoplados a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensos 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 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).

CD20 y anticuerpos anti-CD20

35 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).

45 Existen dos tipos diferentes de anticuerpos anti-CD20 que difieren significativamente en su modo de unión a CD20 y actividades biológicas (Cragg, M.S., *et al.*, Blood 103 (2004) 2738-2743; y Cragg, M.S., *et al.*, Blood 101 (2003) 1045-1052). Los anticuerpos de tipo I, como, por ejemplo, rituximab (un anticuerpo no afucosilado con una cantidad de fucosa de un 85 % o mayor), ofatumumab, veltuzumab, ocrelizumab, son potentes en la citotoxicidad mediada por el complemento.

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

55 Se han usado anticuerpos anti-CD20 en combinación con inhibidores de Bcl-2 (Roberts *et al.*, BLOOD, 124(21), Abstract 325, 2014; Ma *et al.*, J. Clin. Onc., 32(15, Supl.), Abstract 7013, 2014; Flinn *et al.*, BLOOD, 124(21), Abstract 4687, 2014; Herting *et al.*, BLOOD, 116(21), Abstract 3915, 2010).

60 Se han usado anticuerpos anti-CD20 en combinación con inhibidores de MDM2 (Herting *et al.*, BLOOD, 124(21), Abstract 1780; documento WO2012080389).

MDM2

65 p53 es una proteína supresora de tumor que desempeña un papel principal en la protección frente al desarrollo de cáncer. Protege la integridad celular y previene la propagación de clones de células permanentemente dañados por la inducción de la detención del crecimiento o apoptosis. A nivel molecular, p53 es un factor de transcripción que

puede activar un panel de genes implicados en la regulación del ciclo celular y la apoptosis. p53 es un inhibidor del ciclo celular potente que está regulado estrechamente por MDM2 a nivel celular. MDM2 y p53 forman un bucle de autorregulación. MDM2 se puede unir a p53 e inhibir su capacidad para transactivar genes regulados por p53. Además, MDM2 media en la degradación dependiente de ubiquitina de p53. p53 puede activar la expresión del gen MDM2, elevando así el nivel celular de la proteína MDM2. Este bucle de autorregulación asegura que tanto MDM2 como p53 se mantienen a un nivel bajo en células en proliferación normal. MDM2 también es un cofactor para E2F, que desempeña un papel principal en la regulación del ciclo celular.

La proporción de MDM2 con respecto a p53 (E2F) está regulada incorrectamente en muchos cánceres. Se ha demostrado que los defectos moleculares que se producen con frecuencia en el locus p16INK4/p19ARF, por ejemplo, afectan a la degradación de la proteína MDM2. La inhibición de la interacción MDM2-p53 en células tumorales con p53 natural debe dar lugar a la acumulación de p53, detención del ciclo celular y/o apoptosis. Los antagonistas de MDM2, por lo tanto, pueden ofrecer un enfoque novedoso para el tratamiento del cáncer como agentes individuales o en combinación con un amplio espectro de otros tratamientos antitumorales. La viabilidad de esta estrategia se ha demostrado por el uso de diferentes herramientas macromoleculares para la inhibición de la interacción MDM2-p53 (por ejemplo, anticuerpos, oligonucleótidos antisentido, péptidos). MDM2 también se une a E2F a través de una región de unión conservada como p53 y activa la transcripción dependiente de E2F de la ciclina A, lo que sugiere que los antagonistas de MDM2 podrían tener efectos en las células mutantes en p53.

Bcl-2 e inhibidores de Bcl-2

Las proteínas Bcl-2 desempeñan un papel en muchas enfermedades, en particular en cáncer, leucemia, enfermedades inmunitarias y autoinmunitarias. Se dice que las proteínas Bcl-2 están implicadas en cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de médula ósea, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer hepatocelular, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, neoplasias malignas linfocíticas de origen de linfocitos T o linfocitos B, melanoma, leucemia mielógena, mieloma, cáncer oral, cáncer ovárico, carcinoma de pulmón no microcítico, cáncer de próstata, carcinoma de pulmón microcítico, cáncer de bazo. La sobreexpresión de proteínas Bcl-2 se correlaciona con resistencia a la quimioterapia, resultado clínico, progresión de la enfermedad, pronóstico global o una combinación de los mismos en diversos cánceres y trastornos del sistema inmunitario.

Se han usado inhibidores de Bcl-2 e inhibidores de MDM-2 en combinación (Dangl *et al.*, *CANC.RES.*, 74(19), Abstract 5505, 2014; Rongqing *et al.*, *BLOOD*, 124(21), Abstract 2162, 2014).

Sumario de la invención

Ahora se ha descubierto que la combinación del anticuerpo anti-CD20 de tipo I, o un anticuerpo anti-CD20 de tipo II afucosilado, con un inhibidor de Bcl-2 y un inhibidor de MDM2 mostró efectos antiproliferativos significativamente potenciados. Sorprendentemente, esta combinación es más que aditiva, es decir, altamente sinérgica.

Los modos de realización de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Un aspecto de la divulgación 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 Bcl-2 y un inhibidor de MDM2.

Otro aspecto de la divulgación 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 Bcl-2 y un inhibidor de MDM2.

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de tratamiento del 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 Bcl-2 y un inhibidor de MDM2, a un paciente que necesita dicho tratamiento.

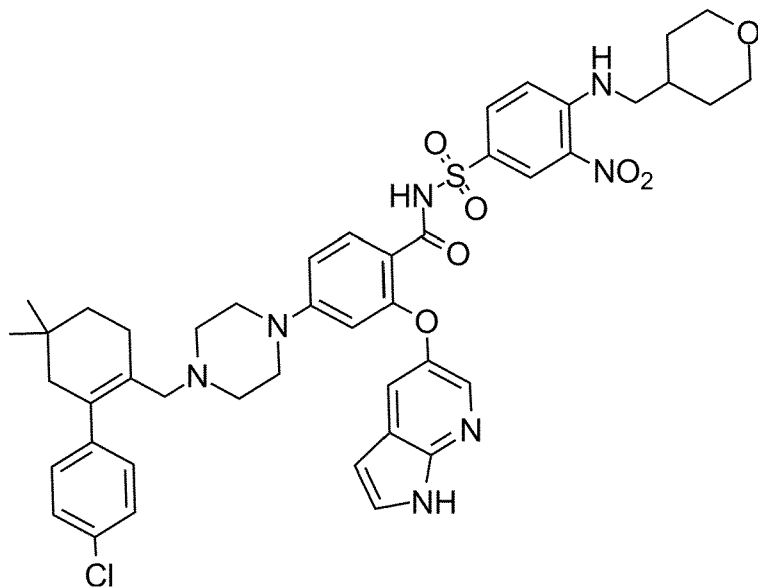
En un modo de realización, la cantidad de fucosa es entre un 40 % y un 60 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297. En otro modo de realización, la cantidad de fucosa es un 0 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297.

En un aspecto, el anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab. En un modo de realización, el anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo IgG1. En otro modo de realización, dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20, preferentemente un linfoma o leucemia linfocítica. En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo B-Ly1 humanizado. En otro modo de realización, dicho anticuerpo afucosilado es un anticuerpo anti-CD20 de tipo II. En un modo de realización preferente, dicho anticuerpo afucosilado es obinutuzumab.

En un aspecto, dicho inhibidor de Bcl-2 es un compuesto seleccionado de los compuestos descritos en el documento WO2010/138588. Los procedimientos de producción de dichos inhibidores de Bcl-2 también se divulgan en el documento WO2010/138588.

5 De acuerdo con la invención, el inhibidor de Bcl-2 es 4-(4-([2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil)piperacina-1-il)-N-({3-nitro-4-[(tetrahidro-2H-piran-4-ilmetil)amino]fenil}sulfonyl)-2-(1H-pirrol[2,3-b]piridin-5-iloxi)benzamida como en la fórmula a continuación o una sal, éster o polimorfo de la misma. El ejemplo 5 del documento WO2010/138588 describe procedimientos para la preparación de dicho compuesto.

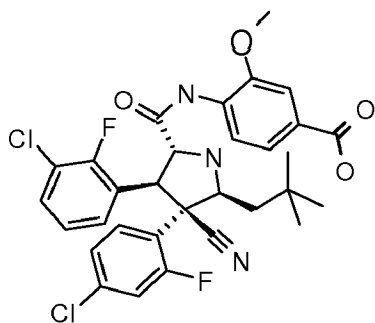
10 Dicho inhibidor de Bcl-2 también se representa en la siguiente fórmula:



Dicho compuesto también se denomina ABT-199 (GDC-0199 o Venetoclax).

15 En un aspecto de la divulgación, dicho inhibidor de MDM2 es un compuesto seleccionado de los compuestos descritos en el documento WO2011/098398. Los procedimientos de producción de dichos inhibidores de MDM2 también se divulgan en el documento WO2011/098398.

20 De acuerdo con la invención, el inhibidor de MDM2 es ácido 4-([(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-3-metoxi-benzoico como en la fórmula a continuación o una sal, éster o polimorfo del mismo. El ejemplo 448 del documento WO2011/098398 describe un procedimiento para la preparación de dicho compuesto.



25
Peso molecular = 616,4973
Fórmula molecular = C₃₁H₂₉Cl₂F₂N₃O₄

30 En un aspecto de la divulgación, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo B-Ly1 humanizado, preferentemente obinutuzumab, y un inhibidor de Bcl-2, en el que el inhibidor de Bcl-2 se selecciona de los compuestos descritos en el documento WO 2010/138588 y un inhibidor de MDM2 seleccionado de los compuestos descritos en el documento WO2011/098398. Dicho inhibidor de MDM2 es preferentemente un compuesto de acuerdo con la fórmula I o de acuerdo con la fórmula I-1 como se divulga en la presente memoria descriptiva anterior. Preferentemente, el inhibidor de MDM2 es ácido 4-([(2R,3S,4R,5S)-4-(4-

35

cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino}-3-metoxi-benzoico o una sal del mismo, y dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20, en un aspecto un linfoma o leucemia linfocítica.

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

Un aspecto de la divulgación es una composición farmacéutica que comprende una combinación de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I (en un modo de realización rituximab) o 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 un anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado o preferentemente obinutuzumab), y un inhibidor de Bcl-2, en el que el inhibidor de Bcl-2 se selecciona de los compuestos descritos en el documento WO 2010/138588 y un inhibidor de MDM2, en el que el inhibidor de MDM2 se selecciona de los compuestos descritos en el documento WO2011/098398. Dicho inhibidor de MDM2 es preferentemente un compuesto de acuerdo con la fórmula I o de acuerdo con la fórmula I-1 como se divulga en la presente memoria descriptiva anterior. Preferentemente, el inhibidor de MDM2 es ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino}-3-metoxi-benzoico o una sal del mismo es ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino}-3-metoxi-benzoico o una sal del mismo para el tratamiento del cáncer.

20 **Descripción de las figuras**

Figura 1: Desarrollo del volumen tumoral hasta el día 29 y valores de RIC (ejemplo 1)

Figura 2: Desarrollo del volumen tumoral hasta el día 32 y valores de ICT (ejemplo 2)

25 Figura 3: Análisis del tiempo hasta el acontecimiento hasta el día 125 (ejemplo 2)

Descripción detallada de la invención

30 La invención comprende 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 Bcl-2 y un inhibidor de MDM2, como se define por las reivindicaciones.

La invención comprende 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 Bcl-2 y un inhibidor de MDM2, como se define por las reivindicaciones.

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

El término "anticuerpo" engloba las diversas formas de anticuerpos incluyendo pero sin limitarse 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 mantengan 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. Se producen anticuerpos monoclonales humanos por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera humana fusionados a una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de una fuente o especie y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, preparada normalmente por técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana son especialmente preferentes. 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" son aquellas en las que la clase o subclase se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original. Dichos anticuerpos "quiméricos" también se denominan "anticuerpos de cambio de clase". Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas de transfección génica y de ADN recombinante convencionales ahora bien conocidas 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.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que las regiones estructurales o las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina original. En un modo de realización preferente, una CDR murina se injerta en la región estructural de un anticuerpo humano para preparar el "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 en particular preferentes se corresponden con las que representan secuencias que reconocen los antígenos indicados anteriormente para anticuerpos quiméricos y bi o multispecíficos.

El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones constantes y variables 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 humanos frente a una gran variedad de dianas. Los ejemplos de anticuerpos humanos se describen, por ejemplo, en Kellermann, S.A., *et al.*, Curr Opin Biotechnol. 13 (2002) 593-597.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por 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 transfectado 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 de VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

El término "anticuerpo bi o multispecífico" 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 modos de realización, una de las especificidades de unión es por CD20 y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de CD20. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos para células que expresan CD20. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

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 por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a). Unión o unión específica quiere decir una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} M o menos, preferentemente de 10^{-8} M a 10^{-13} M (en un modo de realización 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 modo de realización de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

El término "molécula de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

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

La "región variable" (región variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) 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) con secuencias que 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 por las regiones estructurales y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena el sitio de unión a antígeno.

Los términos "región hipervariable" cuando se usan en el presente documento se refieren a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos aminoácidos de las "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Regiones "estructurales"

o "FR" son las 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. En especial, la 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 alterado de glucosilación en la región Fc en Asn297 que tiene un nivel reducido 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 residuos de glucano G0, G1 (α 1,6 o α 1,3) o G2, dependiendo de la cantidad de residuos Gal terminales (Raju, T.S., *BioProcess Int.* 1 (2003) 44-53). La glucosilación de tipo CHO de partes Fc de 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. Es conocido comúnmente 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").

El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa en general cuando se refiere a un residuo en una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU informado 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 de acuerdo con la invención quiere decir 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 quiere decir que al menos un 40 % o más de los oligosacáridos de la región Fc en Asn297 están afucosilados). En un modo de realización, la cantidad de fucosa es entre un 40 % y un 60 % de los oligosacáridos de la región Fc en Asn297. En otro modo de realización, la cantidad de fucosa es un 50 % o menos y, todavía en otro modo de realización, la cantidad de fucosa es un 30 % o menos de los oligosacáridos de la región Fc en Asn297. De acuerdo con la invención, "cantidad de fucosa" quiere decir la cantidad de dicho oligosacárido (fucosa) dentro de la cadena de oligosacárido (glúcidos) en Asn297, en relación con la suma de todos los oligosacáridos (glúcidos) unidos a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) medida por espectrometría de masas MALDI-TOF y calculada como valor promedio (para un procedimiento detallado para determinar la cantidad de fucosa, véase, por ejemplo, el documento WO 2008/077546). Además en un modo de realización, los oligosacáridos de la región Fc están bisectados. El anticuerpo afucosilado de acuerdo con la invención se puede expresar en una célula 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 modo de realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión. De forma alternativa, la actividad α 1,6-fucosiltransferasa de la célula huésped se puede disminuir o eliminar 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, por condiciones de fermentación (por ejemplo, tiempo de fermentación) o bien por combinación de al menos dos anticuerpos con diferente cantidad de fucosilación. Dichos anticuerpos afucosilados y procedimientos de glucomanipulación respectivos se describen en los documentos WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180, documentos 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; documentos WO 03/055993 o US 2005/0249722.

Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a 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 Bcl-2 y un inhibidor de MDM2, como se define por las reivindicaciones. En otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado del isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente del 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 Bcl-2 y un inhibidor de MDM2, como se define por las reivindicaciones. En un modo de realización, la cantidad de fucosa es entre un 60 % y un 20 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297. En un modo de realización, la cantidad de fucosa es entre un 60 % y un 40 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297. En un modo de realización, la cantidad de fucosa es entre un 0 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297.

CD20 (también conocido como antígeno CD20 de linfocitos B, antígeno de superficie de 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 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 nacentes 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 linfocitos B que desempeña un papel en el desarrollo y diferenciación de linfocitos B en 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 exprese de forma natural por células o se exprese en células transfectadas con el gen CD20. La unión de un anticuerpo de la invención al antígeno CD20 media en la destrucción de células que expresan CD20 (por ejemplo, una célula tumoral), inactivando el CD20. La destrucción de las células que expresan CD20 se puede producir por uno o más de los siguientes mecanismos: inducción de muerte celular/apoptosis, ADCC y CDC.

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

El término "anticuerpo anti-CD20" de acuerdo con la invención es un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD20. Dependiendo de las propiedades de unión y las actividades biológicas de los anticuerpos anti-CD20 con respecto al antígeno CD20, se pueden distinguir dos tipos de anticuerpos anti-CD20 (anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II) de acuerdo con Cragg, M.S., *et al.*, Blood 103 (2004) 2738-2743; y Cragg, M.S., *et al.*, Blood 101 (2003) 1045-1052, véase la tabla 1.

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

anticuerpos anti-CD20 de tipo I	anticuerpos anti-CD20 de tipo II
epítipo de CD20 de tipo I	epítipo de CD20 de tipo II
Localizan CD20 en balsas lipídicas	No localizan CD20 en balsas lipídicas
CDC incrementada (si es isotipo IgG1)	CDC disminuida (si es isotipo IgG1)
Actividad ADCC (si es isotipo IgG1)	Actividad ADCC (si es isotipo IgG1)
Capacidad de unión completa	Capacidad de unión reducida
Agregación homotípica	Agregación homotípica más fuerte
Inducción de apoptosis tras reticulación	Inducción de muerte celular fuerte 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 (si es isotipo IgG1) en comparación con 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).

El anticuerpo anti-CD20 afucosilado para su uso de acuerdo con la invención es 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 nivel reducido 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 por 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 son conocidas por expresar 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 sangre de un donante sano elegido al azar, como células efectoras;
- 3) se lleva a cabo el ensayo de acuerdo con el siguiente protocolo:
 - i) se aíslan las PBMC usando procedimientos de centrifugación por densidad estándar y se suspenden a 5×10^6 células/ml en medio de cultivo celular RPMI;
 - ii) se cultivan las células diana por procedimientos de cultivo tisular estándar, se recogen de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad mayor 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) se transfieren 100 microlitros de la suspensión de células diana final anterior a cada pocillo de una placa de microvaloración de 96 pocillos;
 - iv) se diluye el anticuerpo 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, se centrifuga la placa de microvaloración de 96 pocillos a $50 \times g$ durante 1 minuto y se incuba durante 1 hora a 4°C ;
 - viii) se añaden 50 microlitros de la suspensión de PBMC (punto i anterior) a cada pocillo para proporcionar una proporción de células efectoras:diana de 25:1 y se disponen las placas en una estufa de incubación en una atmósfera con CO_2 al 5 % a 37°C durante 4 horas;
 - ix) se recoge el sobrenadante sin células de cada pocillo y se cuantifica la radioactividad liberada experimentalmente (ER) usando un contador gamma;
 - x) se calcula el porcentaje de lisis específica para cada concentración de anticuerpo de acuerdo con la fórmula $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$, donde ER es la radioactividad promedio cuantificada (véase el punto ix anterior) para esa concentración de anticuerpo, MR es la radioactividad promedio cuantificada (véase el punto ix anterior) para los controles de MR (véase el punto v anterior) y SR es la radioactividad promedio cuantificada (véase el punto ix anterior) para los controles de SR (véase el punto vi anterior);
- 4) la "ADCC incrementada" se define como un incremento en el porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a prueba anterior y/o bien una reducción en la concentración de anticuerpo requerida para lograr la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a prueba anterior. El incremento en 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.

Dicha "ADCC incrementada" se puede obtener por glucomanipulación de dichos anticuerpos, lo que quiere decir potenciar dichas funciones efectoras naturales mediadas por células de anticuerpos monoclonales genomanipulando su componente oligosacárido como se describe en Umana, P., *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 y el documento US 6.602.684.

El término "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" se refiere a la lisis de células diana tumorales humanas por el anticuerpo en presencia del complemento. La CDC se mide preferentemente por el tratamiento de una preparación de células que expresan CD20 con un anticuerpo anti-CD20 en presencia del complemento. La

CDC se encuentra si el anticuerpo induce a una concentración de 100 nM la lisis (muerte celular) de un 20 % o más de las células tumorales después de 4 horas. El ensayo se realiza preferentemente con células tumorales marcadas con ^{51}Cr o Eu y medición de ^{51}Cr o Eu liberado. Los controles incluyen la incubación de células diana tumorales con complemento pero sin el anticuerpo.

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

El anticuerpo "rituximab" (ejemplo de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I) es un dominio constante murino gamma 1 humano quimérico genomanipulado que contiene un anticuerpo monoclonal dirigido frente al antígeno CD20 humano. Este anticuerpo quimérico contiene dominios constantes gamma 1 humanos y se identifica por el nombre "C2B8" en el documento US 5.736.137 (Anderson *et al.*) publicado el 17 de abril de 1998, cedido 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 del mecanismo de acción *in vitro* 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

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

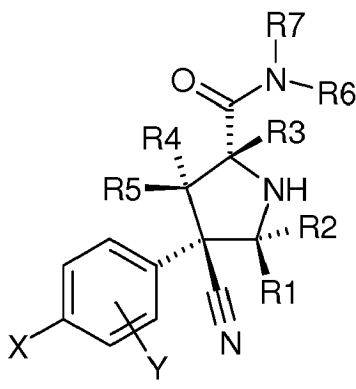
El término "anticuerpo B-Ly1 humanizado" se refiere a un anticuerpo B-Ly1 humanizado como se divulga en los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875, que se obtuvo del anticuerpo anti-CD20 monoclonal murino B-Ly1 (región variable de la cadena pesada (VH) murina: SEQ ID NO:1; región variable de la cadena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

En un modo de realización, el "anticuerpo B-Ly1 humanizado" tiene una región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada entre el grupo de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:19 (de B-HH2 a B-HH9 y de B-HL8 a B-HL17 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). En un modo de realización específico, dicho dominio variable se selecciona del grupo que consiste en 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 modo de realización específico, el "anticuerpo B-Ly1 humanizado" tiene una región variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO:20 (B-KV1 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). En un modo de realización específico, el "anticuerpo B-Ly1 humanizado" tiene una región variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO:7 (B-HH6 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875) y una región variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO:20 (B-KV1 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). Además en un modo de realización, el anticuerpo B-Ly1 humanizado es un anticuerpo IgG1. De acuerdo con la invención, dichos anticuerpos B-Ly1 humanizados afucosilados están glucomanipulados (GE) 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 el documento WO 99/154342. En un modo de realización, el B-Ly1 humanizado glucomanipulado afucosilado es B-HH6-B-KV1 GE. 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 o GAZYVARO. El documento WHO Drug Information reemplaza todas las versiones previas (por ejemplo, vol. 25, n.º 1, 2011, p. 75-76) y es conocido anteriormente como afutuzumab (DCI recomendada, WHO Drug Information, vol. 23, n.º 2, 2009, p. 176; vol. 22, n.º 2, 2008, p. 124).

El término "inhibidor de MDM2" de acuerdo con la invención se refiere a agentes que previenen la actividad de MDM2 con una C150 de 0,001 μM a aproximadamente 2 μM , en un modo de realización con de 0,002 μM a aproximadamente 2 μM .

En otro modo de realización, los inhibidores de MDM2 son compuestos de peso molecular pequeño con un peso molecular (MW) de menos de 1500 Daltons (Da).

De acuerdo con algunos aspectos de la divulgación, el inhibidor de MDM2 es un compuesto seleccionado de los compuestos descritos en el documento WO2011/098398. Los procedimientos de producción de dichos inhibidores de MDM2 también se divulgan en el documento WO2011/098398. Dicho inhibidor de MDM2 es preferentemente un compuesto de acuerdo con la fórmula I o de acuerdo con la fórmula IIa como se divulga en el presente documento



en la que

X se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, ciano, nitro, etinilo, ciclopropilo, metilo, etilo, isopropilo, vinilo y metoxi,

Y es de uno a cuatro grupos independientemente seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, CN, OH, nitro, alquilo inferior, cicloalquilo, alcoxi inferior, alquenilo inferior, cicloalquenilo, alquinilo inferior, arilo, heteroarilo, heterociclo, COOR', OCOR', CONR'R'', NR'COR'', NR'SO₂R', SO₂NR'R'' y NR'R'' en el que

R' y R'' se seleccionan independientemente de H, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo inferior, cicloalquilo inferior sustituido, alquenilo inferior, alquenilo inferior sustituido, cicloalquenilo inferior, cicloalquenilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo o heterociclo sustituido,

y en la que R' y R'' se pueden unir independientemente para formar una estructura cíclica seleccionada de cicloalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquenilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido o heterociclo sustituido o no sustituido,

R₁ se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquenilo inferior, alquenilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo y cicloalquenilo sustituido,

R₂ es hidrógeno o alquilo inferior,

R₃ es H o alquilo inferior,

R₅ se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquenilo inferior, alquenilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo y cicloalquenilo sustituido,

R₄ es hidrógeno,

R₆ y R₇ se seleccionan del grupo que consiste en (CH₂)_n-R', (CH₂)_n-NR'R'', (CH₂)_n-NR'COR'', (CH₂)_n-NR'SO₂R'', (CH₂)_n-COOH, (CH₂)_n-COOR', (CH₂)_n-CONR'R'', (CH₂)_n-OR', (CH₂)_n-SR', (CH₂)_n-SOR', (CH₂)_n-SO₂R', (CH₂)_n-COR', (CH₂)_n-SO₃H, (CH₂)_n-SONR'R'', (CH₂)_n-SO₂NR'R'', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-R', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-OH, (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-OR', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-NR'R'', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-NR'COR'', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-NR'SO₂R'', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-COOH, (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-COOR', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-CONR'R'', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-SO₂NR'R'', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-R', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-OH, (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-OR', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-NR'R'', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-NR'COR'', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-NR'SO₂R'', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-COOH, (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-COOR', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-CONR'R'', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-SO₂R', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-COR', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-SONR'R'', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-SO₂NR'R'', -COR', -SOR' y SO₂R'

en la que R' y R'' como como anteriormente,

m, n, y p son independientemente de 0 a 6

y las sales y ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo.

5 Son especialmente preferentes los compuestos de fórmula I en la que

X es F, Cl o Br,

10 Y es de uno a dos grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, CN, OH, nitro, alquilo inferior, cicloalquilo, alcoxi inferior, alquenilo inferior, cicloalquenilo inferior y alquinilo inferior,

R₁ se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquenilo inferior, alquenilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo y cicloalquenilo sustituido,

15 R₂ es hidrógeno,

R₃ es H,

20 R₅ se selecciona del grupo que consiste en arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido,

R₄ es hidrógeno,

25 R₆ y R₇ se seleccionan del grupo que consiste en (CH₂)_n-R', (CH₂)_n-NR'R'', (CH₂)_n-NR'COR'', (CH₂)_n-NR'SO₂R'', (CH₂)_n-COOH, (CH₂)_n-COOR', (CH₂)_n-CONR'R'', (CH₂)_n-OR', (CH₂)_n-SR', (CH₂)_n-SOR', (CH₂)_n-SO₂R', (CH₂)_n-COR', (CH₂)_n-SO₃H, (CH₂)_n-SONR'R'', (CH₂)_n-SO₂NR'R'', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-R', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-OH, (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-OR', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-NR'R'', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-NR'COR'', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-NR'SO₂R'', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-COOH, (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-COOR', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-CONR'R'', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-SO₂R', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-COR', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-SONR'R'', (CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-SO₂NR'R'', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-OH, (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-OR', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-NR'R'', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-NR'COR'', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-NR'SO₂R'', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-COOH, (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-COOR', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-CONR'R'', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-SO₂R', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-COR', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-SONR'R'', (CH₂)_p-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_n-SO₂NR'R'', -COR', -SOR' y SO₂R' en la que

35 R' y R'' se seleccionan independientemente de H, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo inferior, cicloalquilo inferior sustituido, alquenilo inferior, alquenilo inferior sustituido, cicloalquenilo inferior, cicloalquenilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, o heterociclo sustituido, y en la que R' y R'' también se pueden unir independientemente para formar una estructura cíclica seleccionada de

40 cicloalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquenilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido o heterociclo sustituido o no sustituido,

m, n y p son independientemente de 0 a 6

45 y las sales y ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo.

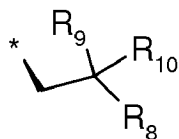
Son preferentes además los compuestos de fórmula I en la que:

X es F, Cl o Br,

50 Y es un grupo de monosustitución seleccionado de H o F y

R₁ se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquenilo inferior, alquenilo inferior sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo y cicloalquenilo sustituido.

55 Preferente además, R₁ es un alquilo inferior sustituido seleccionado de:



60 donde R₈, R₉ son ambos metilo, o se unen para formar un grupo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o aciclohexilo,

$$R_{10} \text{ es } (CH_2)_m-R_{11},$$

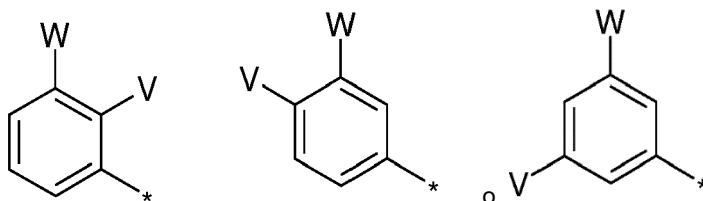
m es 0, 1 o 2,

5 R₁₁ se selecciona de hidrógeno, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo o heterociclo sustituido.

 R_2 es H ,

10 R_3 es H ,

R₅ es un fenilo sustituido seleccionado de:



W es F, Cl o Br,

V es H o F.

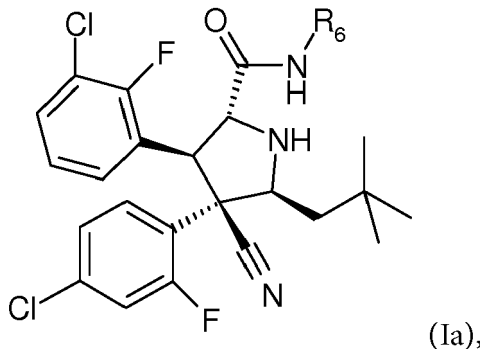
20 R₄ es hidrógeno,

uno de R_6 y R_7 es hidrógeno y el otro es $(CH_2)_n-R'$,

n es 0 o 1 y

R' se selecciona de arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo o heterociclo sustituido.

Aún en otros aspectos de la divulgación, la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula **la**



en la que R_6 y todas las variables y sustituyentes mencionados en las definiciones para R_6 tienen los significados dados por la fórmula I anterior.

35 Todavía en otros aspectos, se proporcionan los compuestos de fórmula Ia, en la que R₆ es -(CH₂)_n-R', y

R¹ es ciclohexilo, o un hidrocarburo aromático mono o bicíclico de 5 a 10 miembros en el que 1 o 2 átomos de carbono pueden estar reemplazados por N, S o O, y en la que cualquiera de los ciclohexilo o hidrocarburo aromático mencionados anteriormente pueden estar sustituidos una vez o dos veces con un grupo independientemente seleccionado de alquilo inferior, alquenilo inferior, alquilino inferior, dioxo-alquilenlo inferior (que forma, por ejemplo, un grupo benzodioxilo), halógeno, hidroxí, CN, CF₃, NH₂, N(H, alquilo inferior), N(alquilo inferior)₂, aminocarbonilo, carboxi, NO₂, alcoxi inferior, tio-alcoxi inferior, alquilsulfonilo inferior, aminosulfonilo, alquilcarbonilo inferior, alquilcarboniloxi, alcoxicarbonilo inferior, alquilo inferior-carbonil-NH, fluoro-alquilo inferior, fluoro-alcoxi inferior, alcoxi inferior-carbonil-alcoxi inferior, carboxi-alcoxi inferior, carbamoil-alcoxi inferior, hidroxí-alcoxi inferior, NH₂-alcoxi inferior, N(H, alquilo inferior)-alcoxi inferior, N(alquilo inferior)₂-alcoxi inferior, alquilo inferior-1-oxiranil-alcoxi inferior-alquilo inferior, 2-oxo-pirrolidin-1-ilo, (1,1-dioxo)-2-isotiazolidina, 3-alquilsulfonilo inferior, un anillo heterocíclico sustituido o no sustituido, un anillo arilo sustituido o no sustituido, un anillo heteroarilo sustituido o no sustituido, trifluoro-(alquilo inferior)sulfonilamino-arilo, (alquilo inferior)sulfonilaminocarbonilo, (alquilo inferior)alquilamino-

inferior)sulfonilaminocarbonil-arilo, hidroxycarbamoil-fenilo, benciloxi-alcoxi inferior, amino-sulfonilo sustituido con mono o dialquilo inferior y alquilo inferior que puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, NH₂, N(H, alquilo inferior) o N(alquilo inferior)₂; y

5 n es 0 o 1.

Todavía en otros aspectos, se proporcionan los compuestos de fórmula Ia, en la que

R₆ es -(CH₂)_n-R', y

10 R' es fenilo, piridinilo, piracínilo o pirimidinilo que puede estar cada uno sustituido o una vez o dos veces sustituido con un sustituyente independientemente seleccionado de halógeno, alcoxi C1-6, alquilo C1-6, hidroxycarbonilo, carboxi, carboxi-alcoxi C1-6, oxo y CN; y

15 n es 0.

Son especialmente preferentes los compuestos de fórmula Ia, seleccionados de

20 éster metílico del ácido rac-4-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-metil)-ciclohexanocarboxílico,

ácido rac-4-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-metil)-ciclohexanocarboxílico,

25 éster metílico del ácido rac-4-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-metil)-2-metoxi-benzoico,

ácido rac-4-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-metil)-2-metoxi-benzoico,

30 éster metílico del ácido rac-4-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-metil)-2-fluoro-benzoico,

35 ácido rac-4-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-metil)-2-fluoro-benzoico,

éster metílico del ácido 5-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-metil)-piridin-2-carboxílico quiral,

40 ácido 5-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-metil)-piridin-2-carboxílico quiral,

éster etílico del ácido 6-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-metil)-nicotínico quiral,

45 ácido 6-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-metil)-nicotínico quiral,

50 ácido rac-4-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-2-etoxi-benzoico,

(4-hidracinocarbonil-fenil)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico quiral,

55 éster *terc*-butílico del ácido [2-(4-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-fenil)-etil]-carbámico quiral,

[4-(2-amino-etil)-fenil]-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico quiral,

60 ácido 5-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-piracín-2-carboxílico quiral,

65 ácido 4-(((2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido)metil)-2-metoxibenzoico quiral,

- ácido 4-(((2S,3R,4S,5R)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-metil)-2-metoxi-benzoico quiral,
- 5 3-(4-((2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido)fenil)propanoato de metilo quiral,
- ácido 3-(4-((2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido)fenil)propanoico quiral,
- 10 ácido 4-(((2S,3R,4S,5R)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido)metil)-2-fluorobenzoico quiral,
- ácido 4-(((2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido)metil)-2-fluorobenzoico quiral,
- 15 (2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-N-(2-morfolinopirimidin-5-il)-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamida quiral,
- (2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentil-N-(pirimidin-5-il)pirrolidin-2-carboxamida quiral,
- 20 (4-dimetilaminometil-fenil)-amida del ácido (2S,3R,4S,5R)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico quiral,
- 25 (4-dimetilaminometil-fenil)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- 5-((2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido)-1H-benzo[d]imidazol-2-carboxilato de metilo quiral,
- 30 ácido -5-((2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido)-1H-benzo[d]imidazol-2-carboxílico quiral,
- 5-((2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido)benzofuran-2-carboxilato de metilo quiral,
- 35 ácido 5-((2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido)benzofuran-2-carboxílico quiral,
- 40 4-(4-((2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido)fenil)butanoato de metilo quiral,
- ácido 4-(4-((2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido)fenil)butanoico quiral,
- 45 5-((2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido)benzo[d]oxazole-2-carboxilato de metilo quiral,
- ácido 5-((2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido)benzo[d]oxazole-2-carboxílico quiral,
- 50 (2R,3S,4R,5S)-N-(benzo[d]oxazol-5-il)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamida quiral,
- éster *terc*-butilico del ácido rac-4-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-bencil)-carbámico,
- (4-aminometil-fenil)-amida del ácido rac-(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- 60 [4-(metanosulfonilamino-metil)-fenil]-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- éster etílico del ácido 1-(4-(((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-fenil)-piperidin-4-carboxílico,
- 65

- ácido 1-(4-[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-fenil)-piperidin-4-carboxílico,
- 5 (4-dimetilaminometil-fenil)-amida del ácido rac-(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- 10 ácido rac-5-[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-2-pirrolidin-1-il-benzoico,
- 15 éster *terc*-butílico del ácido rac-4-[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-4-metil-piperidin-1-carboxílico,
- (4-metil-piperidin-4-il)-amida del ácido rac-(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- 20 1-(4-[(2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido]fenil)pirrolidin-2-carboxilato de metilo,
- ácido 1-(4-[(2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-neopentilpirrolidin-2-carboxamido]fenil)pirrolidin-2-carboxílico,
- 25 ácido 5-[(2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-1H-pirrol-2-carboxílico quiral,
- 30 éster etílico del ácido 5-[(2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-1H-pirrol-2-carboxílico quiral,
- ácido (R)-2-(4-[(2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-fenil)-butírico quiral,
- 35 ácido (S)-2-(4-[(2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-fenil)-butírico quiral,
- éster metílico del ácido (S)-2-[(2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-3-thiazol-4-il-propiónico quiral,
- 40 éster metílico del ácido (S)-2-[(2S,3R,4S,5R)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-3-thiazol-4-il-propiónico quiral,
- 45 ácido (S)-2-[(2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-3-thiazol-4-il-propiónico quiral,
- 50 ácido (S)-2-[(2S,3R,4S,5R)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-3-thiazol-4-il-propiónico quiral,
- ácido 4-[(2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-1H-indole-2-carboxílico quiral,
- (5-yodo-piridin-2-il)-amida del ácido rac-(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- 55 ácido 2-cloro-4-[(2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-benzoico,
- 60 ácido 6-[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-nicotínico,
- piridin-2-ilamida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- 65 piridin-4-ilamida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,

- ácido 5-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-piridin-2-carboxílico,
- 5 piridin-3-ilamida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- (4-yodo-3,5-dimetil-fenil)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- 10 éster *terc*-butílico del ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-2-fluoro-benzoico,
- ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-2-fluoro-benzoico,
- 15 ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-3-fluoro-benzoico,
- ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-2-trifluorometil-benzoico,
- 20 (4-yodo-2-trifluorometoxi-fenil)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- 25 éster metílico del ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-3-trifluorometoxi-benzoico,
- ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-3-trifluorometoxi-benzoico,
- 30 ácido 6-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-nicotínico,
- éster metílico del ácido 6-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-nicotínico,
- 35 (6-yodo-piridin-3-il)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- 40 éster metílico del ácido 5-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-piridin-2-carboxílico,
- éster metílico del ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-3-metoxi-benzoico,
- 45 ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-3-metoxi-benzoico,
- (6-carbamoil-naftalen-2-il)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- 50 (4-carbamoil-3-cloro-fenil)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- 55 (4-carbamoil-3-trifluorometil-fenil)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- ácido 5-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-piridin-2-carboxílico,
- 60 éster metílico del ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-3-fluoro-benzoico,
- éster metílico del ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-3-cloro-benzoico,
- 65

- ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-3-cloro-benzoico,
- 5 (4-carbamoil-2-fluoro-fenil)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- (4-carbamoil-2-metoxi-fenil)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- 10 éster metílico del ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-2,5-difluoro-benzoico,
- ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-2,5-difluoro-benzoico,
- 15 (3,5-difluoro-4-yodo-fenil)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-2,6-difluoro-benzoico,
- 20 ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-3-hidroxi-benzoico,
- 25 (4-carbamoil-3-metoxi-fenil)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- (4-carbamoil-3-trifluorometoxi-fenil)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- 30 (4-carbamoil-3-fluoro-fenil)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- (4-carbamoil-2-cloro-fenil)-amida del ácido (2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico,
- 35 éster metílico del ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-2-fluoro-5-metoxi-benzoico,
- 40 ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-2-fluoro-5-metoxi-benzoico,
- ácido 2-(4-[[[(2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-fenil)-4-metil-pentanoico,
- 45 éster metílico del ácido 2-(4-[[[(2S,3R,4S,5R)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-fenil)-2-metil-propiónico quiral,
- ácido 2-(4-[[[(2R,3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-fenil)-2-metil-propiónico quiral,
- 50 [4-(1-metil-1-metilcarbamoil-etil)-fenil]-amida del ácido (2S,3R,4S,5R)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico quiral,
- 55 {4-[1-(3-hidroxi-propilcarbamoil)-1-metil-etil]-fenil}amida del ácido (2S,3R,4S,5R)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico quiral, y
- [4-(1-carbamoil-1-metil-etil)-fenil]-amida del ácido (2S,3R,4S,5R)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carboxílico quiral.
- 60 En la memoria descriptiva cuando se indican los diversos grupos, pueden estar sustituidos con 1-5 o, preferentemente, 1-3 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en alquilo inferior, alquenilo inferior, alquinilo inferior, dioxo-alquileo inferior (que forma, por ejemplo, un grupo benzodioxilo), halógeno, hidroxi, CN, CF₃, NH₂, N(H, alquilo inferior), N(alquilo inferior)₂, aminocarbonilo, carboxi, NO₂, alcoxi inferior, tio-alcoxi inferior, alquilsufonilo inferior, aminosulfonilo, alquilcarbonilo inferior, alquilcarbonilo inferior, alcoxycarbonilo inferior, alquilo inferior-carbonil-NH, fluoro-alquilo inferior, fluoro-alcoxi inferior, alcoxi inferior-carbonil-
- 65

alcoxi inferior, carboxi-alcoxi inferior, carbamoil-alcoxi inferior, hidroxi-alcoxi inferior, NH_2 -alcoxi inferior, $\text{N}(\text{H}, \text{alquilo inferior})$ -alcoxi inferior, $\text{N}(\text{alquilo inferior})_2$ -alcoxi inferior, alquilo inferior-1-oxiranil-alcoxi inferior-alquilo inferior, 2-oxo-pirrolidin-1-ilo, (1,1-dioxo)-2-isotiazolidina, 3-alquilo inferior sulfínico, un anillo heterocíclico sustituido o no sustituido, un anillo arilo sustituido o no sustituido, un anillo heteroarilo sustituido o no sustituido, trifluoro-(alquilo inferior)sulfonilamino-arilo, (alquilo inferior)sulfonilaminocarbonilo, (alquilo inferior)sulfonilaminocarbonil-arilo, hidroxycarbamoil-fenilo, benciloxi-alcoxi inferior, amino-sulfonilo sustituido con mono o dialquilo inferior y alquilo inferior que puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxi, NH_2 , $\text{N}(\text{H}, \text{alquilo inferior})$ o $\text{N}(\text{alquilo inferior})_2$. Los sustituyentes preferentes para los anillos cicloalquilo, cicloalquenilo, arilo, heteroarilo y heterociclo son halógeno, alcoxi inferior, alquilo inferior, hidroxycarbonilo, carboxi, carboxi-alcoxi inferior, oxo y CN. Los sustituyentes preferentes para alquilo son alcoxi y $\text{N}(\text{alquilo inferior})_2$.

El término "alquilo" se refiere a grupos hidrocarburo saturados de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, incluyendo grupos que tienen de 1 a aproximadamente 7 átomos de carbono. En determinados aspectos, los sustituyentes alquilo pueden ser sustituyentes alquilo inferior. El término "alquilo inferior" se refiere a grupos alquilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, y en determinados modos de realización de 1 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo, n-pentilo y s-pentilo.

Como se usa en el presente documento, "cicloalquilo" pretende referirse a cualquier sistema monocíclico o policíclico estable que consiste solo en átomos de carbono, estando cualquier anillo del mismo saturado, y el término "cicloalquenilo" pretende referirse a cualquier sistema monocíclico o policíclico estable que consiste solo en átomos de carbono, estando al menos un anillo del mismo parcialmente insaturado. Los ejemplos de cicloalquilos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, adamantilo, ciclooctilo, bicicloalquilos, incluyendo biciclooctanos tales como [2.2.2]biciclooctano o [3.3.0]biciclooctano, biciclónonanos tales como [4.3.0]biciclónonano, y biciclodecanos tales como [4.4.0]biciclodecano (decalina), o compuestos espiro. Los ejemplos de cicloalquenilos incluyen, pero no se limitan a, ciclopentenilo o ciclohexenilo.

El término "alquenilo" como se usa en el presente documento quiere decir un grupo hidrocarburo alifático de cadena lineal o ramificada insaturado que contiene un doble enlace y que tiene de 2 a 6, preferentemente de 2 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos de dicho "grupo alquenilo" son vinilo (etenilo), alilo, isopropenilo, 1-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 2-etil-1-butenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 4-metil-3-pentenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo y 5-hexenilo.

El término "alquinilo" como se usa en el presente documento quiere decir un grupo hidrocarburo alifático de cadena lineal o ramificada insaturado que contiene un triple enlace y que tiene de 2 a 6, preferentemente de 2 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos de dicho "grupo alquinilo" son etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 3-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 4-pentinilo, 1-hexinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 4-hexinilo y 5-hexinilo.

El término "halógeno" como se usa en las definiciones quiere decir flúor, cloro, bromo o yodo, preferentemente flúor y cloro.

"Arilo" quiere decir un radical hidrocarburo carboxílico aromático, monocíclico o bicíclico, monovalente, preferentemente un sistema de anillo aromático de 6-10 miembros. Los grupos arilo preferentes incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, tolilo y xililo. Cuando el grupo arilo es bicíclico, un grupo preferente es el grupo 1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-5-ilo.

"Heteroarilo" quiere decir un sistema de anillo heterocíclico aromático que contiene hasta dos anillos. Los grupos heteroarilo preferentes incluyen, pero no se limitan a, tienilo, furilo, indolilo, pirrolilo, piridinilo, piracínilo, oxazolilo, tiazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, imidazol, tiazolilo sustituido o no sustituido y tetrazolilo sustituido o no sustituido.

En el caso de arilo o heteroarilo que son bicíclicos, se debe entender que un anillo puede ser arilo mientras que el otro es heteroarilo y ambos están sustituidos o no sustituidos.

"Heterociclo" o "anillo heterocíclico" quiere decir un hidrocarburo no aromático monocíclico o bicíclico, de 5 a 8 miembros sustituido o no sustituido, en el que de 1 a 3 átomos de carbono se reemplazan por un heteroátomo seleccionado de átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre. Los ejemplos incluyen pirrolidin-2-ilo; pirrolidin-3-ilo; piperidinilo; morfolin-4-ilo y similares, que a su vez pueden estar sustituidos. "Heteroátomo" quiere decir un átomo seleccionado de N, O y S.

"Alcoxi, alcoxilo o alcoxi inferior" se refiere a cualquiera de los grupos alquilo inferior anteriores unidos a un átomo de oxígeno. Los grupos alcoxi inferior típicos incluyen metoxi, etoxi, isopropoxi o propoxi, butiloxi y similares. Otros incluidos dentro del significado de alcoxi son cadenas laterales alcoxi múltiples, por ejemplo, etoxi-etoxi, metoxi-etoxi, metoxi-etoxi-etoxi y similares y cadenas laterales alcoxi sustituidas, por ejemplo, dimetilamino-etoxi, dietilamino-etoxi, dimetoxifosforil-metoxi y similares.

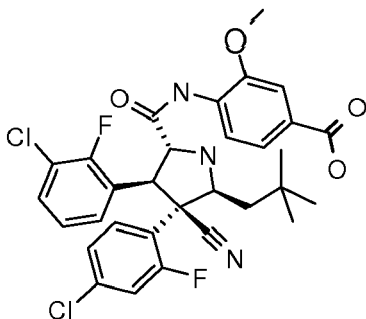
"Farmacéuticamente aceptable", tal como vehículo, excipiente, etc. farmacéuticamente aceptable, quiere decir farmacológicamente aceptable y sustancialmente no tóxico para el sujeto al que se le administra el compuesto particular.

- 5 "Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de adición de ácido o sales de adición de base convencionales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de los compuestos de la presente invención y se forman a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos o bases orgánicas o inorgánicas no tóxicos adecuados. Las sales de adición de ácido de muestra incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido fosfórico y ácido nítrico y las derivadas de ácidos orgánicos tales como ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido trifluoroacético y similares. Las sales de adición de base de muestra incluyen las derivadas de hidróxidos de amonio, potasio, sodio y amonio cuaternario, tales como, por ejemplo, hidróxido de tetrametilamonio. La modificación química de un compuesto farmacéutico (es decir, fármaco) en una sal es una técnica bien conocida por los químicos farmacéuticos para obtener una mejora en la estabilidad física y química, higroscopicidad, fluidez y solubilidad de los compuestos. Véase, por ejemplo, Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (6.^a ed. 1995) en las pp. 196 y 1456-1457.

Los compuestos de fórmula I o Ia así como sus sales que tienen al menos un átomo de carbono asimétrico pueden estar presentes como mezclas racémicas o estereoisómeros diferentes. Los diversos isómeros se pueden aislar por procedimientos de separación conocidos, por ejemplo, cromatografía.

Los compuestos divulgado en el presente documento y cubiertos por la fórmula I o Ia anterior pueden presentar tautomería o isomería estructural. Se pretende que estas fórmulas engloben cualquier forma tautómera o isómera estructural de estos compuestos, o mezclas de dichas formas, y no se limita a una forma tautómera o isómera estructural cualquiera representada en las fórmulas anteriores.

Lo más preferentemente, el inhibidor de MDM2 es ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-3-metoxi-benzoico como en la fórmula a continuación o una sal, éster o polimorfo del mismo. El ejemplo 448 del documento WO2011/098398 describe un procedimiento para la preparación de dicho compuesto. Dicho compuesto también se denomina MDM2(4) o RG7388 o RO5503781 como se usa en el presente documento como términos sinónimos.



35 Peso molecular = 616,4973
Fórmula molecular = C₃₁H₂₉Cl₂F₂N₃O₄

La preparación del inhibidor de MDM2 se lleva a cabo como se divulga en el documento WO2011/098398.

40 "Sal" se refiere a sales de los compuestos como una sal farmacéuticamente aceptable. Dichas sales se pueden ejemplificar por las sales con metales alcalinos (potasio, sodio y similares), sales con metales alcalinotérreos (calcio, magnesio y similares), la sal de amonio, sales con aminas 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 ácido (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, isetonato, glucuronato, gluconato y similares)).

50 "CI50" se refiere a la concentración de un compuesto particular requerida para inhibir un 50 % de una actividad medida específica.

El componente oligosacárido puede afectar significativamente a las propiedades pertinentes para la eficacia de una glucoproteína terapéutica, incluyendo la estabilidad física, resistencia al ataque por proteasas, interacciones con el sistema inmunitario, farmacocinética y 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 aclaramiento rápido de la glucoproteína de la circulación sanguínea a través de interacciones con proteínas de unión a carbohidrato específicas, mientras que otras se pueden unir por 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 para 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 aclaramiento rápido de la circulación sanguínea, interacciones inmunitarias no deseadas y, en algunos casos específicos, una actividad biológica reducida. Entre las células de mamífero, se han usado más comúnmente 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 celulares clonales genéticamente estables y altamente productivas. Se pueden cultivar a densidades altas en biorreactores simples usando medios sin suero y permiten el desarrollo de bioprocedimientos seguros y reproducibles. Otras células animales comúnmente usadas incluyen células de riñón de cría de hámster (BHK), 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 complejos biantenarios (Wright, A., y Morrison, S.L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32). Típicamente, existe un procesamiento heterogéneo de las estructuras de oligosacáridos nucleares acopladas en un sitio de glucosilación particular, de modo que incluso los anticuerpos monoclonales existen como glucoformas múltiples. Asimismo, se ha demostrado que se producen diferencias importantes en la glucosilación de anticuerpos entre líneas celulares e incluso se observan diferencias menores para una línea celular dada cultivada en condiciones de cultivo diferentes (Lifely, M.R., *et al.*, Glycobiology 5 (1995) 813-822).

Una forma de obtener grandes incrementos de potencia, mientras se mantiene un procedimiento de producción simple y se evitan potencialmente efectos secundarios no deseables significativos, es potenciar las funciones efectoras naturales mediadas por células de los anticuerpos monoclonales genomanipulando 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 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos acoplados a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensos 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 ("GnTIII7y), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisecados, incrementa significativamente la actividad ADCC *in vitro* de un anticuerpo monoclonal quimérico antineuroblastoma (chCE7) producido por las células CHO genomanipuladas (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 celulares industriales estándar que carecen de la enzima GnTIII (Umana, P., *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180). Este estudio fue el primero en mostrar que se podían obtener incrementos grandes de actividad ADCC genomanipulando las células productoras de anticuerpos para expresar GnTIII, lo que también dio lugar a un incremento en la proporción de oligosacáridos bisecados asociados a la región constante (Fc), incluyendo oligosacáridos no fucosilados bisecados, por encima de los niveles encontrados 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 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 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.

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. Los pacientes que tienen un "cáncer que expresa CD20" se pueden determinar por 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.

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 (DLCLB), 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.

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 (DLCLB), 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.

El término "un procedimiento de tratamiento", o sus equivalentes, cuando se aplica, por ejemplo, a cáncer, se refiere a un procedimiento o modo de acción que se diseña para reducir o eliminar el número de células cancerosas en un paciente o para aliviar los síntomas de un cáncer. "Un procedimiento de tratamiento" de cáncer o u otro trastorno proliferativo no quiere decir necesariamente que las células cancerosas u otro trastorno de hecho se reduzcan, que el número de células o trastorno de hecho se reduzca ni que los síntomas de un cáncer u otro trastorno de hecho se alivien. A menudo, un procedimiento de tratamiento de cáncer se realizará incluso con una baja probabilidad de éxito, pero que, dados los antecedentes médicos y la expectativa de supervivencia estimada de un paciente, se considera no obstante que induce un modo de acción beneficioso global.

Los términos "combinación", "coadministración" o "coadministrar" se refieren a la administración de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I o dicho anti-CD20 afucosilado, y dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 como dos formulaciones separadas (o como una única formulación). 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 anti-CD20 de tipo I o dicho anticuerpo afucosilado anti-CD20 y dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 se coadministran de forma simultánea o bien secuencial (por ejemplo, intravenosa (i.v.) a través de una infusión continua (una para el anticuerpo anti-CD20 y finalmente una para dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2; o, por ejemplo, el anticuerpo anti-CD20 se administra por vía intravenosa (i.v.) a través de una infusión continua y dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 se administran 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, el término "secuencialmente" quiere decir dentro de los 7 días después de la dosis del primer componente (anticuerpo anti-CD20 o dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2), preferentemente dentro de los 4 días después de la dosis del primer componente; y el término "simultáneamente" quiere decir al mismo tiempo. Los términos "coadministración" con respecto a las dosis de mantenimiento de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I o dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 quieren decir que las dosis de mantenimiento se pueden administrar simultáneamente, si el ciclo de tratamiento es apropiado para ambos fármacos, por ejemplo, cada semana. O bien dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 se administran, por

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

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

La cantidad de coadministración de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I o dicho anticuerpo afucosilado anti-CD20 y dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 y el momento de coadministración dependerá del tipo (especie, género, edad, peso, etc.) y estado del paciente que se está tratando y la gravedad de la enfermedad o afección que se está tratando. Dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I o dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 se coadministran adecuadamente al paciente en un momento o durante una serie de tratamientos, por ejemplo, el mismo día o el día después.

Si la administración es intravenosa, el tiempo de infusión inicial para dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado o dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 puede ser más largo que los tiempos de infusión posteriores, por ejemplo aproximadamente 90 minutos para la infusión inicial, y aproximadamente 30 minutos para infusiones posteriores (si la infusión inicial se tolera bien).

Dependiendo del tipo y la 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 de tipo I o anticuerpo anti-CD20 afucosilado; y de 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor del inhibidor de MDM2 es una dosificación candidata inicial para la coadministración de ambos fármacos al paciente. En un modo de realización, la dosificación preferente de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado (preferentemente el anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado, más preferentemente obinutuzumab) estará en el 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).

En un aspecto, la dosificación preferente de dicho inhibidor de Bcl-2 (preferentemente 4-(4-[[2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil]piperacina-1-il)-2-(1H-pirrol-2,3-bis[4-piridin-5-iloxi]-N-[[4-[[tetrahydro-2H-piran-4-ilmetil]amino]-3-[[trifluorometil]sulfonil]fenil]sulfonil]benzamida o una sal o polimorfo de la misma) estará en el 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).

En un aspecto, la dosificación preferente de dicho inhibidor de MDM2 (preferentemente ácido 4-[[2-(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-3-metoxibenzoico o una sal o polimorfo del mismo) estará en el 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).

Dependiendo del tipo (especie, género, edad, peso, etc.) y el estado del paciente y del anticuerpo anti-CD20 de tipo I, preferentemente rituximab o el tipo de anticuerpo anti-CD20 afucosilado, preferentemente el anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado, más preferentemente obinutuzumab, la dosificación y la pauta de administración de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I o dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado pueden diferir de dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD20 de tipo I o dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado se pueden administrar, por ejemplo, cada de una a tres semanas y dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 se pueden administrar diariamente o cada de 2 a 10 días. También se puede administrar una dosis de carga inicial mayor, seguida de una o más dosis menores.

La dosificación de anticuerpo anti-CD20 de tipo I (preferentemente rituximab) puede estar en el intervalo de aproximadamente 100 mg/m² a aproximadamente 1000 mg/m² el día 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57 de un ciclo de dosificación de 8 semanas.

En un modo de realización, 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 modo de realización, 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 modo de realización, de 800 a 1200 mg el día 1 de hasta nueve ciclos de dosificación de 3 a 4 semanas).

En un aspecto, la dosis para dicho inhibidor de Bcl-2, en el que el inhibidor de Bcl-2 se selecciona del grupo que consiste en los inhibidores de Bcl-2 como se describe anteriormente y es preferentemente 4-(4-[[2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil]piperacina-1-il)-2-(1H-pirrol-2,3-bis[4-piridin-5-iloxi]-N-[[4-[[tetrahydro-2H-piran-4-ilmetil]amino]-3-[[trifluorometil]sulfonil]fenil]sulfonil]benzamida, 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 al día o cada dos días como administración oral.

En un aspecto, la dosis para dicho inhibidor de MDM2, en el que un inhibidor de MDM2 se selecciona del grupo que consiste en los inhibidores de MDM2 como se describe anteriormente y es preferentemente ácido 4-[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino}-3-metoxi-benzoico, 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 al día o cada dos días como administración oral.

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

En un modo de realización, la presente invención es útil para prevenir o reducir la 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 por la duración de la supervivencia, supervivencia sin progresión, tasa de respuesta o duración de 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 esta divulgación, se pueden usar otros agentes citotóxicos, quimioterápicos o antineoplásicos adicionales, o compuestos o radiación ionizante que potencian los efectos de dichos agentes (por ejemplo, citocinas) en el tratamiento de combinación del anticuerpo anti-CD20 de tipo I o el anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 del cáncer. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto. En un modo de realización, el tratamiento de combinación de dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I, preferentemente rituximab o dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado, preferentemente el anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado, más preferentemente obinituzumab, y dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 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, platinol®), 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 hidroxiurea, enzimas que degradan aminoácidos, tales como como asparaginasa, ácido fólico y otros derivados del ácido fólico y diversos agentes antitumorales similares. Los agentes siguientes se pueden emplear también como agentes adicionales: arnifostina (por ejemplo, Ethyol®), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), doxorubicina lipo (por ejemplo, Doxil®), gemcitabina (por ejemplo, Gemzar®), daunorubicina lipo (por ejemplo, Daunoxome®), procarbazona, mitomicina, docetaxel (por ejemplo, Taxotere®), aldesleucina, carboplatino, oxaliplatino, cladribina, camptotecina, CPT 11 (irinotecan), 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, ifosfamida, idarrubicina, mesna, interferón beta, interferón alfa, mitoxantrona, topotecán, leuprolida, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, tamoxifeno, teniposido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo. En un modo de realización, el tratamiento de combinación del anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 se usan sin dichos agentes adicionales.

El uso de los agentes citotóxicos y antineoplásicos descritos anteriormente, así como de fármacos antineoplásicos específicos de diana antiproliferativos como inhibidores de proteína cinasas en regímenes quimioterápicos está en general bien caracterizado en las técnicas de tratamiento contra el cáncer, y su uso en el presente documento entra dentro de las mismas consideraciones de seguimiento de la tolerabilidad y de la eficacia y de control de 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 determinada 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 respuestas *in vitro* o 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 los modelos animales apropiados.

En el contexto de esta divulgación, se puede llevar a cabo una cantidad eficaz de radiación ionizante y/o se puede usar un radiofármaco además del tratamiento de combinación del anticuerpo anti-CD20 de tipo I o el anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 del cáncer que expresa CD20. La fuente de radiación puede ser externa o bien interna al paciente que se está tratando. Cuando la fuente es externa al paciente, el tratamiento es conocido como radioterapia externa (EBRT). Cuando la fuente de radiación es interna al paciente, el tratamiento se llama braquiritoterapia (BT). Los átomos radiactivos para su uso en el contexto de la presente invención se pueden seleccionar del grupo que incluye, pero no se limita 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 modo de realización, el tratamiento de combinación del anticuerpo anti-CD20 de tipo I o el anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 se usan 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 una radiación de dosis alta administrada en un área diana dará como resultado la muerte de células reproductivas tanto en el tumor como en tejidos normales. El régimen de dosificación de radiación se define en general en términos de dosis absorbida de radiación (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 clave del cuerpo y el grado en que se ha diseminado el tumor. Una tanda típica de tratamiento para un paciente sometido a radioterapia será una pauta de tratamiento durante un período de 1 a 6 semanas, con una dosis total de entre 10 y 80 Gy administrada al paciente en una única fracción diaria de aproximadamente 1,8 a 2,0 Gy, 5 días a la semana. En un modo de realización preferente de la presente invención, existe una sinergia cuando los tumores en pacientes humanos se tratan con el tratamiento de combinación de la invención y radiación. En otras palabras, la inhibición del crecimiento tumoral por medio de los agentes que comprenden la combinación de la invención se potencia cuando se combina con radiación, opcionalmente con agentes quimioterápicos o antineoplásicos adicionales. Los parámetros de las radioterapias coadyuvantes están contenidos, por ejemplo, en el documento WO 99/60023.

El anticuerpo anti-CD20 de tipo I o los anticuerpos anti-CD20 afucosilados se administran a un paciente de acuerdo con procedimientos conocidos, por administración intravenosa como administración intravenosa rápida o por infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial o intratecal. En un modo de realización, la administración del anticuerpo es intravenosa o subcutánea.

El inhibidor de Bcl-2 y el inhibidor de MDM2 se administran a un paciente de acuerdo con procedimientos conocidos, por administración intravenosa como administración intravenosa rápida o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía oral, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial o intratecal. En un modo de realización, la administración de dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 es intravenosa o por vía oral.

Como se usa en el presente documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir 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 de los mismos en las composiciones de la invención. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

Composiciones farmacéuticas:

Se pueden obtener composiciones farmacéuticas procesando el anticuerpo anti-CD20 y/o el inhibidor de Bcl-2 y el inhibidor de MDM2 de acuerdo con la presente invención con vehículos farmacéuticamente aceptables, inorgánicos u orgánicos. Se pueden usar lactosa, almidón de maíz o derivados del mismo, talco, ácidos esteáricos o sus sales y similares, por ejemplo, como dichos vehículos para comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas y cápsulas de gelatina dura. Los vehículos adecuados para cápsulas de gelatina blanda son, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos y líquidos y similares. Dependiendo de la naturaleza de la sustancia activa, sin embargo, normalmente no se requieren vehículos en el caso de cápsulas de gelatina blanda. Los vehículos adecuados para la producción de soluciones y jarabes son, por ejemplo, agua, polioles, glicerol, aceite vegetal y similares. Los vehículos adecuados para supositorios son, por ejemplo, aceites naturales o 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. También pueden contener todavía otras sustancias terapéuticamente valiosas.

En un aspecto de la divulgación, la composición comprende tanto dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I (preferentemente rituximab) como 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) y dicho inhibidor de Bcl-2 y dicho inhibidor de MDM2 para su uso en el tratamiento del cáncer, en particular del cáncer que expresa CD20 (preferentemente un linfoma o leucemia linfocítica, más preferentemente un linfoma no hodgkiniano de linfocitos B (LNH), 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 Waldenstrom o linfoma primario del SNC).

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

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica, por ejemplo, para su uso en cáncer, que comprende (i) una primera cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I (preferentemente rituximab) o 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 Bcl-2 y un inhibidor de MDM2. Dicha composición comprende opcionalmente vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Se preparan composiciones farmacéuticas del anticuerpo anti-CD20 de tipo I o el anticuerpo anti-CD20 afucosilado solo para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza 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 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 metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

Las composiciones farmacéuticas del inhibidor de Bcl-2 y el inhibidor de MDM2 pueden ser similares a las descritas anteriormente para el anticuerpo anti-CD20 de tipo I o el anticuerpo anti-CD20 afucosilado.

Las composiciones farmacéuticas de molécula pequeña, el inhibidor de Bcl-2 y el inhibidor de MDM2, incluyen las adecuadas para 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 por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica de farmacia. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del huésped que se está tratando, así como del modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma de dosificación individual será en general la cantidad de un inhibidor de Bcl-2 y un inhibidor de MDM2 que produce un efecto terapéutico. En general, de un cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente un 1 por ciento a aproximadamente un noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferentemente de aproximadamente un 5 por ciento a aproximadamente un 70 por ciento, lo más preferentemente de aproximadamente un 10 por ciento a aproximadamente un 30 por ciento. Los procedimientos para preparar estas composiciones incluyen la etapa de asociar un inhibidor de Bcl-2 y un inhibidor de MDM2 con el vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones farmacéuticas del inhibidor de BTK se preparan asociando de manera uniforme e íntima un inhibidor de Bcl-2 y un inhibidor de MDM2 con vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y a continuación, si es necesario, dando forma al producto. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, obleas, sobres, pastillas, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base saborizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una 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 arábiga) y/o como enjuagues bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un inhibidor de Bcl-2 y un inhibidor de MDM2 como ingrediente activo. Un inhibidor de Bcl-2 y un inhibidor de MDM2 también se pueden administrar como una inyección intravenosa rápida, electuario o pasta.

En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo anti-CD20 de tipo I o el anticuerpo anti-CD20 afucosilado y el inhibidor de Bcl-2 y el inhibidor de MDM2 se formulan en dos composiciones farmacéuticas separadas.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmelacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro 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, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación mantenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico), polilactidas (documento US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

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

Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab o dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo B-Ly1 humanizado y dicho inhibidor de Bcl-2 es 4-(4-([2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil)piperacina-1-il)-2-(1H-pirrol-2,3-b)piridin-5-iloxi)-N-({4-([tetrahydro-2H-piran-4-ilmetil]amino)-3-[(trifluorometil)sulfonyl]fenil}sulfonyl)benzamida o una sal o polimorfo de la misma y dicho inhibidor de MDM2 es ácido 4-[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-3-metoxi-benzoico o una sal o polimorfo del mismo, y dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20, preferentemente un linfoma o leucemia linfocítica.

Un aspecto de la divulgación es una composición farmacéutica que comprende una combinación de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I o 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 4-(4-([2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil)piperacina-1-il)-2-(1H-pirrol-2,3-b)piridin-5-iloxi)-N-({4-([tetrahydro-2H-piran-4-ilmetil]amino)-3-[(trifluorometil)sulfonyl]fenil}sulfonyl)benzamida o una sal o polimorfo de la misma y ácido 4-[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-3-metoxi-benzoico o una sal o polimorfo del mismo, para el tratamiento del cáncer, en el que dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20, preferentemente un linfoma o leucemia linfocítica.

La presente divulgación proporciona además 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 de tipo I o 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 Bcl-2 y un inhibidor de MDM2.

En un aspecto, la cantidad de fucosa es 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, el anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab.

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 Bcl-2 es 4-(4-([2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil)piperacina-1-il)-2-(1H-pirrol-2,3-b)piridin-5-iloxi)-N-({4-([tetrahydro-2H-piran-4-ilmetil]amino)-3-[(trifluorometil)sulfonyl]fenil}sulfonyl)benzamida o una sal o polimorfo de la misma.

Preferentemente, dicho inhibidor de MDM2 es ácido 4-[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino)-3-metoxi-benzoico o una sal o polimorfo del mismo.

Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab o dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo B-Ly1 humanizado y dicho inhibidor de Bcl-2 es 4-(4-([2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil)piperacina-1-il)-2-(1H-pirrol-2,3-bispiridin-5-il)-N-([4-([tetrahydro-2H-piran-4-il]metil)amino]-3-[(trifluorometil)sulfonyl]fenil)sulfonyl)benzamida o una sal o polimorfo de la misma y dicho inhibidor de MDM2 es ácido 4-((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil)-amino)-3-metoxi-benzoico o una sal o polimorfo del mismo, 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 de tipo I o un anticuerpo anti-CD20 afucosilado (por ejemplo, un paciente que padece cáncer que expresa CD20) para cualquier propósito, y más preferentemente un ser humano que necesita dicho tratamiento para tratar 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.

La presente divulgación proporciona además un anticuerpo anti-CD20 de tipo I o un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos, y un inhibidor de Bcl-2 y un inhibidor de MDM2 para su uso en el tratamiento del cáncer.

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

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 Bcl-2 es 4-(4-([2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil)piperacina-1-il)-2-(1H-pirrol-2,3-bispiridin-5-il)-N-([4-([tetrahydro-2H-piran-4-il]metil)amino]-3-[(trifluorometil)sulfonyl]fenil)sulfonyl)benzamida o una sal o polimorfo de la misma y dicho inhibidor de MDM2 es ácido 4-((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil)-amino)-3-metoxi-benzoico o una sal o polimorfo del mismo.

Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I es rituximab o dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo B-Ly1 humanizado, más preferentemente obinutuzumab, y dicho inhibidor de Bcl-2 es 4-(4-([2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil)piperacina-1-il)-2-(1H-pirrol-2,3-bispiridin-5-il)-N-([4-([tetrahydro-2H-piran-4-il]metil)amino]-3-[(trifluorometil)sulfonyl]fenil)sulfonyl)benzamida o una sal o polimorfo de la misma y dicho inhibidor de MDM2 es ácido 4-((2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil)-amino)-3-metoxi-benzoico o una sal o polimorfo del mismo, y dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20, preferentemente un linfoma o leucemia linfocítica.

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

Listado de secuencias

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

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

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

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

Procedimientos experimentales

Ejemplo 1:

Ejemplo

Eficacia antitumoral *in vivo*

Se evaluó la eficacia antitumoral *in vivo* del anticuerpo específico para CD20 obinutuzumab en combinación con el inhibidor de bcl-2 GDC-0199 y el inhibidor de MDM2 RG7388 frente a xenoinjertos de LDLBG DOHH2 (CD20+,

p53wt). Como se usa en el presente documento, se usa obinutuzumab como sinónimo de RO5072759 y B-HH6-B-KV1 GE. Como se usa en el presente documento, dicho inhibidor de bcl-2 GDC-0199 es el siguiente compuesto químico: 4-(4-([2-(4-clorofenil)-4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil)piperacina-1-il)-2-(1H-pirrol-2,3-bispiridin-5-iloxi)-N-({4-([tetrahydro-2H-piran-4-ilmetil]amino)-3-[(trifluorometil)sulfonyl]fenil}sulfonyl)benzamida o una sal o una forma polimórfica de la misma. Como se usa en el presente documento, dicho inhibidor de MDM2 RG7388 es el siguiente compuesto químico ácido 4-([[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetilpropil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-3-metoxi-benzoico o una sal o una forma polimórfica del mismo.

Agentes de prueba

Se proporcionó el anticuerpo para CD20 obinutuzumab como solución madre de Roche, Basilea, Suiza. El tampón para anticuerpo incluyó histidina. Se diluyó solución de anticuerpo apropiadamente en tampón a partir de la reserva antes de las inyecciones. Se proporcionó el inhibidor de MDM2(4) como formulación SDP de Roche, Basilea, Suiza y se resuspendió antes de su uso. Se proporcionó el inhibidor de Bcl-2 GDC-0199 por GNE, SSF, EE. UU. y se formuló antes de su uso.

Línea celular y condiciones de cultivo

Se estableció la línea celular de LNH de linfocitos B humano DOHH-2 original (LDL BG) en el NCI y se adquirió de ATCC (Manassas, VA, EE. UU.). Se realizó la expansión de células tumorales para el trasplante por el robot de cultivo celular TAP Compact CellBase de acuerdo con el protocolo. Se cultivó de forma rutinaria la línea celular tumoral en medio RPMI 1640, FCS al 10 % y L-glutamina 2 mM a 37 °C en una atmósfera saturada de agua en CO₂ al 5 %. Se realizó el paso de cultivo con separación 1x de tripsina/EDTA dos veces por semana y se usó el paso 2 para trasplante.

Animales

Ratones SCID beige hembra, de 6-7 semanas de edad a su llegada, mantenidos en condiciones sin patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las directrices acordadas. Se revisó el protocolo de estudio experimental y se aprobó por el gobierno local. Después de su llegada, se mantuvo a los animales en una instalación para animales durante una semana para que se acostumbraran al nuevo entorno y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento de salud continuo regularmente. Se proporcionaron alimentos dietéticos y agua esterilizada en autoclave a voluntad.

Seguimiento

Se controló a los animales diariamente para determinar síntomas clínicos y detección de efectos adversos. Para el seguimiento en todo el experimento se documentó el peso corporal de los animales.

Tratamiento de animales

En tratamiento de animales comenzó después de la aleatorización cuando la mediana del tamaño tumoral fue de aproximadamente 200 mm³. Se administró el anticuerpo para CD20 obinutuzumab como agente único y en combinación a 10 mg/kg i.p. una vez por semana los días 13, 21 y 27. Se administró el vehículo correspondiente los mismos días. Se realizó el tratamiento oral del inhibidor de MDM2(4) RG7388 a 30 mg/kg como agente único y en combinación los días 13-17, 20-24 y 27-29. Finalmente, se administró por vía oral el inhibidor de bcl-2 GDC-0199 a 100 mg/kg los días 13-29 como agente único y en combinación.

Eficacia antitumoral

Se inocularon s.c. células de linfoma difuso de linfocitos B grandes humano DOHH-2 (LDL BG) (CD20+, p53wt) con Matrigel en ratones SCID beige hembra. Se aleatorizaron ratones portadores de tumor 13 días después a los grupos de estudio indicados y se inició el tratamiento con compuesto. Se trató a los animales portadores de tumor con control de vehículo, con el inhibidor de MDM2(4) RO5503781 (RG7388) a 30 mg/kg, con el anticuerpo anti-CD20 obinutuzumab a 10 mg/kg o con el inhibidor de bcl-2 GDC-0199 (100 mg/kg) como agente único. Además, un grupo de estudio recibió la combinación triple de inhibidor de MDM2 RG7388, anticuerpo para CD20 obinutuzumab e inhibidor de bcl-2 GDC-0199. Como resultado, todos los compuestos administrados como agente único demostraron eficacia antitumoral significativa frente a xenoinjertos de DOHH-2. Con más detalle, el tratamiento con el inhibidor de MDM2(4) RO5503781 (RG7388) dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral de un 56 % frente a xenoinjertos de DOHH2 p53wt en comparación con el control. Se observó una eficacia similar después del tratamiento con el inhibidor de bcl-2 GDC-0199 (ICT 60 %), mientras que la mejor eficacia como agente único se logró después del tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 obinutuzumab que alcanzó casi la estasis tumoral (ICT 90 %). Sin embargo, se observó una eficacia superior para el grupo de combinación triple que incluye el inhibidor de MDM2 RG7388 más el anticuerpo para CD20 obinutuzumab más el inhibidor de bcl-2 GDC-0199. Con más detalle, el enfoque de combinación triple indujo sustancialmente regresión tumoral pronto, que alcanzó finalmente un 90 %

con un 30 % de remisiones tumorales completas. La fuerte eficacia del brazo de combinación triple fue sinérgicamente superior en comparación con los brazos de agente único respectivos.

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Pauta	ICT %	% regresión	npTCR e IC
inhibidor de MDM2(4) (RO5503781)	30	cada día durante 13 días	56	-	0,48 (IC 0,33- 0,68)
CD20 Mab (obinutuzumab)	10	cada 7 días durante 3 ciclos	90	-	0,17 (IC 0,08- 0,24)
inhibidor de Bcl-2 GDC-0199	100	cada día durante 17 días	60	-	0,43 (IC 0,27- 0,67)
inhibidor de MDM2(4)+ obinutuzumab+	30	cada día durante 13 días	>100	90	0,009 (IC 0,00- 0,02)
	10	cada 7 días durante 3 ciclos			
GDC-0199	100	cada día durante 17 días			

5 Tabla 2

Ejemplo 2

10 Anticuerpo específico para CD20 obinuzumab en combinación con inhibidor de bcl-2 GDC-0199 e inhibidor de MDM2 RG7388.

También en este ejemplo, se usa el anticuerpo específico para CD20 obinutuzumab en combinación con el inhibidor de bcl-2 GDC-0199 y el inhibidor de MDM2 RG7388. Como se usa en el presente documento, se usa obinutuzumab como sinónimo de RO5072759 y B-HH6-B-KV1 GE. Como se usa en el presente documento, dicho inhibidor de bcl-2 GDC-0199 es el siguiente compuesto químico: 4-(4-[[2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil]piperacina-1-il)-2-(1H-pirrol-2,3-b)piridin-5-iloxi)-N-({4-[(tetrahydro-2H-piran-4-ilmetil)amino]-3-[(trifluorometil)sulfonyl]fenil)sulfonyl}benzamida o una sal o una forma polimórfica de la misma. Como se usa en el presente documento, dicho inhibidor de MDM2 RG7388 es el siguiente compuesto químico ácido 4-[[[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-3-metoxi-benzoico o una sal o una forma polimórfica del mismo.

25 **Actividad antitumoral del tratamiento combinado de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II RO5072759 (B-HH6-B-KV1 GE), el inhibidor específico de Bcl-2 GDC-0199 (Abt-199, RG7601) y el antagonista de MDM2 RG7388 (RO5503781).**

Agentes de prueba

Se proporcionó el anticuerpo anti-CD20 de tipo II B-HH6-B-KV1 GE (= B-Ly1 humanizado, B-HH6-B-KV1 glucomanipulado, véanse los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875) como solución madre (c=9,4 mg/ml) de GlycArt, Schlieren, Suiza, en tampón de histidina, trehalosa y polisorbato 20. Se diluyó el anticuerpo con PBS antes de la aplicación *in vivo*.

Se obtuvo el inhibidor de Bcl-2 GDC-0199 de Genentech Inc., CA, EE. UU. Se proporcionó el antagonista de MDM2(4) RG7388 (RO5503781) por la unidad Small Molecule Process Research and Development Unit, Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza.

Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se cultivó la línea celular de linfoma de células del manto Z138 humano en DMEM complementado con suero fetal bovino al 10 % (PAA Laboratories, Austria) y L-glutamina 2 mM a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO₂ al 5 %. Para experimentos de xenoinjerto *in vivo*, se coinjertaron las células con Matrigel.

Animales

45 Se mantuvo a los ratones SCID beige hembra, de 4-5 semanas de edad a su llegada (adquiridos de Charles River, Sulzfeld, Alemania), en la zona de cuarentena de la instalación para animales durante una semana y después de

eso en condiciones sin patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las directrices (GV-Solas; Felasa; TierschG). Se revisó el protocolo de estudio experimental y se aprobó por Roche y el gobierno local (Regierung von Oberbayern; n.º registro 55.2-1-54-2531.2-26-09). Se proporcionaron alimentos dietéticos (KLIBA NAFAG 3807) y agua (filtrada) a voluntad.

Seguimiento

Se realizó un seguimiento de los animales diariamente para determinar síntomas clínicos y detección de efectos adversos. Durante el experimento, se comprobó el peso corporal de los animales dos veces por semana y se midió el volumen tumoral con un calibrador.

Tratamiento de animales

El tratamiento de animales comenzó el día de la aleatorización 18 días después de la inoculación de células tumorales. Se administró el anticuerpo anti-CD20 humanizado de tipo II humanizado RO5072759 B-HH6-B-KV1 GE (obinutuzumab) como agente único i.p. q7d una vez por semana (día 18, 25, 32) durante 3 semanas a una dosificación de 0,5 mg/kg. Se administró el inhibidor de bcl-2 GDC-0199 p.o. una vez al día (del día 18 al día 36) durante 19 días a una dosificación de 100 mg/kg. Se administró el antagonista de MDM2 RG7388 (RO5503781) p.o. una vez al día durante 5 días a una dosificación de 100 mg/kg (compuesto activo) del día 18 al día 22 y se administró durante 12 días a una dosificación de 80 mg/kg (compuesto activo) del día 25 al día 36. No hubo tratamiento los días 23 y 24. En los grupos de combinación, se administraron RO5072759 B-HH6-B-KV1 GE, MDM2(4) y GDC-0199 en las mismas dosificaciones y los mismos días. Se administró el vehículo correspondiente los mismos días.

Inhibición del crecimiento tumoral (ICT) el día 32

El tratamiento de monoterapia usando RO5072759, GDC-0199 o RG7388 (RO5503781) dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral de un 47 %, 53 % o 67 %, respectivamente. La combinación de RO5072759 con GDC-0199 o RG7388 (RO5503781) proporcionó una inhibición del crecimiento tumoral de un 85 % o 86 %, respectivamente. La combinación de RG7388 (RO5503781) con GDC-0199 y la combinación triple mostró regresión tumoral (ICT>100 %) el día 32 después de la inoculación de células tumorales.

Para dilucidar los efectos a largo plazo de los diversos tratamientos, se realizó un análisis de tiempo hasta el acontecimiento hasta el día 125 después de la inoculación de células tumorales. La combinación triple dio como resultado una remisión tumoral completa en todos los animales hasta el día 125 (finalización del estudio). La combinación de RG7388 (RO5503781) y RO5072759 dio como resultado 5 animales sin tumor (5 de 10). La monoterapia con RO5072759 a la dosis subóptima de 0,5 mg/kg dio como resultado 2 animales sin tumor al final del estudio.

El parámetro "mediana del tiempo hasta el acontecimiento" de cada grupo se indica en la tabla 3.

Tabla 3: Resumen de resultados del análisis de tiempo hasta el acontecimiento

Grupo	Número de animal	* Mediana de tiempo hasta el acontecimiento (días para alcanzar VT de 1500 mm ³)	Animales sin tumor el día 125	Número de animales con recrecimiento tumoral	Número de animales con crecimiento tumoral reducido o que no responden al tratamiento
Vehículo	10	25	---	---	---
GA101	10	28	2	0	8
MDM2(4)	9	30	0	0	9
GDC-0199	10	29	0	0	10
MDM2(4)+GA101	10	>125	5	2	3
GDC-0199+GA101	10	38	0	0	10
GDC-0199+MDM2(4)	9	75	0	7	2
GDC-0199+MDM2(4)+GA101	10	no alcanzado	10 !!!	0	0

* La mediana de tiempo hasta el acontecimiento es el tiempo (número de días) en que la mitad de los animales presenta un acontecimiento

Como se divulga en el presente documento y se adjunta también en el listado de secuencias, las siguientes secuencias son parte de la presente divulgación:

SECUENCIAS

SEQ ID NO:1

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

SEQ ID NO:2

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)

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

- 5 **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

- 10 **SEQ ID NO:5**

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

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

- 5 **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

- 10 **SEQ ID NO:7**

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

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

- 5 **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
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

- 10 **SEQ ID NO:9**

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

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

- 5 **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
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

- 10 **SEQ ID NO:11**

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

SEQ ID NO:12

- 5 **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
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

- 10 **SEQ ID NO:13**

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

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

- 5 **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

- 10 **SEQ ID NO:15**

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

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

- 5 **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

- 10 **SEQ ID NO:17**

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

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

- 5 **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

- 10 **SEQ ID NO:19**

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

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

5 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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Politerapia

<130> P32901

<130> 31861

10 <150> EP 15169199.5

<151> 2015-05-26

<160> 20

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 112

20 <212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> MISC_FEATURE

25 <223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo anti-CD20 monoclonal murino B-Ly1

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

30 <210> 2

<211> 103

<212> PRT

35 <213> Mus sp.

<220>

<221> MISC_FEATURE

ES 2 744 624 T3

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

<400> 2

5

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100

<210> 3

<211> 119

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

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

<400> 3

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

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

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

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

20

ES 2 744 624 T3

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH3)

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

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

<220>

ES 2 744 624 T3

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

<400> 5

5

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 119

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH5)

<400> 6

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

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

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

20

ES 2 744 624 T3

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH6)

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 119

<212> PRT
<213> Artificial

<220>

5 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH7)

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

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

20

<400> 9

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

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

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

ES 2 744 624 T3

35

40

45

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

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

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

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

5 <210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL8)

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 12
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL10)

25 <400> 12

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

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

ES 2 744 624 T3

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL11)

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL12)

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

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

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

<400> 15

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

ES 2 744 624 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL14)

<400> 16

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

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

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

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

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

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

ES 2 744 624 T3

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL15)

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL16)

<400> 18

ES 2 744 624 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL17)

<400> 19

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

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

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

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

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

ES 2 744 624 T3

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo B-Ly1 humanizado
B-KV1

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Val
115

REIVINDICACIONES

- 5 1. 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 en Asn297, y 4-(4-([2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil}piperacina-1-il)-N-({3-nitro-4-([tetrahydro-2H-piran-4-ilmetil]amino)fenil}sulfonyl)-2-(1H-pirrol[2,3-b]piridin-5-iloxi)benzamida (GDC-0199, ABT199) y ácido 4-([[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-cloro-2-fluoro-fenil)-3-(3-cloro-2-fluoro-fenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-2-carbonil]-amino]-3-metoxi-benzoico (RG7388) o una sal de los mismos para su uso en el tratamiento del
10 cáncer.
2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20.
- 15 3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma o leucemia linfocítica.
4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el anticuerpo anti-CD20 afucosilado es obinutuzumab.
20
5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la 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.

Figura 1

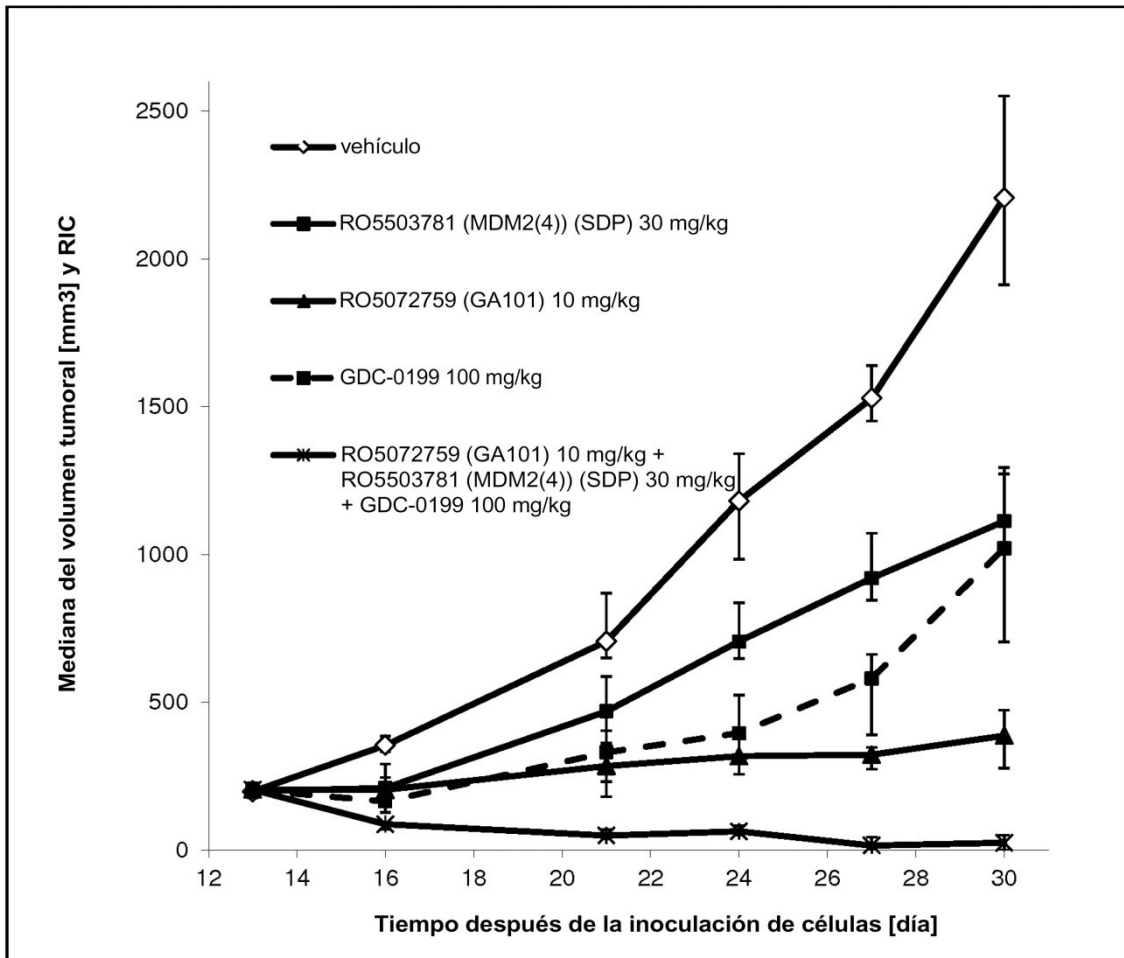


Figura 2

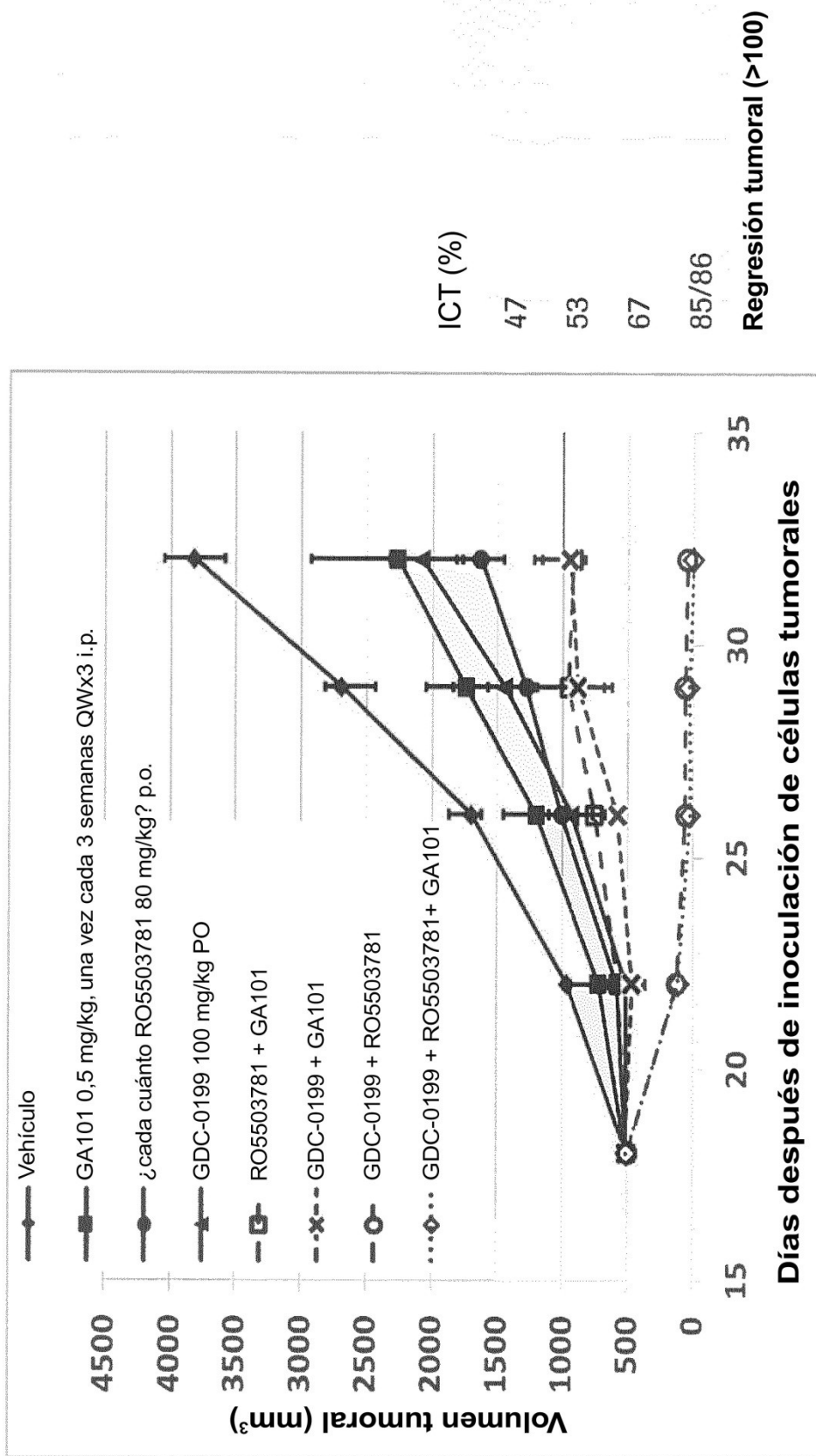


Figura 3

