

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0816458-4 A2**

(22) Data de Depósito: 20/08/2008
(43) Data da Publicação: 12/03/2013
(RPI 2201)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/28
A61K 39/395
A61P 35/02

(54) **Título:** TERAPIA COMBINADA COM ANTICORPOS ANTI-CD20 TIPO I E TIPO II

(30) **Prioridade Unionista:** 05/09/2007 EP 07 017337.2

(73) **Titular(es):** F. Hoffmann-La Roche AG, Roche Glycart AG

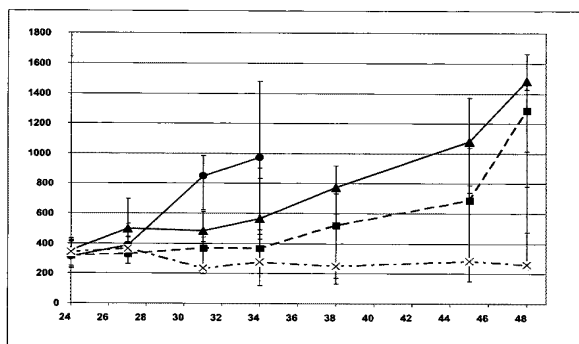
(72) **Inventor(es):** Christian Klein, Pablo Umana , Thomas Friess

(74) **Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2008006833 de 20/08/2008

(87) **Publicação Internacional:** WO 2009/030368de 12/03/2009

(57) **Resumo:** TERAPIA COMBINADA COM ANTICORPOS ANTI-CD20 TIPO I E TIPO II. A presente invenção refere-se à terapia combinada de um anti-corpo anti-CD20 tipo 1 e tipo II para o tratamento de câncer, especialmente de câncer que expressa CD20.



**Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "TERAPIA
COMBINADA COM ANTICORPOS ANTI-CD20 TIPO I E TIPO II".**

A presente invenção refere-se ao uso de dois anticorpos diferentes anti-CD20 para a produção de um medicamento destinado ao tratamento
5 de câncer, especialmente de cânceres que expressam CD20.

Antecedentes da invenção

A molécula de CD20 (também denominada antígeno de diferenciação restrito aos linfócitos B humanos ou Bp35) é uma proteína transmembrana hidrofóbica com peso molecular de aproximadamente 35 kD, presente
10 em pré-linfócitos B e em linfócitos B maduros (Valentine, M.A., *et al. J. Biol. Chem.* 264(19) (1989) 11282-11287; e Einfield, D.A., *et al. EMBO J.* 7(3) (1988) 711-717). A proteína CD20 é encontrada sobre a superfície de mais de 90% das células B do sangue periférico ou de órgãos linfoides, cuja expressão ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento de células pré-B e que
15 permanece até a diferenciação celular no plasma. A proteína CD20 está presente tanto em células B normais como em células B malignas. Especificamente, a proteína CD20 é expressa em mais de 90% das células B de linfomas não-Hodgkin (NHL) (Anderson, K.C., *et al., Blood* 63(6) (1984) 1424-1433), porém esta não é encontrada em células-tronco hematopoiéticas, pré-células B, células normais no plasma ou em outros tecidos normais (Tedder,
20 T.F., *et al., J. Immunol.* 135 (2) (1985) 973- 979).

A região terminal carboxila da proteína CD20, composta por 85 aminoácidos, está localizada dentro do citoplasma. O comprimento desta região contrasta com aquele de outras estruturas superficiais específicas da
25 célula B, tais como cadeias pesadas de IgM, IgD e de IgG ou cadeias α ou β de antígenos de histocompatibilidade da classe I1, as quais possuem regiões intracitoplasmáticas relativamente curtas, formadas por 3, 3, 28, 15 e 16 aminoácidos, respectivamente (Komaromy, M., *et al., NAR* 11 (1983) 6775-6785). Dentre os últimos 61 aminoácidos da carboxila terminal, 21 são resíduos
30 ácidos, enquanto que apenas 2 são básicos, indicando que esta região exibe uma forte carga negativa final. Seu N° de Acesso do GenBank é NP-690605. Acredita-se que a CD20 possa estar envolvida na regulação de uma

ou mais etapas iniciais no processo de ativação e diferenciação de células B (Tedder *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 25 Vol. 16 (1986) 881-887) e que poderia funcionar como canal do íon cálcio (Tedder, T.F., *et al.*, *J. Cell. Biochem.* 14D (1990) 195).

- 5 Existem dois tipos diferentes de anticorpos anti-CD20 que diferem significativamente no modo como se ligam a CD20 e em suas atividades biológicas (Cragg, M.S., *et al*, *Blood*, 103 (2004) 2738-2743; e Cragg, M.S., *et al*, *Blood*, 101 (2003) 1045-1052). Anticorpos tipo I, como o Rituximab, são potentes na citotoxicidade mediada por complemento, enquanto que anticorpos
- 10 tipo II, como Tositumomab (B1), 11B8 e AT80, ou anticorpos humanizados B-Ly1, dão início efetivamente à morte de células-alvo por meio de apoptose independente de caspases com exposição simultânea de fosfatidilserina.

As características compartilhadas comuns de anticorpos anti-CD20 tipo I e tipo II são resumidas na Tabela 1.

- 15 Tabela 1: Propriedades de anticorpos anti-CD20 tipo I e tipo II

Anticorpos anti-CD20 tipo I	Anticorpos anti-CD20 tipo II
Epitopo de CD20 tipo I	Epitopo de CD20 tipo II
Localizam CD20 para grande quantidade (rafts) lipídica	Não localizam CD20 para grande quantidade (rafts) lipídica
Maior CDC (se do isotipo IgG1)	Menor CDC (se do isotipo IgG1)
Atividade (se do isotipo IgG1)	Atividade ADCC (se do isotipo IgG1)
Plena capacidade de ligação	Capacidade reduzida de ligação
Agregação homotípica	Agregação homotípica mais forte
Indução de apoptose mediante reticulação	Forte indução de morte celular sem reticulação

O documento WO2004035607 refere-se a anticorpos monoclonais humanos contra CD20 e a seu uso para o tratamento de doenças associadas a células que expressam CD20.

Sumário da invenção

- 20 A invenção compreende o uso de um anticorpo anti-CD20 tipo I

para a produção de um medicamento destinado ao tratamento de câncer com expressão de CD20, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é coadministrado com um anticorpo anti-CD20 tipo II.

5 A invenção compreende ainda o uso de um anticorpo anti-CD20 tipo I, como primeiro anticorpo anti-CD20 para a produção de um medicamento destinado ao tratamento de câncer com expressão de CD20, caracterizado pelo fato de que:

a) o referido primeiro anticorpo anti-CD20 tem uma razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do
10 referido primeiro anticorpo anti-CD20 comparado ao rituximab de 0,8 a 1,2,

b) o referido primeiro anticorpo anti-CD20 é coadministrado com um anticorpo anti-CD20 tipo II, como um segundo anticorpo anti-CD20,

c) o referido segundo anticorpo anti-CD20 tem uma razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do
15 referido segundo anticorpo anti-CD20 comparado ao rituximab de 0,3 a 0,6.

A invenção ainda compreende o uso de um anticorpo anti-CD20 tipo I para a produção de um medicamento para o tratamento de um paciente que sofre de câncer que expressa CD20, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD tipo I é coadministrado com um anticorpo anti-
20 CD20 tipo II.

A invenção compreende ainda o uso de um anticorpo anti-CD20 tipo I como primeiro anticorpo anti-CD20 para a produção de um medicamento destinado ao tratamento de um paciente que sofre de câncer que expressa CD20, caracterizado pelo fato de que:

25 a) o referido primeiro anticorpo anti-CD20 tem uma razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido primeiro anticorpo anti-CD20 comparado ao rituximab de 0,8 a 1,2,

b) o referido primeiro anticorpo anti-CD20 é coadministrado com um anticorpo anti-CD20 tipo II, como segundo anticorpo anti-CD20,

30 c) o referido segundo anticorpo anti-CD20 tem uma razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido segundo anticorpo anti-CD20 comparado ao rituximab de 0,3 a 0,6.

A invenção compreende ainda um anticorpo anti-CD20 tipo I para o tratamento de câncer que expressa CD20, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é coadministrado com um anticorpo anti-CD20 tipo II.

5 A invenção compreende ainda um anticorpo anti-CD20 tipo I para o tratamento de um paciente que sofre de câncer que expressa CD20, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é coadministrado com um anticorpo anti-CD20 tipo II.

De preferência, o câncer que expressa CD20 é linfoma de não-Hodgkin (NHL) de células B.

De preferência, os referidos primeiro e segundo anticorpos anti-CD20 (tipo I e tipo II) são anticorpos monoclonais.

De preferência, o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é rituximab.

De preferência, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II é um anticorpo B-Ly1 humanizado.

De preferência, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II tem citotoxicidade celular dependente de anticorpos aumentada (ADCC).

De preferência, o referido anticorpo anti-CD20 tipo I possui como razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido primeiro anticorpo anti-CD20 comparado ao rituximab de 0,9 a 1,1.

De preferência, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II possui uma razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido segundo anticorpo anti-CD20 comparado ao rituximab de 0,35 a 0,55, mais preferivelmente, de 0,4 a 0,5.

Em uma concretização preferida da invenção, o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é rituximab, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II é um anticorpo B-Ly1 humanizado e o referido câncer que expressa CD20 é linfoma de não-Hodgkin (NHL) de células B.

30 A invenção compreende ainda um kit contendo um anticorpo anti-CD20 tipo II e um anticorpo anti-CD20 tipo I para o tratamento combinado de um paciente com câncer que expressa CD20.

De preferência, o kit é caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é rituximab, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II é um anticorpo B-Ly1 humanizado e o referido câncer que expressa CD20 é linfoma de não-Hodgkin (NHL) de células B.

5 Descrição detalhada da invenção

O termo "anticorpo" abrange as várias formas de anticorpos, incluindo, entre outras, anticorpos inteiros, anticorpos humanos, anticorpos humanizados e anticorpos construídos geneticamente, como anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos ou anticorpos recombinantes, bem como
10 fragmentos destes anticorpos, desde que as propriedades características de acordo com a invenção sejam retidas.

Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpos monoclonais", como utilizados neste relatório, se referem à preparação de moléculas de um anticorpo com uma única composição de aminoácidos.
15 Dessa forma, o termo "anticorpo monoclonal humano" refere-se a anticorpos exibindo uma única especificidade de ligação com regiões variáveis e constantes derivadas de sequências na linhagem germinativa de imunoglobulinas humanas. Em uma concretização, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por hibridoma incluindo uma célula B obtida de um animal trans-
20 gênico não-humano, por exemplo, um camundongo transgênico, com genoma compreendendo o transgene de uma cadeia pesada humana e o transgene de uma cadeia leve humana, fundidas para formação de uma célula imortalizada.

De preferência, os referidos primeiro e segundo anticorpos anti-
25 CD20 (tipo I e tipo II) são anticorpos monoclonais.

O termo "anticorpo quimérico" refere-se a um anticorpo monoclonal compreendendo uma região variável, isto é, região de ligação, proveniente de uma única origem ou espécie, e pelo menos uma parte de uma região constante derivada de uma origem ou espécie diferente, preparada
30 geralmente por técnicas de DNA recombinante. Anticorpos quiméricos, compreendendo uma região variável murina e uma região constante humana, são especialmente preferidos. Estes anticorpos quiméricos muri-

nos/humanos são produto da expressão de genes de imunoglobulinas compreendendo segmentos de DNA que codificam regiões variáveis de imunoglobulinas murinas e segmentos de DNA que codificam regiões constantes de imunoglobulinas humanas. Outras formas de "anticorpos quiméricos" abrangidos pela presente invenção são aquelas nas quais a classe ou a sub-
5 classe foi modificada ou alterada daquela do anticorpo original. Estes anticorpos "quiméricos" são referidos também como "anticorpos com mudança de classe". Métodos para produção de anticorpos quiméricos envolvem técnicas convencionais de DNA recombinante e de transfecção gênica, atualmente bem conhecidas na arte. Vide, por exemplo, Morrison, S.L., *et al.*,
10 *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855 e os documentos US 5 202 238 e US 5 204 244.

O termo "anticorpo humanizado" refere-se a anticorpos nos quais a estrutura ou as "regiões determinantes de complementaridade" (C-
15 DR) foram modificadas de modo a compreenderem a CDR de uma imunoglobulina de especificidade diferente, quando comparada àquela da imunoglobulina original. Em uma concretização preferida, uma CDR murina é enxertada na região de estrutura de um anticorpo humano para preparar o "anticorpo humanizado". Vide, por exemplo, Riechmann, L., *et al.*, *Nature* 332
20 (1988) 323-327 e Neuberger, M.S., *et al.*, *Nature* 314 (1985) 268-270. CDRs especialmente preferidas correspondem àquelas que representam sequências capazes de reconhecer os antígenos notados acima para anticorpos quiméricos e bifuncionais.

O termo "anticorpo humano", como utilizado neste relatório, pretende incluir anticorpos com regiões variáveis e constantes derivadas de sequências na linhagem germinativa de imunoglobulinas humanas. Anticorpos humanos são bem conhecidos no estado da técnica (van Dijk, M.A., e van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. in Chemical Biology*. 5 (2001) 368-374). Com base
25 nessa tecnologia, é possível produzir anticorpos humanos contra uma grande variedade de alvos. Exemplos de anticorpos humanos são descritos, por exemplo, em Kellermann, S. A., *et al.*, *Curr Opin Biotechnol*. 13 (2002) 593-597.
30

O termo "anticorpo humano recombinante", como utilizado neste relatório, pretende incluir todos os anticorpos humanos preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como anticorpos isolados de uma célula hospedeira como, por exemplo, célula NS0 ou CHO, ou de um animal (por exemplo, camundongo), que é transgênico para genes de imunoglobulinas humanas, ou anticorpos expressos usando um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira. Estes anticorpos humanos recombinantes possuem regiões variáveis e constantes derivadas de sequências na linhagem germinativa de imunoglobulinas humanas em forma rearranjada. Os anticorpos humanos recombinantes de acordo com a invenção foram submetidos à hipermutação somática *in vivo*. Consequentemente, as sequências de aminoácidos das regiões VH e VL dos anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas e relacionadas com sequências na linhagem germinativa de VH e VL humanas, podem não existir naturalmente dentro do repertório na linhagem germinativa de anticorpos humanos *in vivo*.

Como utilizados neste relatório, "especificamente ligado" ou "liga-se especificamente a" referem-se a um anticorpo especificamente ligado ao antígeno CD20. De preferência, a afinidade de ligação é de valor KD igual a 10^{-8} mol/l ou mais baixo, de preferência, 10^{-9} mol/l ou mais baixo (por exemplo, 10^{-10} mol/l), mais preferivelmente com valor KD de 10^{-10} mol/l ou mais baixo (por exemplo, 10^{-12} mol/l). A afinidade de ligação é determinada com ensaio-padrão de ligação, como pela técnica de ressonância plasmônica de superfície (por exemplo, Biacore®) em células que expressam CD20.

O termo "molécula de ácido nucleico", como utilizado neste relatório, pretende incluir moléculas de DNA e moléculas de RNA. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de fita simples ou dupla, porém, é de preferência, DNA de fita dupla.

Os "domínios constantes" não estão envolvidos diretamente na ligação do anticorpo ao antígeno, porém estão envolvidos nas funções efetoras (ADCC, ligação a complemento e CDC).

A "região variável" (região variável de uma cadeia leve (VL), re-

gião variável de uma cadeia pesada (VH)), como utilizado neste relatório, indica cada par de cadeia leve e pesada envolvido diretamente na ligação do anticorpo ao antígeno. Os domínios variáveis de cadeias leves e pesadas humanas possuem a mesma estrutura geral, e cada domínio compreende
5 quatro regiões de estrutura (FR) cujas sequências são amplamente conservadas, conectadas por três "regiões hipervariáveis" (ou regiões determinantes de complementaridade, CDRs). As regiões de estrutura adotam uma conformação em folha beta, e as CDRs podem formar alças conectando a estrutura em folha beta. As CDRs em cada cadeia são mantidas em sua es-
10 trutura tridimensional pelas regiões de estrutura e formam, junto com as CDRs da outra cadeia, o sítio de ligação a antígeno. As regiões CDR3 da cadeia pesada e leve do anticorpo desempenham um papel especialmente importante na especificidade/afinidade de ligação dos anticorpos de acordo com a invenção e, por conseguinte, provêm um objeto adicional da inven-
15 ção.

Os termos "região hipervariável" ou "porção de ligação a antígeno de um anticorpo", quando utilizados neste relatório, referem-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo, responsáveis pela ligação ao antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos das "regi-
20 ões determinantes de complementaridade" ou "CDRs". Regiões de "estrutura" ou "FR" são aquelas regiões de domínio variável, diferentes dos resíduos da região hipervariável conforme definidas neste relatório. Portanto, as cadeias leves e pesadas de um anticorpo compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4 do N ao C-terminal. Especialmente, a
25 CDR3 da cadeia pesada é a região que mais contribui para a ligação ao antígeno. As regiões CDR e FR são determinadas de acordo com a definição padrão de Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edição, *Public Health Service, National Institutes of Health*, Bethesda, MD. (1991), e/ou aqueles resíduos de uma alça "hipervariável".

30 Os termos "CD20" e "antígeno CD20" são empregados alternadamente neste relatório, e incluem quaisquer variantes, isoformas e homólogos de CD20 humano de outras espécies, os quais são expressos natural-

mente por células ou são expressos em células transfectadas com o gene do CD20. A ligação de um anticorpo da invenção ao antígeno CD20 medeia a eliminação de células que expressam CD20 (por exemplo, uma célula tumoral) por inativação do CD20. A eliminação das células que expressam CD20 pode ocorrer por um ou mais dos seguintes mecanismos: morte celular/indução de apoptose, ADCC e/ou CDC.

Sinônimos de CD20, reconhecidos na técnica, incluem antígeno CD20 de linfócitos B, antígeno de superfície B1 de linfócitos B, Leu-16, Bp35, BM5 e LF5.

O termo "anticorpo anti-CD20", de acordo com a invenção, é um anticorpo que se liga especificamente ao antígeno CD20. Dependendo das propriedades de ligação e atividades biológicas de anticorpos anti-CD20 para o antígeno CD20, dois tipos de anticorpos anti-CD20 (anticorpos anti-CD20 tipo I e tipo II) podem ser distinguidos de acordo com Cragg, M.S., *et al*, *Blood* 103 (2004) 2738-2743; e Cragg, M.S., *et al*, *Blood* 101 (2003) 1045-1052, vide a Tabela 2.

Tabela 2: Propriedades de anticorpos anti-CD20 tipo I e tipo II

Anticorpos anti-CD20 tipo I	Anticorpos anti-CD20 tipo II
Epitopo de CD20 tipo I	Epitopo de CD20 tipo II
Localizam CD20 para grande quantidade lipídica	Não localizam CD20 para grande quantidade lipídica
Maior CDC (se isotipo do IgG1)	Menor CDC (se isotipo do IgG1)
Atividade de ADCC (se isotipo do IgG1)	Atividade de ADCC (se isotipo do IgG1)
Plena capacidade de ligação	Capacidade reduzida de ligação
Agregação homotípica	Agregação homotípica mais forte
Indução de apoptose mediante reticulação	Forte indução de morte celular sem reticulação

Uma propriedade essencial do anticorpo anti-CD20 tipo I e tipo II é o seu modo de ligação. Portanto, o anticorpo anti-CD20 tipo I e tipo II pode ser classificado pela razão das capacidades de ligação a CD20, em células

Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido anticorpo anti-CD20, comparado ao rituximab.

Os anticorpos anti-CD20 tipo I exibem como razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido anticorpo anti-CD20 comparado ao rituximab de 0,8 a 1,2, de preferência, de 0,9 a 1,1. Exemplos destes anticorpos anti-CD20 tipo I incluem, por exemplo, rituximab, IgG2a 1F5 (ECACC, hibridoma; Press, O.W., *et al.*, *Blood* 69/2 (1987) 584-591), IgG3 HI47 (ECACC, hibridoma), IgG1 2C6 (como descrito em WO 2005/103081), IgG1 2F2 (como descrito em WO 2004/035607 e WO 2005/103081) e IgG1 2H7 (como descrito em WO 2004/056312). De preferência, o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é um anticorpo monoclonal que se liga ao mesmo epítipo conforme o rituximab.

Os anticorpos anti-CD20 tipo II tem uma razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido anticorpo anti-CD20 comparado ao rituximab de 0,3 a 0,6, de preferência, de 0,35 a 0,55, mais preferivelmente, de 0,4 a 0,5. Exemplos destes anticorpos anti-CD20 tipo II incluem, por exemplo, tositumomab (B1 IgG2a), o anticorpo IgG1 B-Ly1 humanizado (um anticorpo IgG1 quimérico humanizado como exposto em WO 2005/044859), IgG1 11B8 (como descrito em WO 2004/035607) e IgG1 AT80. De preferência, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II é um anticorpo monoclonal que se liga ao mesmo epítipo conforme o anticorpo B-Ly1 humanizado (como exposto em WO 2005/044859).

A "razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86) de anticorpos anti-CD20 comparados a rituximab" é determinada por medição direta de imunofluorescência (a intensidade média da fluorescência (MFI) é medida), usando o referido anticorpo anti-CD20 conjugado com Cy5 e rituximab conjugado com Cy5 em FACSArray (Becton Dickinson) com células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), como descrito no Exemplo No. 2, e calculada da forma como segue:

Razão das capacidades de ligação a CD20 em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86) =

$$\frac{\text{MFI (Cy5 - anticorpo anti - CD20)}}{\text{MFI (Cy5 - rituximab)}} \times \frac{\text{razão de Cy5 marcado (Cy5 - rituximab)}}{\text{razão de Cy5 - marcado (Cy5 - anticorpo anti - CD20)}}$$

MFI é a intensidade média de fluorescência. A "razão de Cy5-marcado", como utilizada neste relatório, significa o número de moléculas de Cy5-marcadas por molécula de anticorpo.

Tipicamente, o referido anticorpo anti-CD20 tipo I tem uma razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido primeiro anticorpo anti-CD20 comparado ao rituximab de 0,8 a 1,2, de preferência, de 0,9 a 1,1.

Tipicamente, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II tem uma razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido segundo anticorpo anti-CD20 comparado ao rituximab de 0,3 a 0,6, de preferência, de 0,35 a 0,55, mais preferivelmente, de 0,4 a 0,5.

Em uma concretização preferida, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II, de preferência, um anticorpo B-Ly1 humanizado, possui citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) aumentada.

Por "anticorpo possuindo citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) aumentada", pretende-se significar um anticorpo, como esse termo é definido neste relatório, com ADCC aumentada conforme determinada por qualquer método adequado, conhecido de qualquer técnico versado na técnica. Um ensaio aceito de ADCC *in vitro* é da forma como segue:

1) o ensaio faz uso de células-alvo conhecidas por expressarem o antígeno-alvo, reconhecido pela região de ligação a antígeno do anticorpo;

2) o ensaio faz uso de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), isoladas do sangue de um doador saudável escolhido aleatoriamente, como células efetoras;

3) o ensaio é conduzido de acordo com o seguinte protocolo:

i) as PBMCs são isoladas empregando procedimentos-padrão de centrifugação por gradiente de densidade e suspensas em 5×10^6 células/ml em meio de cultura celular RPMI;

ii) as células-alvo são cultivadas por métodos-padrão de cultura

em tecidos, colhidas na fase de crescimento exponencial com variabilidade acima de 90%, lavadas em meio de cultura celular RPMI, marcadas com 100 micro-Curies of ^{125}I -, lavadas duas vezes com meio de cultura celular e res-suspendidas em meio de cultura em densidade de 1×10^6 células/ml;

5 iii) 100 microlitros da suspensão final das células-alvo acima são transferidos para cada cavidade de uma placa de microtitulação de 96 cavidades;

 iv) o anticorpo é diluído em série de 4000 ng/ml a 0,04 ng/ml em meio de cultura celular, e 50 microlitros das soluções resultantes de anticorpos são adicionados às células-alvo na microplaca de titulação de 96 cavidades, sendo testadas em três vezes várias concentrações do anticorpo, cobrindo todo o intervalo de concentração acima;

10

 v) para controles de liberação máxima (MR), 3 cavidades adicionais na placa, contendo as células-alvo marcadas, recebem 50 microlitros de uma solução aquosa a 2% (VN) de detergente não-iônico (Nonidet, Sigma, St. Louis), em vez de a solução de anticorpos (item iv acima);

15

 vi) para os controles de liberação espontânea (SR), 3 cavidades adicionais na placa, contendo as células-alvo marcadas, recebem 50 microlitros de meio de cultura celular RPMI, em vez de a solução de anticorpos (item iv acima);

20

 vii) a placa de microtitulação de 96 cavidades é, então, centrifugada, em $50 \times g$ por 1 minuto e incubada por 1 hora a 4°C ;

 viii) 50 microlitros da suspensão de PBMC (item i acima) são adicionados a cada cavidade de modo a resultar em razão de célula-efetora:célula-alvo de 25: 1, e as placas são colocadas em incubadora sob atmosfera de CO_2 a 5% a 37°C por 4 horas;

25

 ix) O sobrenadante sem células de cada cavidade é recolhido e a radioatividade experimentalmente liberada (ER) é quantificada empregando um contador gama;

 x) O percentual da lise específica é calculado para cada concentração de anticorpo, de acordo com a fórmula $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$, onde ER é a radioatividade quantificada em média (vide o item ix acima) para a-

30

quela concentração, MR é a radioatividade quantificada em média (vide o item ix acima) para os controles de MR (vide o item v acima) e SR é a radioatividade quantificada em média (vide o item ix acima) para os controles de SR (vide o item vi acima);

5 4) "ADCC aumentada" é definida como aumento no percentual máximo da lise específica, observada dentro do intervalo de concentração de anticorpo testado acima e/ou redução na concentração de anticorpo exigida para atingir a metade do percentual máxima da lise específica, observado dentro do intervalo de concentração de anticorpo testado acima. O aumento em ADCC é relativo a ADCC medida com o ensaio acima, mediada pelo mesmo anticorpo, produzido pelo mesmo tipo de células hospedeiras, usando os mesmos métodos-padrão de produção, purificação, formulação e armazenamento, os quais são conhecidos daqueles versados na técnica, porém que não foi produzida pelas células hospedeiras construídas para
10 superexpressar GnTIII.
15

 A referida "ADCC aumentada" pode ser obtida por glico-engenharia dos referidos anticorpos, significando aperfeiçoamento das referidas funções efetoras de mediação celular de anticorpos monoclonais por engenharia dos seus componentes do tipo oligossacarídeo conforme descrito em Umana, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 e no documento US 6 602 684.
20

 O termo "citotoxicidade dependente de complemento (CDC)" refere-se à lise de células-alvo de tumor humano pelo anticorpo, de acordo com a invenção, na presença de complemento. A CDC é medida, de preferência, pelo tratamento de um preparado de células que expressam CD20 com um anticorpo anti-CD20 de acordo com a invenção, na presença de complemento. A CDC é constatada se o anticorpo induzir, em concentração de 100 nM, a lise (morte celular) de 20% ou mais das células tumorais após 4 horas. O ensaio é realizado de preferência com células tumorais marcadas com ^{51}Cr ou Eu, e medição do ^{51}Cr ou Eu liberado. Os controles incluem a incubação das células tumorais-alvo com complemento, porém sem o anticorpo.
25
30

Tipicamente, anticorpos anti-CD20 tipo I e tipo II do isotipo IgG1 exibem propriedades características de CDC. Os anticorpos anti-CD20 tipo I apresentam maior CDC (se do isotipo IgG1) e os anticorpos anti-CD20 tipo II apresentam menor CDC (se do isotipo IgG1), comparados entre si. De preferência, ambos os anticorpos anti-CD20 tipo I e tipo II são anticorpos do isotipo IgG1.

O anticorpo "rituximab" é um anticorpo monoclonal quimérico murino construído geneticamente, contendo domínio constante humano gama 1, direcionado contra o antígeno CD20 humano. Este anticorpo quimérico contém domínios constantes humanos gama 1 e é identificado pelo nome "C2B8" na patente US 5 736 137 (Andersen, *et. al.*), emitida em 17 de abril de 1998 e concedida para IDEC Pharmaceuticals Corporation. Rituximab é aprovado para o tratamento de pacientes com linfoma de não-Hodgkin de células B, CD20 positivas, recidivante ou refratário de baixo grau ou folicular. Estudos do mecanismo de ação *in vitro* demonstraram que rituximab exibe citotoxicidade dependente de complemento (CDC) em humanos (Reiff, M.E., *et. al*, *Blood* 83(2) 435-445 (1994)). Adicionalmente, exibe atividade significativa em ensaios que medem citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).

O termo "anticorpo B-Ly1 humanizado" refere-se ao anticorpo B-Ly1 humanizado exposto nos documentos WO 2005/044859 e WO 2007/031875, obtido a partir do anticorpo monoclonal murino B-Ly1 anti-CD20 (região variável da cadeia pesada murina (VH): SEQ ID NO: 1; região variável da cadeia leve murina (VL): SEQ ID NO: 2- vide Poppema, S. e Visser, L., *Biotest Bulletin* 3 (1987) 131-139;) por quimerização de uma região constante humana de IgG1 e seguida por humanização (vide os documentos WO 2005/044859 e WO 2007/031875). Estes "anticorpos B-Ly1 humanizados" são descritos em detalhes nos documentos WO 2005/044859 e WO 2007/031875.

De preferência, o "anticorpo B-Ly1 humanizado" possui região variável da cadeia pesada (VH) selecionada a partir do grupo de SEQ ID No.3 a SEQ ID No.20 (B-HH2 a B-HH9 e B-HL8 a B-HL17 dos documentos

WO 2005/044859 e WO 2007/031875). Especialmente preferidas são as Seq. ID No. 3, 4, 7, 9, 11, 13 e 15 (B-HH2, BHH-3, B-HH6, B-HH8, B-HL8, B-HL11 e B-HL13 do documento WO 2005/044859). De preferência, o "anticorpo B-Ly1 humanizado" possui região variável da cadeia leve (VL) da SEQ ID No. 20 (B-KV1 do documento WO 2005/044859. Ademais, o anticorpo B-Ly1 humanizado é, de preferência, um anticorpo IgG1. De preferência, estes anticorpos B-Ly1 humanizados são resultantes de glico-engenharia (GE) na região Fc de acordo com os procedimentos descritos em WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 e WO 99/154342. Estes anticorpos B-Ly1 humanizados resultantes de glico-engenharia possuem padrão alterado de glicosilação na região Fc, de preferência, com nível menor de resíduos fucose. De preferência, pelo menos 40% ou mais (em uma concretização entre 40% e 60%, em outra concretização, pelo menos 50% e ainda em outra concretização pelo menos 70% ou mais) dos oligossacarídeos da região Fc são não-fucosilados. Ademais, os oligossacarídeos da região Fc são, de preferência, bissectados.

A invenção compreende o uso de um anticorpo anti-CD20 tipo I para a produção de um medicamento destinado ao tratamento de um câncer que expressa CD20, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é coadministrado com um anticorpo anti-CD20 tipo II.

A invenção compreende o uso de um anticorpo anti-CD20 tipo I para a produção de um medicamento destinado ao tratamento de um paciente com câncer que expressa CD20, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é coadministrado com um anticorpo anti-CD20 tipo II.

De preferência, o uso é caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é rituximab, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II é um anticorpo B-Ly1 humanizado e o referido câncer com expressão de CD20 é linfoma de não-Hodgkin (NHL) de células B.

O componente oligossacarídeo pode afetar significativamente propriedades pertinentes à eficácia de uma glicoproteína terapêutica, inclu-

indo estabilidade física, resistência a ataque por proteases, interações com o sistema imune, farmacocinética e atividade biológica específica. Estas propriedades podem depender não só da presença ou ausência, porém também das estruturas específicas dos oligossacarídeos. Algumas generalizações entre estrutura de oligossacarídeo e função de glicoproteína podem ser feitas. Por exemplo, certas estruturas de oligossacarídeo medeiam a depuração rápida da glicoproteína da circulação sanguínea através de interações com proteínas específicas de ligação a carboidratos, enquanto outras podem ser ligadas por anticorpos e desencadearem reações imunes não desejadas (Jenkins, N., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-81).

Células de mamíferos são as hospedeiras preferidas para produção de glicoproteínas terapêuticas, devido à sua capacidade em glicosilar proteínas na forma mais compatível para aplicação humana (Cumming, D.A., *et al.*, *Glycobiology* 1 (1991) 115-30; Jenkins, N., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-81). Bactérias muito raramente glicosilam proteínas, e outros tipos semelhantes de hospedeiros comuns, tais como leveduras, fungos filamentosos, células de insetos e de plantas, rendem padrões de glicosilação associados à depuração rápida da circulação sanguínea, interações imunes não desejadas e, em alguns casos específicos, atividade biológica reduzida. Entre as células de mamíferos, as células de ovário de hamster chinês (CHO) têm sido as mais comumente utilizadas durante as últimas duas décadas. Além de propiciar padrões adequados de glicosilação, estas células permitem a geração uniforme de linhagens celulares clonais geneticamente estáveis e altamente produtivas. Podem ser cultivadas até altas densidades em biorreatores simples usando meios livres de soro, e permite o desenvolvimento de bioprocessos seguros e reprodutíveis. Outras células comumente utilizadas de animais incluem células de rim de hamster recém-nascidos (BHK), células de mieloma de camundongos NSO e SP2/0. Mais recentemente, a produção a partir de animais transgênicos foi também testada. (Jenkins, N., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-81).

Todos os anticorpos contêm estruturas de carboidrato em posições conservadas nas regiões constantes da cadeia pesada, com cada iso-

tipo possuindo um arranjo distinto de estruturas de carboidratos unidos ao N, as quais afetam de modo variável a montagem, secreção ou atividade funcional proteica. (Wright, A., e Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). A estrutura do carboidrato unido ao N varia consideravelmente, dependendo do grau de processamento, e pode incluir uma estrutura com alta presença de manose (*high mannose*), multirramificada, bem como oligossacarídeos com ramificações biantenárias complexas. (Wright, A., e Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). Tipicamente, há processamento heterogêneo das estruturas centrais dos oligossacarídeos, unidos em um sítio especial de glicosilação, de modo que anticorpos monoclonais existem em múltiplas glicoformas. Da mesma forma, foi demonstrado que diferenças importantes na glicosilação de anticorpos ocorrem entre linhagens celulares, e mesmo diferenças secundárias são observadas para uma determinada linhagem celular cultivada sob condições diferentes de cultura (Lifely, M. R. *et al.*, *Glycobiology* 5(8) (1995) 813-22).

Uma maneira de obter aumentos grandes em potência, ao mesmo tempo em que se mantendo o processo de produção simples e potencialmente evitando efeitos colaterais não desejados significativos, é intensificar as funções efetoras naturais de mediação celular de anticorpos monoclonais pela engenharia do seu componente oligossacarídeo como descrito em Umana, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 e na patente US 6 602 684. Anticorpos tipo IgG1, os anticorpos mais comumente utilizados em imunoterapia contra câncer, são glicoproteínas tendo um sítio de glicosilação N-ligado conservado em Asn297 em cada domínio CH2. Os dois oligossacarídeos de ramificação biantenária complexa unidos a Asn297 são entranhados entre os domínios CH2, formando extensos contatos com a cadeia central polipeptídica, e a sua presença é essencial para o anticorpo mediar funções efetoras, tais como citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (Lifely, M. R., *et al.*, *Glycobiology* 5: 813-822 (1995); Jefferys, R., *et al.*, *Immunol. Rev.* 163: 59-76 (1998); Wright, A. and Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15: 26-32 (1997)).

Foi previamente demonstrado que a superexpressão em células

de ovário de hamster chinês (CHO) de $\beta(1,4)$ -N-acetilglicosaminil transferase I11 ("GnTII17y), uma glicosil transferase que catalisa a formação de oligossacarídeos bissectados, aumenta significativamente a atividade ADCC *in vitro* de um anticorpo monoclonal quimérico antineuroblastoma (chCE7),
5 produzido pelas células CHO engenheiradas (vide Umana, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180; e WO 99/154342, cujos conteúdos, em sua totalidade, são aqui incorporados por referência neste pedido de patente). O anticorpo chCE7 pertence a uma grande classe de anticorpos monoclonais não-conjugados com alta afinidade e especificidade a tumor, porém potência
10 baixa demais para ser clinicamente útil quando produzidos em linhagens celulares industriais padrão, desprovidas da enzima GnTIII (Umana, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180. Esse estudo foi o primeiro a demonstrar que grandes aumentos da atividade de ADCC poderiam ser obtidos pela engenharia das células produtoras de anticorpos para que expressem
15 GnTIII, o que levou também a aumento na proporção de oligossacarídeos bissectados associados à região constante (Fc), incluindo oligossacarídeos bissectados, não-fucosilados, acima dos níveis encontrados em anticorpos naturais.

O termo "expressão do antígeno CD20" pretende indicar um nível
20 vel significativo de expressão do antígeno CD20 em uma célula, de preferência, sobre a superfície celular de célula T ou B, mais preferivelmente de célula B de um tumor ou câncer, respectivamente, preferivelmente de tumor não-sólido. Pacientes com "câncer que expressam CD20" podem ser determinados por ensaios-padrão, conhecidos na técnica. Por exemplo, a expressão do antígeno CD20 é medida por detecção imuno-histoquímica (IHC),
25 FACS ou por intermédio de detecção com base em PCR do mRNA correspondente.

O termo "câncer que expressa CD20", como utilizado neste relatório, refere-se de preferência a linfomas (preferivelmente linfomas de não-
30 Hodgkin (NHL) de células B) e leucemias linfocíticas. Estes linfomas e leucemias linfocíticas incluem, por exemplo, a) linfomas foliculares, b) linfomas de pequenas células não-clivadas/ linfoma de Burkitt (incluindo linfoma de

Burkitt endêmico, linfoma de Burkitt esporádico e linfoma de não-Burkitt) c) linfoma de zona marginal (incluindo linfoma de células B de zona marginal extranodal (linfoma de tecido linfático associado à mucosa, MALT), linfoma de células B de zona marginal nodal e linfoma de zona marginal esplênica),
 5 d) linfoma de células do manto (MCL), e) linfoma de grandes células (incluindo linfoma difuso de grandes células B (DLCL), linfoma difuso de células mistas, linfoma imunoblástico, linfoma primário de células B mediastinal, linfoma angiocêntrico-linfoma pulmonar de célula B) f) leucemia de células pilosas, g) linfoma linfocítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, h) leucemia
 10 linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL)/ linfoma linfocítico de pequenas células (SLL), leucemia prolinfocítica de células B, i) neoplasias de células plasmáticas, mieloma de células plasmáticas, mieloma múltiplo, plasmacitoma e j) doença de Hodgkin.

De preferência, o câncer que expressa CD20 é linfoma de não-
 15 Hodgkin (NHL) de células B. Especialmente, o câncer que expressa CD20 é linfoma de células do manto (MCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma difuso de grandes células B (DLCL), linfoma de Burkitt, leucemia de células pilosas, linfoma folicular, mieloma múltiplo, linfoma de zona marginal, distúrbio linfoproliferativo pós-transplante
 20 (PTLD), linfoma associado ao HIV, macroglobulinemia de Waldenstrom ou linfoma primário do SNC.

O termo "método de tratamento" ou seu equivalente, quando aplicado a, por exemplo, câncer refere-se a um procedimento ou curso de
 25 ação destinado a reduzir ou eliminar o número de células cancerosas em um paciente, ou a aliviar os sintomas de câncer. "Método de tratamento" de câncer ou de outro distúrbio proliferativo não significa necessariamente que as células do câncer ou do outro distúrbio serão, de fato, eliminadas, que o número de células ou o distúrbio será, de fato, reduzido ou que os sintomas de câncer ou de outro distúrbio serão, de fato, aliviados. Frequentemente,
 30 um método de tratamento de câncer será realizado mesmo com baixa probabilidade de sucesso, porém que, em vista do histórico médico e da expectativa estimada de sobrevida de um paciente, considera-se que, não obstan-

te, induza um curso de ação benéfico em termos globais.

Os termos "coadministração" ou "coadministrado" referem-se à administração dos referidos primeiro e segundo anticorpos anti-CD20 em uma única formulação ou em duas formulações separadas. A coadministração pode ser simultânea ou sequenciada em qualquer ordem, em que, de preferência, há um período de tempo enquanto ambos (ou todos) os agentes ativos exercem simultaneamente suas atividades biológicas. Se uma única formulação for utilizada, ambos os anticorpos anti-CD20 são coadministrados simultaneamente. Se duas formulações separadas (uma para o primeiro anticorpo anti-CD20 e outra para o segundo anticorpo anti-CD20) forem utilizadas, os referidos primeiro e segundo anticorpos anti-CD20 são coadministrados simultaneamente (por exemplo, através de uma única infusão contínua ou através de duas infusões contínuas separadas ao mesmo tempo) ou em sequência. Quando ambos os anticorpos são administrados em sequência, a dose é administrada no mesmo dia em duas administrações separadas, por exemplo, duas infusões contínuas separadas em tempos diferentes, ou um dos anticorpos é administrado no dia 1 e o segundo anticorpo é coadministrado no dia 2 ao dia 7, de preferência no dia 2 ao dia 4. Portanto, o termo "em sequência" significa dentro de 7 dias após a dose do primeiro anticorpo, de preferência dentro de 4 dias após a dose do primeiro anticorpo; e o termo "simultaneamente" significa ao mesmo tempo. Os termos "coadministração", com relação às doses de manutenção dos anticorpos anti-CD20, significa que as doses de manutenção podem ser coadministradas simultaneamente, por exemplo, durante uma única infusão contínua, se o ciclo de tratamento for apropriado para ambos os anticorpos, por exemplo, a cada semana. Ou as doses de manutenção são coadministradas em sequência, quer dentro de um ou dentro de vários dias, por exemplo, a dose de manutenção de um dos anticorpos é administrada a cada semana, e a dose de manutenção do segundo anticorpo é coadministrada também a cada duas semanas. Ademais, outros ciclos de tratamento, geralmente, por exemplo, de 3 dias até várias semanas, podem ser utilizados para ambos os anticorpos.

É evidente por si só que os anticorpos são administrados ao paciente em quantidade terapeuticamente efetiva, ou seja, a quantidade do composto em questão, ou combinação, que incitará a resposta biológica ou médica de um tecido, sistema, animal ou ser humano que está sendo buscada pelo pesquisador, veterinário, médico ou outro clínico.

A quantidade coadministrada do primeiro e do segundo anticorpos anti-CD20 e o momento para a coadministração dependerão do tipo (espécie, sexo, idade, peso, etc.) e condição do paciente a ser tratado e a gravidade da doença ou condição a ser tratada. Os referidos primeiro e segundo anticorpos anti-CD20 são adequadamente coadministrados ao paciente em tratamento único ou uma série de tratamentos. Dependendo do tipo e gravidade da doença, em torno de 1 µg/kg a 50 mg/kg (por exemplo, 0,1 - 20 mg/kg) do referido primeiro ou segundo anticorpo anti-CD20 é uma dose inicial candidata para coadministração para o paciente, seja, por exemplo, por uma ou mais administrações separadas ou por infusão contínua. Em uma concretização, o tempo da infusão inicial para o referido primeiro ou o segundo anticorpo anti-CD20 pode ser mais longo do que os tempos subsequentes de infusão, por exemplo, aproximadamente 90 minutos para infusão inicial e aproximadamente 30 minutos para infusões subsequentes (se a infusão inicial for bem tolerada).

A dose preferida do referido primeiro ou do segundo anticorpo anti-CD20 variará de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg. Por conseguinte, uma ou mais doses de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 10 mg/kg ou 30 mg/kg (ou qualquer combinação destas) poderá ser administrada ao paciente. Dependendo do tipo (espécie, sexo, idade, peso, etc.) e da condição do paciente e do tipo de anticorpo anti-CD20, a dose do referido primeiro pode diferir da dose do segundo anticorpo anti-CD20. Estas doses podem ser coadministradas diariamente ou intermitentemente, por exemplo, a cada três ou seis dias ou mesmo a cada uma a três semanas. Uma dose inicial mais alta de ataque, seguida por uma ou mais doses mais baixas podem ser administradas.

Em uma concretização preferida, o medicamento é útil para pre-

venção ou redução de metástases ou ainda a disseminação neste paciente com câncer que expressa CD20. O medicamento é útil para aumentar a duração da sobrevida deste paciente, aumentar a sobrevida livre de progressão deste paciente, aumentar a duração de resposta, resultando em uma
5 melhora estatística e clinicamente significativa do paciente tratado, conforme medida pela duração da sobrevida, sobrevida livre de progressão, taxa de resposta ou duração de resposta. Em uma concretização preferida, o medicamento é útil para aumentar a taxa de resposta em um grupo de pacientes.

No contexto desta invenção, outros agentes adicionais citotóxicos, quimioterápicos ou anticâncer, ou compostos que intensificam os efeitos
10 destes agentes, podem ser utilizados no tratamento combinado de anticorpos anti-CD20 de câncer que expressa CD20. De preferência, o tratamento combinado dos anticorpos anti-CD20 é utilizado sem estes agentes adicionais citotóxicos, quimioterápicos ou anticâncer, ou compostos que intensifi-
15 cam os efeitos destes agentes.

Estes agentes incluem, por exemplo: agentes alquilantes ou agentes com ação de alquilação, como ciclosfosfamida (CTX; por exemplo, cytoxan®), clorambucila (CHL; por exemplo, leukeran®), cisplatina (CisP; por exemplo, platinol®) bussulfano (por exemplo, myleran®), melfalano,
20 carmustina (BCNU), estreptozotocina, trietilenemelamina (TEM), mitomicina C e assemelhados; antimetabólitos, como metotrexato (MTX), etoposídeo (VP16; por exemplo, vepesid®), 6-mercaptopurina (6MP), 6-tioguanina (6TG), citarabina (Ara-C), 5-fluoruracil (5-FU), capecitabina (por exemplo, Xeloda®), dacarbazina (DTIC) e similares; antibióticos, como actinomicina D,
25 doxorubicina (DXR; por exemplo, adriamycin®), daunorrubicina (daunomicina), bleomicina, mitramicina e similares; alcaloides, tais como alcaloides da vinca, como vincristina (VCR), vimblastina e similares; e outros agentes antitumorais, como paclitaxel (por exemplo, taxol®) e derivados de paclitaxel, os agentes citostáticos, glicocorticoides como dexametasona (DEX; por exemplo, decadron®) e corticosteroides como prednisona, inibidores de enzimas
30 de nucleosídeos como hidroxiureia, enzimas com ação de depleção de aminoácidos, como asparaginase, leucovorina e outros derivados do ácido fóli-

co, e igualmente diversos agentes antitumorais. Os agentes a seguir podem ser também utilizados como agentes adicionais: arnifostina (por exemplo, ethyol®), dactinomicina, mecloretamina (mostarda nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), doxorubicina lipo (por exemplo, doxil®), gencitabina (por exemplo, gemzar®), daunorrubicina lipo (por exemplo, daunoxome®), procarbazina, mitomicina, docetaxel (por exemplo, taxotere®), aldesleucina, carboplatina, oxaliplatina, cladribina, camptotecina, CPT 11 (irinotecano), 10-hidróxi 7-etil-camptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, ifosfamida, idarrubicina, mesna, interferon beta, interferon alfa, mitoxantrona, topotecano, leuprolide, megestrol, melfalano, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargase, pentostatina, pipobromano, plicamicina, tamoxifeno, teniposide, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostarda de uracila, vinorelbina, clorambucila. De preferência, o tratamento combinado dos anticorpos anti-CD20 é utilizado sem estes agentes adicionais.

15 O uso de agentes citotóxicos e anticâncer descritos acima, bem como fármaco anticâncer antiproliferativo de alvo específico, como inibidores de proteínas quinase, em regime quimioterápico está, em geral, bem caracterizado nas técnicas da terapia contra câncer, e o seu uso, neste relatório, se enquadra sob as mesmas considerações para o monitoramento da tolerância e da eficácia e para o controle de vias de administração e doses, com
20 alguns ajustes. Por exemplo, as doses reais dos agentes citotóxicos podem variar dependendo da resposta de células cultivadas do paciente, determinadas por métodos de histocultura. De modo geral, a dose será menor em comparação à quantidade utilizada na ausência de outros agentes adicionais.
25

As doses típicas de um agente citotóxico eficaz podem ser nos intervalos recomendados pelo fabricante e, quando indicado, por respostas *in vitro* ou respostas em modelos animais, podem ser reduzidas para concentração ou quantidade de até aproximadamente uma ordem de magnitude. Por conseguinte, a dose real dependerá do juízo do médico, da condição do paciente e da eficácia do método terapêutico com base na capacidade de resposta *in vitro* das células malignas primárias cultivadas ou de amostra de
30

tecido histocultivada, ou das respostas observadas nos modelos apropriados com animais.

No contexto desta invenção, a radiação ionizante em uma quantidade efetiva pode ser conduzida e/ou um produto radiofarmacêutico pode ser utilizado além do tratamento combinado dos anticorpos anti-CD20 de 5 câncer que expressa CD20. A fonte de radiação pode ser externa ou interna ao paciente a ser tratado. Quando a fonte é externa ao paciente, a terapia é conhecida como radioterapia de feixe externo (EBRT). Quando a fonte de radiação é interna ao paciente, o tratamento é denominado braquiterapia 10 (BT). Átomos radioativos para uso no contexto desta invenção podem ser selecionados a partir do grupo incluindo, entre outros, rádio, célio-137, irídio-192, amerício-241, ouro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnécio-99, iodo-123, iodo-131 e índio-111. É também possível marcar o anticorpo com estes isótopos radioativos. De preferência, o tratamento combinado dos anticorpos 15 anti-CD20 é utilizado sem esta radiação ionizante.

A radioterapia é um tratamento-padrão para o controle de tumores irressecáveis ou inoperáveis e/ou de metástases tumorais. Resultados melhores foram observados quando a radioterapia foi combinada com quimioterapia. A radioterapia tem como base o princípio de que radiação em 20 alta dose liberada a uma área intencionada resultará na morte de células reprodutivas tanto em tecido tumoral como no normal. O regime das doses de radiação é geralmente definido em termos de dose absorvida (Gy), tempo e fracionamento da radiação, e deve ser cuidadosamente definido pelo oncologista. A quantidade de radiação que um paciente recebe dependerá de 25 várias considerações, porém as duas mais importantes são a localização do tumor em relação a outras estruturas críticas ou órgãos do corpo e a extensão à qual o tumor se disseminou. Um ciclo típico de tratamento para um paciente submetido à radioterapia será um esquema de tratamento sobre um período de uma a seis semanas, com dose total entre 10 e 80 Gy, administrada ao paciente em uma única fração diária de aproximadamente 1,8 a 2,0 30 Gy, 5 dias por semana. Em uma concretização desta invenção, há sinergia quando tumores em pacientes são tratados com o tratamento combinado da

invenção e a radiação. Em outras palavras, a inibição de crescimento tumoral por meio dos agentes compreendendo a combinação da invenção é intensificada quando combinada com radiação, opcionalmente com quimioterápicos ou agentes anticâncer adicionais. Parâmetros de radioterapias adjuvantes estão contidos, por exemplo, no documento WO 99/60023.

Os anticorpos são administrados a um paciente de acordo com métodos conhecidos, por administração intravenosa como em bolo ou por infusão contínua sobre um período de tempo, por via intramuscular, intraperitoneal, intracérebro-espinhal, subcutânea, intra-articular, intrassinovial ou intratecal. A administração intravenosa ou subcutânea dos anticorpos é preferida.

A invenção compreende ainda um kit caracterizado por compreender um recipiente, uma composição dentro do recipiente compreendendo os referidos anticorpos anti-CD20 tipo I e tipo II, quer na forma de uma única formulação ou em duas formulações separadas, e uma bula do medicamento com instruções para o usuário da composição sobre a administração dos referidos anticorpos anti-CD tipo I e tipo II para um paciente com câncer que expressa CD20.

De preferência, o kit é caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é rituximab, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II é um anticorpo B-Ly1 humanizado e o referido câncer que expressa CD20 é linfoma de não-Hodgkin (NHL) de células B.

O termo "bula do medicamento" refere-se a instruções habitualmente inseridas em embalagens comerciais de produtos terapêuticos, a qual pode incluir informação sobre as indicações, uso, posologia, administração, contraindicações e/ou advertências referentes ao uso destes produtos terapêuticos.

Em uma concretização preferida, o item de recipientes fabricados pode incluir um veículo farmacêuticamente aceitável. O item de fabricação pode incluir um diluente estéril, o qual está preferivelmente acondicionado em recipiente adicional separado.

Como utilizado neste relatório, "veículo farmacêuticamente acei-

tável" pretende incluir todos e quaisquer materiais compatíveis com a administração farmacêutica, incluindo solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardo de absorção e outros materiais e compostos compatíveis com a administração farmacêutica. Exceto na medida em que quaisquer meios ou agentes convencionais sejam incompatíveis com o composto ativo, o uso destes nas composições da invenção é contemplado. Compostos ativos suplementares podem ser também incorporados nas composições.

Formulações farmacêuticas

Formulações terapêuticas dos anticorpos, utilizados em conformidade com a presente invenção, são preparadas para armazenamento pela mistura de um anticorpo com o grau desejado de pureza com veículos opcionais farmacêuticamente aceitáveis, excipientes ou estabilizantes (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou de soluções aquosas. Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não-tóxicos para receptores nas doses e concentrações empregadas, e incluem tampões como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquil parabenos, como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de aproximadamente 10 resíduos); proteínas como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextrina; agentes de quelação, como EDTA; açúcares como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contraíons formadores de sal, como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos de proteína Zn); e/ou tensoativos não-iônicos, como TWEEN®, PLUONICS® ou polietilenoglicol (PEG).

As formulações de acordo com a invenção podem ser duas for-

mulações separadas para cada anticorpo anti-CD20. Alternativamente, a presente formulação pode conter ambos os anticorpos em uma única formulação.

5 Adicionalmente, a composição pode compreender ainda um agente quimioterápico, agente citotóxico, citocina, agente inibidor de crescimento ou agente antiangiogênico. Essas moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades eficazes para a finalidade pretendida.

10 Os princípios ativos podem estar inseridos em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização inter-racial, por exemplo, microcápsulas de hidrometilcelulose ou de gelatina, microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, em sistemas coloidais de liberação de fármacos (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Estas técnicas são expostas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980).

20 Preparações de liberação sustentada podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros sólidos hidrofóbicos contendo o anticorpo, cujas matrizes estão na forma de itens moldados, por exemplo, em filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) ou álcool poli(vinílico)), polilactídeos (US 3 773 919), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama-etil-L-glutamato, acetato de etilenovinila não-degradável, 25 copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico, como o LUPRON DEPOT® (microesferas injetáveis compostas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

30 As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. A esterilização é rapidamente realizada por filtração através de membranas estéreis de filtração.

 A invenção compreende ainda um anticorpo anti-CD20 tipo I para o tratamento de câncer que expressa CD20, caracterizado pelo fato de

que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é coadministrado com um anticorpo anti-CD20 tipo II.

5 A invenção compreende ainda um anticorpo anti-CD20 tipo I para o tratamento de um paciente com câncer que expressa CD20, caracterizado pelo fato que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é coadministrado com um anticorpo anti-CD20 tipo II.

10 Em uma concretização preferida da invenção, o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é rituximab, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II é um anticorpo B-Ly1 humanizado e o referido câncer que expressa CD20 é linfoma de não-Hodgkin (NHL) de células B.

A invenção compreende ainda um anticorpo anti-CD20 tipo I para o tratamento de câncer que expressa CD20 ou de um paciente com câncer que expressa CD20, caracterizado pelo fato de que

15 a) o referido anticorpo anti-CD20 tipo I tem uma razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido anticorpo anti-CD20 tipo I comparado a rituximab de 0,8 a 1,2,

b) o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é coadministrado com um anticorpo anti-CD20 tipo II, e

20 c) o referido anticorpo anti-CD20 tipo II tem uma razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido anticorpo anti-CD20 tipo II comparado a rituximab de 0,3 a 0,6.

De preferência, o câncer que expressa CD20 é linfoma de não-Hodgkin (NHL) de células B.

De preferência, o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é rituximab.

25 De preferência, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II é um anticorpo B-Ly1 humanizado.

De preferência, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II possui citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) aumentada.

30 Os exemplos e as figuras a seguir são fornecidos para ajudar o entendimento da presente invenção, cujo verdadeiro escopo é apresentado nas reivindicações anexadas. É entendido que modificações podem ser feitas nos procedimentos apresentados sem se afastar do espírito da invenção.

Listagem de sequências

- SEQ ID NO: 1 sequência de aminoácidos de região variável da cadeia pesada (VH) de anticorpo monoclonal B-Ly1 murino anti-CD20.
- 5 SEQ ID NO: 2 sequência de aminoácidos de região variável da cadeia leve (VL) de anticorpo monoclonal B-Ly1 murino anti-CD20.
- 10 SEQ ID NO: 3 - 19 sequência de aminoácidos de região variável da cadeia pesada (VH) de anticorpos B-Ly1 humanizados (B-HH2 a B-HH9, B-HL8 e B-HL10 a B-HL17)
- SEQ ID NO: 20 sequência de aminoácidos de região variável da cadeia leve (VL) do anticorpo B-Ly1 B-KV1 humanizado

Descrição das figuras

- Figura 1 - Atividade antitumoral do tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 tipo I (rituximab) com razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido anticorpo anti-CD20 tipo I comparado a rituximab de 1,0, com um anticorpo anti-CD20 tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) com razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido anticorpo anti-CD20 tipo II comparado a rituximab de 0,44, em células OCI-Ly18 de linfoma de não-Hodgkin (NHL) humano. Valores médios de volume de tumor [mm³] inseridos no eixo y; número de dias após injeção de células tumorais, inserido no eixo x. Legenda: A) Veículo (**círculos**), B) rituximab 30 mg/kg, por via i.v., uma vez por semana (**triângulos**). C) B-ly1 humanizado (B-HH6-B-KV1 GE) 30 mg/kg, uma vez por semana (**quadrados**) e D) rituximab coadministrado com B-HH6-B-KV1 GE (cada um, 30 mg/kg uma vez por semana) (**cruzes**)

- Figura 2 - Intensidade Média de Fluorescência (MFI, eixo y à esquerda) do anticorpo anti-CD20 tipo I (Cy5-rituximab = barra branca) e do anticorpo anti-CD20 tipo II (Cy5- B-Ly1 B-HH6-B-KV1 GE humanizado = barra preta) em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86); Razão das capacidades de ligação a CD20 do anticorpo anti-CD20 tipo I (rituximab) e do anticorpo anti-CD20 tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) comparados a rituximab (em escala sobre o

eixo y)

Figura 3 - Atividade antitumoral do tratamento com dois anticorpos anti-CD20 sobre células Z138 de linfoma de não-Hodgkin (NHL) humano. Ambos os anticorpos são anticorpos B-Ly1 humanizados anti-CD20; 1) B-HH6-B-KV1 glico-engenheirado (GE) e 2) B-HH6-B-KV1 do tipo selvagem (wt, não glico-engenheirado). Valores médios de volume de tumor [mm³] inseridos no eixo y; número de dias após injeção de células tumorais, inserido no eixo x. Legenda: A) Veículo (**círculos**), B) B-ly1 GE humanizado (B-HH6-B-KV1 GE) 30 mg/kg, uma vez por semana (**triângulos**) e C) B-ly1 wt humanizado (B-HH6-B-KV1 wt), 30 mg/kg, uma vez por semana (**cruzes**).

Procedimentos experimentais

Exemplo 1

Atividade antitumoral do tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 tipo I (rituximab) com um anticorpo anti-CD20 tipo II (B-HH6-B-KV1 GE)

Agentes de teste

Anticorpo anti-CD20 tipo I, rituximab, foi provido em forma de solução de estoque (c = 10 mg/ml) pela Hoffmann La Roche, Basileia, Suíça. O tampão contém polissorbato 80, cloreto de sódio e citrato de sódio.

Anticorpo anti-CD20 tipo II, B-HH6-B-KV1 GE (=B-Ly1 humanizado, B-HH6-B-KV1 glico-engenheirado, vide os documentos WO 2005/044859 e WO 2007/031875)) foi provido em forma de solução-estoque (c = 9,4 mg/kg) pela GlycArt, Schlieren, Suíça. O tampão do anticorpo contém histidina, trealose e polissorbato 20.

Ambas as soluções são diluídas apropriadamente em PBS de estoque antes das injeções.

Linhagens celulares e condições da cultura

Células OCI-Ly18 de linfoma de não-Hodgkin (NHL) humano (Chang, H., *et al*, *Leuk Lymphoma*. 1992 Sep;8(1-2):129-36) (linfoma difuso de grandes células - LDGC) foram utilizadas. A linhagem celular tumoral foi cultivada de modo de rotina em meio INDM (PAA, Laboratories, Áustria), suplementado com soro bovino fetal a 20% (PAA Laboratories, Áustria) e L-glutamina a 2 mM, HEPES a 25 nM e mercaptoetanol a 0,05 mM a 37 °C em

atmosfera saturada com água em CO₂ a 5%. Duas passagens foram utilizadas para o transplante.

Animais

Camundongos fêmeas SCID bege, idade de 4-5 semanas ao chegarem (adquiridos da Bomholtgard, Ry, Dinamarca), foram mantidos sob condições livres de agentes patogênicos com ciclos diários de 12 h de luz/ 12 h no escuro de acordo com diretrizes comprometidas (GV-Solas; Felasa; TierschG). O protocolo do estudo experimental foi revisado e aprovado pelo governo local. Após a chegada, os animais foram mantidos na parte de quarentena das instalações reservada para animais, por uma semana até que se acostumassem ao novo ambiente e para observação. O monitoramento da saúde contínuo foi conduzido regularmente. Ração de dieta (Provimi Kli-ba 3337) e água (acidificada, pH 2,5 - 3) foram fornecidas *ad libitum*.

Monitoramento

Os animais foram controlados diariamente quanto a sintomas clínicos e detecção de efeitos adversos. Para monitoramento por todo o experimento, o peso corporal foi documentado duas vezes semanalmente, e o volume tumoral foi medido com calibrador após estadiamento.

Tratamento de animais

O tratamento dos animais iniciou no dia da randomização, 24 dias após o transplante celular. Os grupos que receberam o anticorpo anti-CD20 tipo II, B-HH6-B-KV1 GE, e o grupo do veículo correspondente, foram tratados por via i.v., uma vez a cada dia, nos dias 24, 31, 38, 45 e 52 do estudo, na dose indicada de 30 mg/kg. O tratamento com o anticorpo anti-CD20 tipo I, rituximab, como agente único e combinado ao anticorpo anti-CD20 tipo II, B-HH6-B-KV1 GE, foi realizado nos dias 26, 33, 40, 47 e 54

Estudo de inibição de crescimento tumoral *in vivo*

Animais com tumor recebendo controle de veículo tiveram que ser excluídos 10 dias após a introdução do tratamento devido à carga tumoral. O tratamento de animais com Rituximab semanalmente, em dose de 30 mg/kg, como agente único inibiu o crescimento do xenoenxerto por 10 dias (TGI: 68%). Posteriormente, os xenoenxertos tumorais progrediram continu-

amente, apesar de injeções semanais de Rituximab como agente único. Por outro lado, a monoterapia com B-HH6-B-KV1 GE (30 mg/kg), uma vez por semana, controlou o crescimento do tumor de células OCI-Ly18 (TGI: 100%). Não obstante, finalmente, os xenoenxertos tumorais começaram a progredir sob administração do agente isolado B-HH6-B-KV1 GE. No entanto, a combinação de Rituximab e B-HH6-B-KV1 GE, ambos em dose de 30 mg/kg, foi obviamente de eficácia superior. Os tumores xenoenxertados foram controlados e ao contrário do tumor de cada braço do anticorpo como agente isolado, a estase manteve-se ao longo do tempo.

10 Exemplo 2

Determinação da razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do anticorpo anti-CD20 tipo II comparado a rituximab

Células Raji (Nº de ATCC: CCL-86) foram mantidas em cultura em meio RPMI-1640 (PanBiotech GmbH, Nº de cat.: PO4-18500), contendo 10% de FCS (Gibco, Nº de cat.: 10500-064). O anticorpo anti-CD20 tipo II, B-HH6-B-KV1 (anticorpo B-Ly1 humanizado), e rituximab foram marcados com Cy5 monoéster de NHS (Amersham GE Healthcare, Nº de catálogo: PA15101) de acordo com as instruções do fabricante. A marcação de Rituximab conjugado a Cy5 teve como razão 2,0 moléculas de Cy-5 por anticorpo. A marcação de B-HH6-B-KV1 conjugado a Cy5 teve como razão 2,2 moléculas de Cy5 por anticorpo. A fim de determinar e comparar as capacidades e modo de ligação de ambos os anticorpos, foram geradas curvas de ligação (por titulação de Rituximab conjugado a Cy5 e B-HH6-B-KV1 conjugado a Cy5) por imunofluorescência, usando uma linhagem de células Raji de linfoma de Burkitt (Nº de ATCC: CCL-86). Intensidades médias de fluorescência (MFI) foram analisadas em função de EC50 (50% da intensidade máxima) para o Rituximab conjugado a Cy5 e B-HH6-B-KV1 conjugado a Cy5, respectivamente. 5×10^5 células por amostra foram coradas por 30 min. a 4 °C. Posteriormente, as células foram lavadas em meio de cultura. A coloração com iodeto de propídio (PI) foi utilizada para excluir células mortas. As medições foram realizadas utilizando o FACSArray (Becton Dickinson), Iodeto de propídio (PI) foi medido em Vermelho Distante A e Cy5, em Vermelho-

A. A figura 2 exibe a Intensidade Média de Fluorescência (MFI) para ligação em EC50 (50% da intensidade máxima) de B-HH6-B-KV1 marcado com Cy5 (barra preta) e de rituximab marcado com Cy5 (barra branca).

Em seguida, a razão das capacidades de ligação a CD20 em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86) é calculada de acordo com a seguinte fórmula:

Razão das capacidades de ligação a CD20 em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86) =

$$\frac{\text{MFI (anticorpo anti - CD20 - Cy5)}}{\text{MFI (Cy5 - rituximab)}} \times \frac{\text{razão de Cy5 - marcado (Cy5 - rituximab)}}{\text{razão de Cy5 - marcado (anticorpo anti - CD20 - Cy5)}}$$

$$\frac{\text{MFI (B - HH6 - B - KV1)}}{\text{MFI (Cy5 - rituximab)}} \times \frac{\text{razão de Cy5 - marcado (Cy5 - rituximab)}}{\text{razão de Cy5 - marcado (B - HH6 - B - KV1)}}$$

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

Portanto, B-HH6-B-KV1, como um típico anticorpo anti-CD20 tipo II, exibe menor capacidade de ligação, comparado a rituximab.

Exemplo 3

Atividades antitumorais semelhantes do anticorpo anti-CD20 glico-engenheirado (GE) e não glico-engenheirado (tipo de selvagem, wt) (B-HH6-B-KV1 GE e wt) contra xenoinxertos de MCL Z138 em camundongos beges

SCID

Agentes de teste

Anticorpo anti-CD20 tipo II, B-HH6-B-KV1 (glico-engenheirado (GE) e do tipo selvagem (wt)) foi fornecido em forma de solução de estoque (c = 9,4 mg/ml e 12,5 mg/ml) pela GlycArt, Schlieren, Suíça. O tampão do anticorpo incluiu histidina, trealose e polissorbato 20.

Ambas as soluções foram diluídas apropriadamente em PBS de estoque antes das injeções.

Linhagens celulares e condições da cultura

Células Z138 de linfoma de não-Hodgkin (NHL) de células B foram originalmente obtidas da Glycart (Linfoma de células do manto - LCM). A linhagem

de células tumorais foi cultivada de modo de rotina em meio DMEM (PAA, Laboratories, Áustria), suplementado com 10% de soro bovino fetal (PAA Laboratories, Áustria) e L-glutamina a 2 mM a 37 °C em atmosfera saturada com água em 5% de CO₂. Foram utilizadas 2 passagens para o transplante.

5 Animais

Camundongos fêmeas bege SCID, com idade de 4-5 semanas ao chegarem (adquiridos da Bomholtgard, Ry, Dinamarca) foram mantidos sob condições livres de agentes patogênicos com ciclos diários de 12 h de luz/ 12 h no escuro de acordo com diretrizes comprometidas (GV-Solas; Felasa; TierschG). O protocolo do estudo experimental foi revisado e aprovado pelo governo local. Após a chegada, os animais foram mantidos na parte de quarentena das instalações reservadas para animais, por uma semana até que se acostumassem ao novo ambiente e para observação. O monitoramento da saúde contínuo foi conduzido regularmente. Ração de dieta (Provimi Kliba 3337) e água (acidificada, pH 2,5 - 3) foram fornecidas *ad libitum*.

Monitoramento

Os animais foram controlados diariamente quanto a sintomas clínicos e detecção de efeitos adversos. Para monitoramento por todo o experimento, o peso corporal foi documentado duas vezes semanalmente, e o volume tumoral foi medido com calibrador após estadiamento.

Tratamento de animais

O tratamento dos animais iniciou no dia da randomização, 14 dias após o transporte s.c. das células. Grupos recebendo o anticorpo humanizado anti-CD20 (B-HH6-B-KV1 GE e wt) e o grupo correspondente do veículo foram tratados por via i.v. a cada 7 dias, nos dias 14, 20, 27 e 34 do estudo na dose indicada de 10 mg/kg.

Estudo de inibição de crescimento tumoral *in vivo*

Animais com tumor recebendo controle de veículo tiveram que ser excluídos 19 dias após a introdução do tratamento devido à carga tumoral. O tratamento semanal com B-HH6-B-KV1, em forma de wt ou glicoengeheirada (B-HH6-B-KV1 GE e wt), na dose de 10 mg/kg, inibiu o crescimento do xenoenxerto pouco após o início do tratamento. Ao término do

controle de todos os anticorpos, os tumores regrediram e, mais tarde, a maioria dos xenoenxertos tumorais de células Z138 exibiu remissão completa. Não foram observadas diferenças significativas entre as versões wt e glicoengeirada do anticorpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 neste modelo de xenoenxertos. O achado não foi improvável uma vez que camundongos não expressam o receptor correto de Fc em suas células NK e, além disso, camundongos beges SCID são supostamente incompetentes para ADCC mediada por NK devido à imunodeficiência tripla grave. Por conseguinte, modelos de xenoenxertos s.c. em camundongos beges SCID não são apropriados para mimetizar o efeito humano de ADCC mediado com anticorpos glicoengeirados modificados.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um anticorpo anti-CD20 tipo I para a produção de um medicamento destinado ao tratamento de câncer que expressa CD20, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é coadministrado com um anticorpo anti-CD20 tipo II.

2. Uso de um anticorpo anti-CD20 tipo I para a produção de um medicamento destinado ao tratamento de um paciente que sofre de câncer que expressa CD20, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é coadministrado com um anticorpo anti-CD20 tipo II.

3. Anticorpo anti-CD20 tipo I para o tratamento de câncer que expressa CD20, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é coadministrado com um anticorpo anti-CD20 tipo II.

4. Anticorpo anti-CD20 tipo I para o tratamento de um paciente que sofre de câncer que expressa CD20, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é coadministrado com um anticorpo anti-CD20 tipo II.

5. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a) o referido anticorpo anti-CD20 tipo I exibe como razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido anticorpo anti-CD20 tipo I comparado a rituximab de 0,8 a 1,2, e

b) o referido anticorpo anti-CD20 tipo II tem uma razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido anticorpo anti-CD20 tipo II comparado a rituximab de 0,3 a 0,6.

6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o câncer que expressa CD20 é linfoma de não-Hodgkin (NHL) de células B.

7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que os referidos anticorpos anti-CD20 tipo I e tipo II são anticorpos monoclonais.

8. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é rituximab.

9. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo II é um anticorpo B-Ly1 humanizado.

5 10. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é rituximab, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II é um anticorpo B-Ly1 humanizado e o referido câncer que expressa CD20 é linfoma de não-Hodgkin (NHL) de células B.

10 11. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de o referido anticorpo anti-CD20 tipo II tem citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) aumentada.

15 12. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que, pelo menos 40% ou mais dos oligossacarídeos da região Fc do referido anticorpo anti-CD20 tipo II são não-fucosilados.

20 13. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I tem uma razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido anticorpo anti-CD20 tipo I comparado a rituximab de 0,9 a 1,1.

20 14. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo II tem uma razão das capacidades de ligação a CD20, em células Raji (Nº de ATCC: CCL-86), do referido anticorpo anti-CD20 tipo II comparado a rituximab de 0,35 a 0,55, de preferência, de 0,4 a 0,5.

25 15. Kit compreendendo um anticorpo anti-CD20 tipo II e um anticorpo anti-CD20 tipo I para o tratamento combinado de um paciente que sofre de câncer que expressa CD20.

30 16. Kit de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 tipo I é rituximab, o referido anticorpo anti-CD20 tipo II é um anticorpo B-Ly1 humanizado e o referido câncer que expressa CD20 é linfoma de não-Hodgkin (NHL) de células B.

Fig .1

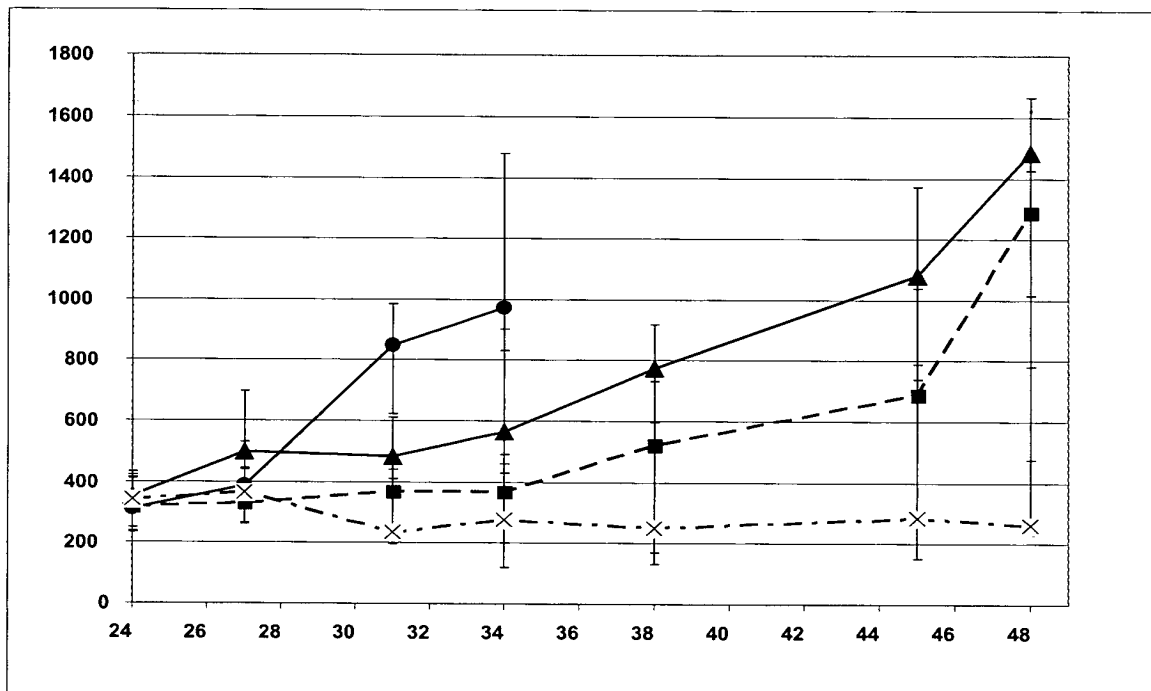


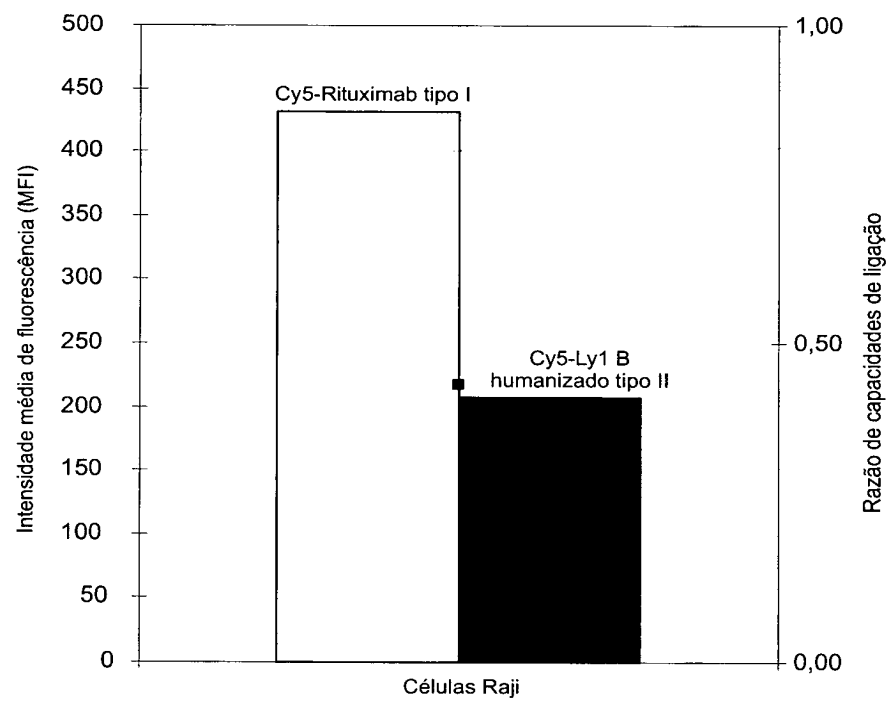
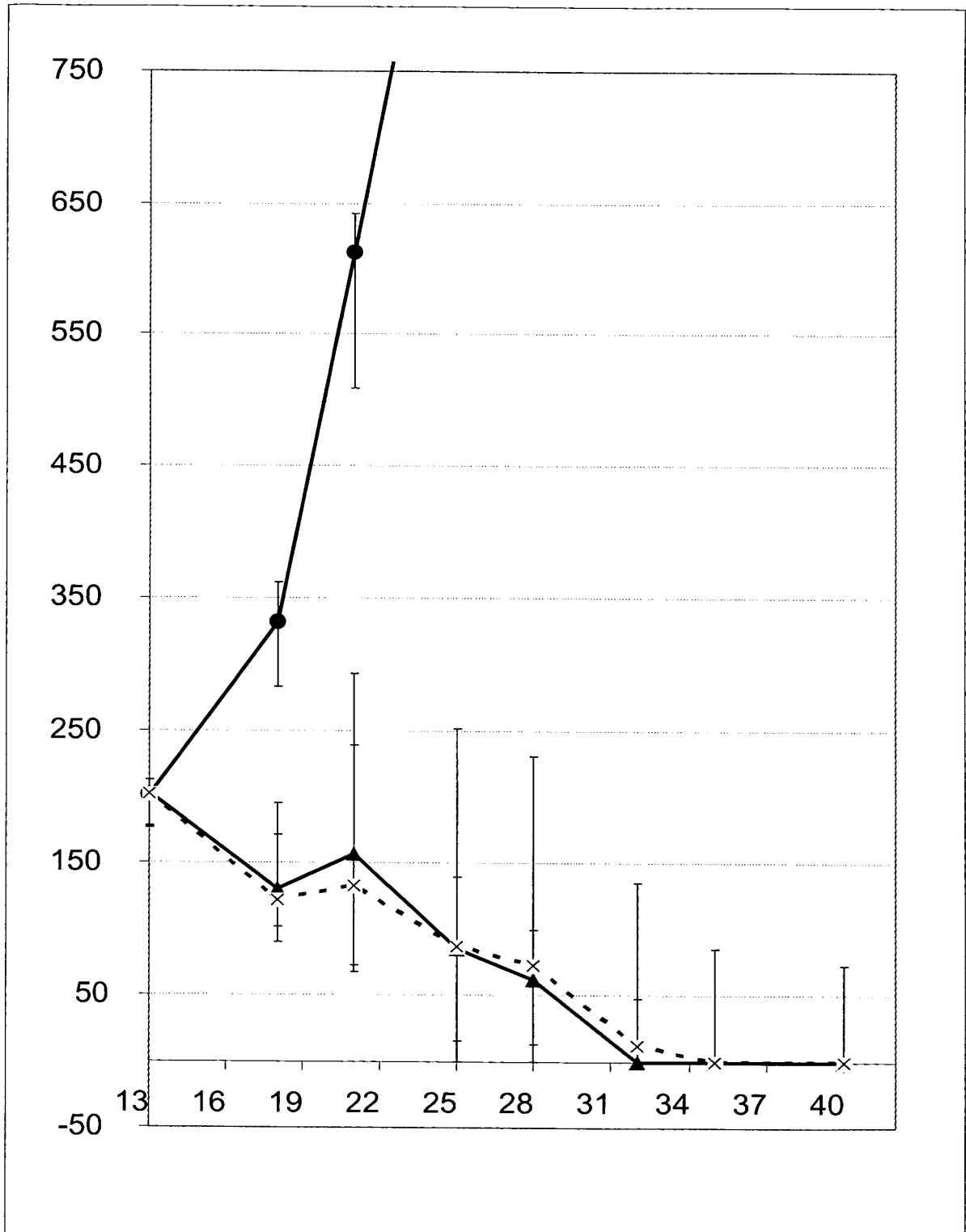
Fig. 2

Fig. 3

RESUMO

Patente de Invenção: **"TERAPIA COMBINADA COM ANTICORPOS ANTI-CD20 TIPO I E TIPO II"**.

5 A presente invenção refere-se à terapia combinada de um anti-corpo anti-CD20 tipo I e tipo II para o tratamento de câncer, especialmente de câncer que expressa CD20.