

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2009.03.23	(73) Titular(es): ROCHE GLYCART AG WAGISTRASSE 18 8952 SCHLIEREN-ZUERICH CH
(30) Prioridade(s): 2008.03.25 EP 08005554 2008.04.11 EP 08007172	
(43) Data de publicação do pedido: 2011.01.05	(72) Inventor(es): PABLO UMANA CH THOMAS FRIESS DE CHARLES DUMONTET FR FRANK HERTING DE CHRISTIAN KLEIN CH
(45) Data e BPI da concessão: 2016.07.20 162/2016	(74) Mandatário:

(54) Epígrafe: **USO DE UM ANTICORPO ANTI-CD20 DO TIPO II COM CITOTOXICIDADE CELULAR ACRESCIDA DEPENDENTE DE ANTICORPO (ADCC) EM COMBINAÇÃO COM CICLOFOSFAMIDA, VINCRISTINA E DOXORUBICINA PARA TRATAR LINFOMAS NÃO-HODGKIN**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO DIZ RESPEITO AO USO DE UM ANTICORPO ANTI-CD20 DO TIPO II COM CITOTOXICIDADE CELULAR ACRESCIDA DEPENDENTE DE ANTICORPO (ADCC) PARA O FABRICO DE UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO DO CANCRO, ESPECIALMENTE DE CANCROS QUE EXPRESSAM CD20 EM COMBINAÇÃO COM UM OU VÁRIOS AGENTES TERAPÊUTICOS SELECIONADOS NO GRUPO CONSTITUÍDO POR CICLOFOSFAMIDA, VINCRISTINA E DOXORUBICINA.

Resumo

"Uso de um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) em combinação com ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina para tratar linfomas não-Hodgkin"

A presente invenção diz respeito ao uso de um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) para o fabrico de um medicamento para o tratamento do cancro, especialmente de cancros que expressam CD20 em combinação com um ou vários agentes terapêuticos seleccionados no grupo constituído por ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

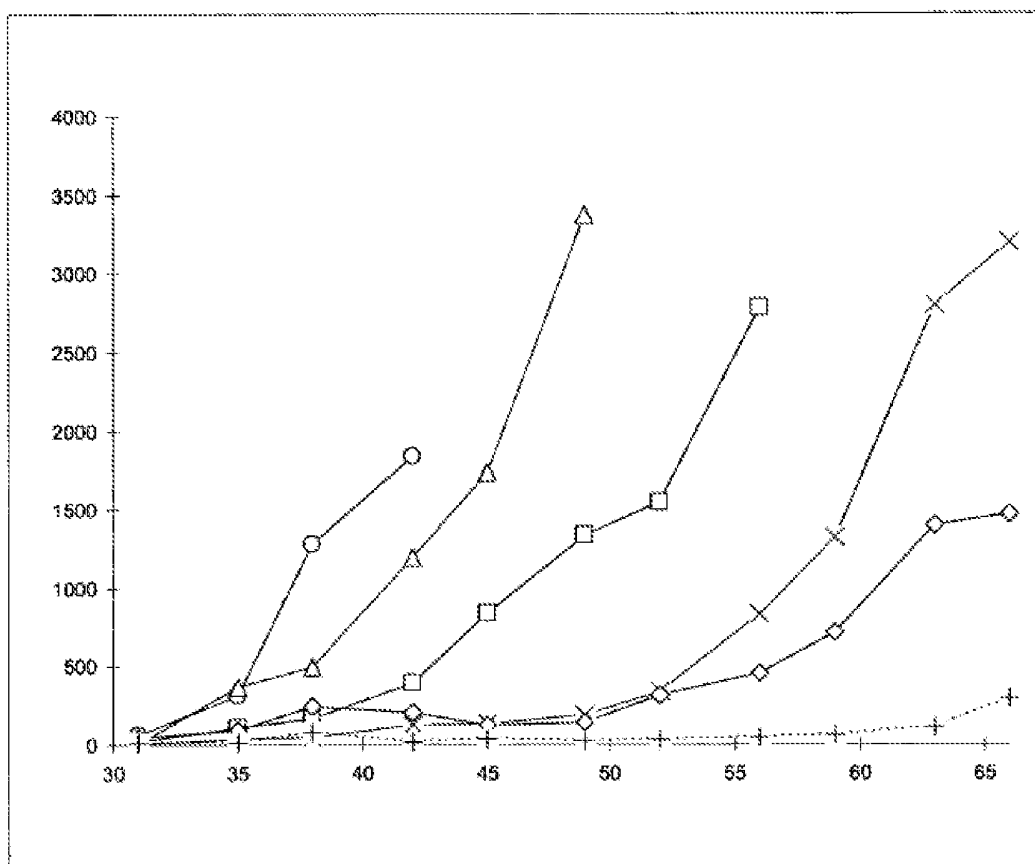


FIG. 4

Descrição

"Uso de um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) em combinação com ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina para tratar linfomas não-Hodgkin"

A presente invenção diz respeito ao uso de um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) para o fabrico de um medicamento para o tratamento do cancro, especialmente dos cancros que expressam CD20 em combinação com um agente quimioterapêutico seleccionado a partir do grupo que consiste em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

Antecedentes da Invenção

A molécula de CD20 (designada também como linfócito-B humano-antigénio de diferenciação restrita ou Bp35) é uma proteína transmembranar hidrofóbica com um peso molecular de aproximadamente 35kD localizada em linfócitos pré-B e linfócitos maduros B (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). CD20 é encontrado à superfície de mais do que 90% de células B de sangue periférico ou órgãos linfoides e é expressa durante o desenvolvimento inicial de pré-células B e permanece até à diferenciação de células do plasma. CD20 encontra-se presente tanto em células B normais, como em células B malignas. Em particular CD20 é expresso em mais do que 90% das células B de linfomas não-Hodgkin (NHL), (Anderson, K.C., et al., Blood 63(6) (1984) 1424-1433)), mas não é

encontrada em células hematopoiéticas estaminais, células pro-B, células de plasma normais, ou outros tecidos normais (Tedder, T.F., et al., *J. Immunol.* 135(2) (1985) 973-979).

A região carboxilo terminal de 85 aminoácidos da proteína CD20 encontra-se localizada no citoplasma. O comprimento desta região contrasta com as estruturas de superfície específicas de outras células B, tais como as cadeias pesadas de IgM, IgD, e IgG ou antigénios de histocompatibilidade da classe IIa ou cadeias β , que possuem regiões intracitoplasmáticas de 3, 3, 28, 15, e 16 aminoácidos, respectivamente (Komaromy, M., et al., *NAR* 11 (1983) 6775-6785). Dos últimos 61 aminoácidos de terminal carboxilo, 21 são resíduos acídicos, enquanto apenas 2 são básicos, indicando que esta região possui uma carga resultante fortemente negativa. O N^o de acesso do GenBank é NP-690605. Pensa-se que o CD20 possa estar envolvido na regulação dos passo(s) inicial(is) do processo de activação e diferenciação de células B (Tedder, T.F., et al., *Eur. J. Immunol.* 16 (1986) 881-887) e possa funcionar como um canal de ião cálcio (Tedder, T.F., et al., *J. Cell. Biochem.* 14D (1990) 195).

Existem dois tipos diferentes de anticorpos anti-CD20 que diferem significativamente no seu modo de ligação a CD20 e nas suas actividades biológicas (Cragg, M.S., et al., *Blood* 103 (2004) 2738-2743; e Cragg, M.S., et al., *Blood*, 101 (2003) 1045-1052). Os anticorpos do tipo I, como por ex. rituximab, são potentes em complementar a citotoxicidade mediada, enquanto anticorpos do tipo II, como por ex. Tositumomab (B1), 11B8, AT80 ou anticorpos humanizados B-Ly1, iniciam de forma eficaz a morte celular dirigida, através de apoptose independente da caspase com exposição concomitante a fosfatidilserina.

As características comuns partilhadas pelos anticorpos anti-CD20 do tipo I e do tipo II encontram-se sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1:

Propriedades dos anticorpos anti-CD20 do tipo I e do tipo II	
Anticorpos anti-CD20 do tipo I	Anticorpos anti-CD20 do tipo II
Epitopo de CD20 do tipo I	Epitopo de CD20 do tipo II
Localizam CD20 a jangadas lipídicas	Não localizam CD20 a jangadas lipídicas
CDC acrescida (se do isotipo IgG1)	CDC diminuída (se do isotipo IgG1)
Actividade ADCC (se do isotipo IgG1)	Actividade ADCC (se do isotipo IgG1)
Capacidade de ligação completa	Capacidade de ligação reduzida
Agregação homotípica	Agregação homotípica mais forte
Indução de apoptose por reticulação	Indução de forte morte celular sem reticulação

Sumário da Invenção

A invenção compreende o uso do anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular dependente de anticorpo acrescida (ADCC) para o fabrico de um medicamento para o tratamento do cancro que expressa CD20 em combinação com um ou vários agentes quimioterapêuticos seleccionados a partir do grupo constituído por ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina, caracterizado por o dito anticorpo anti-CD20 do tipo II ser um anticorpo B-Ly1 humanizado modificado por glicosilação, em que o anticorpo humanizado B-Ly1 possui uma região variável da cadeia pesada (VH) da SEQ ID No.7 e uma região variável da cadeia leve (VL) da SEQ ID No.20, e o tratamento com o anticorpo anti-CD20 do tipo II estar combinado com:

a) ciclofosfamida e vincristina, ou

b) ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

A invenção compreende ainda um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular dependente de anticorpo acrescida (ADCC) para o fabrico de um medicamento para o tratamento do cancro que expressa CD20 em combinação com um ou vários agentes quimioterapêuticos seleccionados a partir do grupo constituído por ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina, caracterizado por o dito anticorpo anti-CD20 do tipo II ser um anticorpo B-Ly1 humanizado modificado por glicosilação, em que o anticorpo humanizado B-Ly1 possui uma região variável da cadeia pesada (VH) da SEQ ID No.7 e uma região variável da cadeia leve (VL) da SEQ ID No.20, e o tratamento com o anticorpo anti-CD20 do tipo II estar combinado com:

a) ciclofosfamida e vincristina, ou

b) ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

Descrição Detalhada da Invenção

O termo "anticorpo" abrange as várias formas de anticorpos incluindo, mas não se encontrando limitado a anticorpos completos, anticorpos humanos, anticorpos humanizados e anticorpos modificados por glicosilação, tais como anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos, ou anticorpos recombinantes, assim como a fragmentos de tais anticorpos desde que sejam retidas as propriedades características de acordo com a invenção. Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal", quando aqui utilizado diz respeito a uma preparação de moléculas de anticorpo de uma única composição de aminoácidos. Neste contexto, o termo "anticorpo monoclonal humano" diz respeito a anticorpos que

exibem uma especificidade de ligação única que possuem regiões variáveis e constantes derivadas das sequências da imunoglobulina da linha germinativa humana. Numa concretização, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida a partir de um animal não humano transgênico, por ex. um ratinho transgênico, que possui um genoma que compreende uma cadeia pesada humana transgênica e uma cadeia leve humana transgênica fundida com uma célula imortalizada.

Preferencialmente o dito anticorpo anti-CD20 do tipo II é um anticorpo monoclonal.

O termo "anticorpo quimérico" diz respeito a um anticorpo monoclonal que compreende uma região variável, i.e., uma região de ligação, a partir de uma fonte ou espécies e pelo menos uma porção de uma região constante derivada de uma fonte diferente ou espécies, geralmente preparadas por técnicas de ADN recombinantes. Anticorpos quiméricos que compreendem uma região de murino variável e uma região constante humana são especialmente preferidas. Tais anticorpos quiméricos de murino/humanos são o produto de genes de imunoglobulina expressos compreendendo segmentos de ADN que codificam para regiões variáveis de imunoglobulina de murino e segmentos de ADN que codificam para regiões constantes de imunoglobulina humana. Outras formas de "anticorpos quiméricos" abrangidas pela presente invenção, são aquelas, cuja classe, ou subclasse foi modificada ou alterada a partir daquela do anticorpo original. Tais anticorpos "quiméricos" são também referidos como "anticorpos de classe trocada". Métodos para produzir anticorpos quiméricos envolvem ADN recombinante convencional e técnicas de transfecção genética bem conhecidas do estado da técnica. Ver, por ex. Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238 and US 5,204,244.

O termo "anticorpo humanizado" diz respeito a anticorpos, cuja estrutura ou "regiões que determinam a complementaridade" (CDR) foram modificadas, de modo a compreender a CDR de uma imunoglobulina de diferente especificidade, quando comparada com a da imunoglobulina progenitora. Numa concretização preferida, uma CDR de murino é enxertado numa região estrutural de um anticorpo humano para preparar o "anticorpo humanizado". Ver, por ex., Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; e Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270. Os CDRs particularmente preferidos correspondem aquelas sequências representativas que reconhecem os antigénios acima mencionados como anticorpos quiméricos e bifuncionais.

O termo "anticorpo humano", quando aqui utilizado destina-se a incluir anticorpos que possuem regiões variáveis e constantes derivadas das sequências humanas da linha germinativa da imunoglobulina. Os anticorpos humanos são bem conhecidos do estado da técnica (van Dijk, M.A., e van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem Biol* 5 (2001) 368-374). Baseados em tal tecnologia, podem ser produzidos anticorpos humanos contra uma grande variedade de alvos. Exemplos de tais anticorpos são por exemplo descritos em Kellermann, S. A., et al., *Curr Opin Biotechnol.* 13 (2002) 593-597.

O termo "anticorpo humano recombinante", quando aqui utilizado, destina-se a incluir todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados, através de meios recombinantes, tais como anticorpos isolados de uma célula hospedeira, tal como uma célula NS0 ou CHO, ou de um animal (por ex. um ratinho) que é transgénico para genes de imunoglobulina humana, ou anticorpos expressos utilizando um vector de expressão recombinante transfectado para uma célula hospedeira. Tais anticorpos humanos recombinantes possuem regiões variáveis e constantes

derivadas de sequências humanas da linha germinativa da imunoglobulina numa forma modificada. Os anticorpos humanos recombinantes de acordo com a invenção foram sujeitos a hipermutação somática *in vivo*. Assim, as sequências de aminoácidos das regiões VH e VL dos anticorpos recombinantes são sequências que enquanto derivadas e relacionadas com as sequências da linha germinativa VH e VL não podem existir naturalmente dentro do reportório da linha germinativa do anticorpo humano *in vivo*.

Quando aqui utilizado o termo, "ligação específica" ou "liga-se especificamente a" diz respeito a um anticorpo que se liga especificamente ao antigénio CD20. Preferencialmente, a afinidade de ligação tem um valor de KD de 10^{-9} mol/l ou inferior (por ex. 10^{-10} mol/l), preferencialmente com um valor de KD de 10^{-10} mol/l ou inferior (por ex. 10^{-12} mol/l). A afinidade de ligação é determinada por um ensaio de ligação padrão, tal como uma análise por representação de Scatchard em células que expressam CD20.

O termo "molécula de ácido nucleico", quando aqui utilizado destina-se a incluir moléculas de ADN e moléculas de ARN. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de cadeia simples ou de dupla cadeia, mas é preferencialmente uma cadeia dupla de ADN.

O termo "domínios constantes" não se encontram envolvidos directamente na ligação do anticorpo ao antigénio, mas estão envolvidos nas funções efectoras (ADCC, ligação de complemento, e CDC).

A "região variável" (região variável de uma cadeia leve (VL), região variável de uma cadeia pesada (VH)), quando aqui utilizada representa cada um dos pares das cadeias leves e pesadas envolvidas directamente na ligação do anticorpo ao antigénio. Os domínios das cadeias humanas pesadas e leves variáveis possuem a mesma estrutura geral e

cada domínio compreende quatro regiões estruturais (FR), cujas sequências são largamente conservadas, ligadas por três "regiões hipervariáveis" (ou por regiões que determinam a complementaridade, CDRs). As regiões estruturais adoptam uma conformação de folha β e as CDRs podem formar laços que ligam a estrutura em folha β . As CDRs em cada cadeia são mantidas na sua estrutura tridimensional por regiões estruturais e formam conjuntamente com as CDRs da outra cadeia o local de ligação do antigénio. As regiões CDR3 das cadeias pesadas e leves desempenham um papel particularmente importante na especificidade/afinidade da ligação dos anticorpos de acordo com a invenção e disponibilizam por isso um outro objecto da invenção.

Os termos "região hipervariável" ou porção de ligação ao antigénio de um anticorpo" quando aqui utilizados referem-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antigénio. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos das "regiões que determinam a complementaridade" ou "CDRs". Regiões "estrutura- expressão anglo-saxónica: framework" ou "FR" são aquelas regiões de domínio variável diferentes dos resíduos das regiões hipervariáveis de acordo com o aqui definido. Por isso, as cadeias leves e pesadas de um anticorpo compreendem do terminal N ao terminal C os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, e FR4. Especialmente, CDR3 da cadeia pesada é a região que contribui mais para a ligação ao antigénio. As regiões CDR e FR são determinadas de acordo com a definição padrão de Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) and/or those residues from a "hypervariable loop".

Os termos antigénio "antigénio CD20" e "CD20" são aqui utilizados permutavelmente, e incluem quaisquer variantes, isoformas e espécies homólogas do CD20 humano que são expressas naturalmente por células ou são expressas em células transfectadas com o gene CD20. A ligação de um anticorpo da invenção ao antigénio CD20 medeia a morte das células que expressam CD20 (por ex., uma célula tumoral) por inactivação de CD20. A morte das células que expressam CD20 pode ocorrer, através de um ou vários dos mecanismos seguintes: morte celular/indução da apoptose, ADCC e CDC.

Sinónimos de CD20 reconhecidos no estado da técnica, incluem o antigénio CD20 do linfócito-B, antigénio de superfície do linfócito B, B1, Leu-16, Bp35, BM5, e LF5.

O termo "anticorpo anti-CD20" de acordo com a invenção é um anticorpo que se liga especificamente ao antigénio CD20. Dependendo das propriedades de ligação e actividades biológicas de anticorpos anti-CD20 em relação ao antigénio CD20, os dois tipos de anticorpos anti-CD20 (anticorpos anti-CD20 do tipo I e do 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, ver Tabela 2.

Tabela 2

Propriedades dos anticorpos anti-CD20 do tipo I e do tipo II	
Anticorpos anti-CD20 do tipo I	Anticorpos anti-CD20 do tipo II
Epitopo CD20 do tipo I	Epitopo CD20 do tipo II
Localizam CD20 a jangadas lipídicas	Não localizam CD20 a jangadas lipídicas
CDC acrescida (se do isotipo IgG1)	CDC diminuída (se do isotipo IgG1)
Actividade ADCC (se do isotipo IgG1)	Actividade ADCC (se do isotipo IgG1)
Capacidade de ligação completa	Capacidade de ligação reduzida
Agregação homotípica	Agregação homotípica mais forte
Indução de apoptose por reticulação	Indução de forte morte celular sem reticulação

Uma propriedade essencial do anticorpo anti-CD20 do tipo I e do tipo II é o seu modo de ligação. Assim, o anticorpo do tipo I e do tipo II pode ser classificado pela razão das capacidades de ligação ao CD20 em células Raji (ATCC-No. CCL-86) do dito anticorpo anti-CD20, quando comparado com rituximab.

Os anticorpos anti-CD20 do tipo II possuem uma razão entre as capacidades de ligação a CD20 em células Raji (ATCC-No. CCL-86) do dito anticorpo anti-CD20, quando comparada com rituximab de 0,3 a 0,6, preferencialmente de 0,35 a 0,55, mais preferencialmente de 0,4 a 0,5. Exemplos de anticorpos anti-CD20 do tal tipo II incluem por ex. tositumomab (B1 IgG2a), anticorpo B-Ly1 humanizado IgG1 (um anticorpo IgG1 humanizado quimérico de acordo com o revelado na WO 2005/044859), 11B8 IgG1 (tal como o revelado na WO 2004/035607), e AT80 IgG1. Preferencialmente o anticorpo anti-CD20 do tipo II é um anticorpo monoclonal que se liga ao mesmo epitopo como um anticorpo humanizado B-Ly1 (como revelado na WO 2005/044859).

Os anticorpos do tipo I anti-CD20 em contraste com os anticorpos do tipo II possuem uma razão entre as capacidades de ligação a CD20 em células Raji (ATCC-No. CCL-86) do dito anticorpo anti-CD20, quando comparado com rituximab de 0,8 a 1,2, preferencialmente de 0,9 a 1,1. Exemplos de tais anticorpos anti-CD20 do tipo I incluem por ex. rituximab, 1F5 IgG2a (ECACC, hibridoma; Press, O.W., et al., Blood 69/2 (1987) 584-591), HI47 IgG3 (ECACC, hibridoma), 2C6 IgG1 (tal como revelado na WO 2005/103081), 2F2 IgG1 (tal como revelado na WO 2004/035607 e na WO 2005/103081) e 2H7 IgG1 (tal como revelado na WO 2004/056312).

A "razão entre as capacidades de ligação a CD20 em células Raji (ATCC-No. CCL-86) de anticorpos anti-CD20, quando comparados com rituximab" é determinada por medidas

de imunofluorescência directas (são medidas as intensidades de fluorescência médias (MFI) utilizando o dito anticorpo anti-CD20 conjugado com Cy5 e rituximab conjugado com Cy5 numa matriz FACS (Becton Dickinson) com células Raji (ATCC-No. CCL-86), de acordo com o descrito no Exemplo No. 2, e calculado de acordo com o seguinte:

Razão entre as capacidades de ligação a CD20 em células Raji (ATCC-No. CCL-86)=

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

MFI é a intensidade de fluorescência média. Quando aqui utilizado a " Cy5-razão de marcação " significa o número de moléculas Cy5 de marcação por molécula de anticorpo.

Tipicamente o dito anticorpo anti-CD20 do tipo II possui uma razão das capacidades de ligação a CD20 em células Raji (ATCC-No. CCL-86) do dito segundo anticorpo anti-CD20 quando comparado com rituximab de 0,3 a 0,6, preferencialmente 0,35 a 0,55, mais preferencialmente 0,4 a 0,5.

O dito anticorpo anti-CD20 do tipo II de acordo com a invenção possui citotoxicidade celular acrescida dependente do anticorpo (ADCC).

Por "anticorpo que possui citotoxicidade celular acrescida dependente do anticorpo (ADCC)" ou "anticorpo com citotoxicidade celular acrescida dependente do anticorpo (ADCC)" entende-se um anticorpo, como aqui definido que possui ADCC acrescida determinada, através de qualquer método adequado conhecido do perito no estado da técnica. Uma vez aceite, o ensaio ADCC *in vitro* é o seguinte:

1) o ensaio utiliza células alvo que são conhecidas por expressarem o antígeno alvo reconhecido pela região de ligação ao antígeno do anticorpo;

2) o ensaio utiliza células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), isolado a partir do sangue de um dador saudável escolhido aleatoriamente;

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

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

ii) as células alvo são cultivadas por processo padrão de cultura de tecidos, recolhidas a partir da fase de crescimento exponencial com uma viabilidade superior a 90%, lavadas em meio de cultura celular RPMI, marcadas com 100 micro-Curies de ^{51}Cr , lavadas duas vezes com meio de cultura celular, e novamente suspensas em meio de cultura com uma densidade de 10^5 células/ml;

iii) 100 microlitros de uma suspensão final de células alvo acima são transferidas para cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços;

iv) o anticorpo encontra-se diluído em série de 4000 ng/ml a 0,04 ng/ml em meio de cultura celular e adiciona-se 50 microlitros das soluções de anticorpo resultantes às células alvo na placa de microtitulação de 96 poços, testando em triplicado várias concentrações de anticorpo cobrindo a gama de concentração completa acima;

v) nos controlos de libertação máxima (MR), 3 poços adicionais na placa contendo as células alvo marcadas receberam 50 microlitros de uma solução aquosa a 2% (VN) de um detergente não-iónico (Nonidet, Sigma, St. Louis), em vez da solução de anticorpo (ponto iv acima);

vi) nos controlos de libertação espontânea (SR), 3 poços adicionais na placa contendo as células alvo marcadas receberam 50 microlitros de um meio de cultura celular RPMI em vez da solução de anticorpo (ponto iv acima);

vii) a placa de microtitulação de 96 poços é então centrifugada a 50 x g durante 1 minuto e incubada durante 1 hora a 4°C;

viii) adiciona-se a cada poço 50 microlitros da suspensão PBMC (ponto i acima) para dar uma razão efector: célula alvo de 25: 1 e as placas são colocadas num incubador numa atmosfera de CO₂ a 5% a 37°C durante 4 horas;

ix) o sobrenadante isento de células de cada poço é recolhido e a radioactividade libertada experimentalmente (ER) é quantificada utilizando um contador de raios gama;

x) a percentagem de lise específica é calculada para cada concentração de anticorpo de acordo com a fórmula $(ERMR)/(MR-SR) \times 100$, em que ER é a radioactividade média quantificada (ver ponto ix acima) para aquela concentração de anticorpo, MR é a radioactividade média quantificada (ver ponto ix acima) para os controlos MR (ver ponto V acima), e SR é a radioactividade média quantificada (ver ponto ix acima) para os controlos de SR (ver ponto vi acima);

4) "ADCC acrescida" é definida como um aumento na percentagem máxima da lise específica observada na gama de concentração de anticorpo testada acima, e/ou uma redução na concentração do anticorpo requerida para se atingir metade da percentagem máxima da lise específica observada na gama de concentração de anticorpo testada acima. O aumento na ADCC é relativa ao ADCC, medido com o ensaio acima, mediado pelo mesmo anticorpo, produzido pelo mesmo tipo de células hospedeiras que utilizam os mesmos métodos padrão de produção, purificação, formulação e armazenamento, que são conhecidos dos peritos no estado na técnica, mas que não foi produzido por células hospedeiras submetidas a engenharia genética para expressarem GnTIII.

A dita "ADCC acrescida" pode ser obtida por modificação por glicosilação dos ditos anticorpos, isto significa aumentar as ditas funções efectoras naturais mediadas por células dos anticorpos monoclonais, submetendo a engenharia o seu componente oligossacarídeo como descrito em Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 e US 6,602,684.

O termo citotoxicidade dependente do "complemento (CDC)" diz respeito à lise das células alvo do tumor humano pelo anticorpo de acordo com a invenção na presença do complemento. CDC é medido preferencialmente pelo tratamento de uma preparação de células que expressam CD20 com um anticorpo anti-CD20 de acordo com a invenção na presença do complemento. É encontrado CDC se o anticorpo induzir a uma concentração de 100 nM a lise (morte celular) de 20% ou mais das células tumorais após 4 horas. O ensaio é efectuado preferencialmente com células tumorais marcadas com ^{51}Cr ou Eu e medição de ^{51}Cr ou Eu marcado. Os controlos incluem a incubação das células tumorais alvo com complemento, mas sem o anticorpo.

Tipicamente os anticorpos anti-CD20 do tipo II do isotipo IgG1 apresentam propriedades características de CDC. Os anticorpos anti-CD20 do tipo II possuem uma CDC diminuída (se do isotipo IgG1), quando comparados com os anticorpos do tipo I do isotipo de IgG1. Preferencialmente, os anticorpos anti-CD20 do tipo II são anticorpos do isotipo IgG1.

O anticorpo "rituximab" (anticorpo de referência; exemplo de um anticorpo anti-CD20 do tipo I) é um domínio constante de murino gama 1 quimérico humano submetido a engenharia genética contendo anticorpo monoclonal dirigido contra o antigénio CD20 humano. Este anticorpo quimérico contém domínios constantes gama 1 humanos e é identificado pelo nome "C2B8" na US 5,736,137 (Anderson, K.C., et. al.) publicada em 17 de Abril de 1998, atribuída à IDEC Pharmaceuticals Corporation. O Rituximab está aprovado para o tratamento de doentes com linfoma de células B de não-Hodgkin reincidente, ou refractário de baixo grau ou folicular, positivo a CD20. Estudos do mecanismo de acção *in vitro* mostraram que o rituximab exhibe citotoxicidade dependente do complemento humano (CDC) (Reff, M.E., et. al., Blood 83(2) (1994) 435-445). Além disso, exhibe uma actividade significativa em ensaios que medem a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC).

O termo "anticorpo B-Ly1 humanizado" diz respeito a um anticorpo humanizado B-Ly1 revelado na WO 2005/044859 e na WO 2007/031875, que são obtidos a partir do anticorpo monoclonal B-Ly1 anti-CD20 de murino (região variável da cadeia pesada de murino (VH): SEQ ID NO: 1; região variável da cadeia pesada de murino (VL): SEQ ID NO: 2;- ver Poppema, S. and Visser, L., Biotest Bulletin 3 (1987) 131-139;) por quimerização com um domínio constante humano de IgG1 e seguindo-se humanização (ver WO 2005/044859 e WO 2007/031875). Estes "anticorpos humanizados B-Ly1 " são

revelados em detalhe na WO 2005/ 044859 e na WO 2007/031875.

Preferencialmente o anticorpo B-Ly1 humanizado" possui uma região variável da cadeia pesada (VH) seleccionada a partir do grupo da SEQ ID No.3 a SEQ ID No.20 (B-HH2 a B-HH9 e B-HL8 a B-HL17 da WO 2005/044859 e WO 2007/031875). São especialmente preferidas 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 BHL13 da WO 2005/044859 e WO 2007/031875). Preferencialmente "o anticorpo B-Ly1 humanizado" possui uma região variável da cadeia leve (VL) da SEQ ID No. 20 (B-KV1 da WO 2005/044859 e WO 2007/031875). Além disso, o anticorpo humanizado B-Ly1 é preferencialmente um anticorpo IgG1. Tais anticorpos humanizados B-Ly1 de acordo com a invenção são modificados por glicosilação (GE) na região FC de acordo com os procedimentos descritos na WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 e WO 99/154342. Tais anticorpos B-Ly1 humanizados submetidos a "modificado por glicosilação" possuem um padrão alterado de glicosilação na região Fc, possuindo preferencialmente um nível reduzido de resíduos de fucose. Preferencialmente pelo menos 40% ou mais (numa concretização entre 40% e 60%, noutra concretização pelo menos 50%, e ainda noutra concretização pelo menos 70% ou mais) dos oligossacarídeos da região Fc não se encontram fucosilados. Além disso, os oligossacarídeos da região Fc são preferencialmente bissectados.

O componente oligossacarídeo pode afectar significativamente as propriedades relevantes para a eficácia de uma glicoproteína terapêutica, incluindo estabilidade física, resistência ao ataque da protéase, interacções com o sistema imunitário, farmacocinética e actividade biológica específica. Tais propriedades podem depender não só da presença ou ausência, mas também das

estruturas específicas, dos oligossacarídeos. Podem ser feitas algumas generalizações entre a estrutura do oligossacarídeo e a função da glicoproteína. Por exemplo, determinadas estruturas oligossacarídeas medeiam a rápida eliminação da glicoproteína do fluxo sanguíneo, através de interacções com proteínas que se ligam especificamente aos hidratos de carbono, enquanto outras podem estar ligadas a anticorpos e desencadear reacções imunitárias. (Jenkins, N., et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-81).

As células de mamíferos são os hospedeiros preferidos para a produção de glicoproteínas terapêuticas, devido à sua capacidade de glicosilar proteínas na forma mais compatível para uma aplicação humana. (Cumming, D.A., et al., *Glycobiology* 1 (1991) 115-30; Jenkins, N., et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-81). As bactérias só muito raramente é que glicosilam as proteínas, e tal como outros tipos de hospedeiros comuns, tais como leveduras, fungos filamentosos, células de plantas e de insectos dão origem a padrões de glicosilação associados com uma rápida eliminação do fluxo sanguíneo, interacções imunitárias indesejáveis, e nalguns casos específicos, actividade biológica reduzida. Entre as células dos mamíferos, as células do ovário do hamster chinês (CHO) têm sido as mais habitualmente utilizadas durante as duas últimas décadas. Para além de fornecerem padrões de glicosilação adequados, estas células permitem a geração consistente de linhas celulares clonais geneticamente estáveis, altamente produtivas. Elas podem ser cultivadas em elevadas densidades em bioreactores simples utilizando meios isentos de soro, e permitem o desenvolvimento de bioprocessos seguros e reprodutíveis. Outras células animais habitualmente utilizadas incluem células de rim de hamster bebé (BHK), células do mieloma do ratinho NS0 e SP2/0. Mais recentemente, a produção de animais transgénicos foi também

testada. (Jenkins, N., et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-981).

Todos os anticorpos contêm estruturas de hidratos de carbono em posições conservadas nas regiões constantes da região da cadeia pesada em que cada isotipo possui uma matriz distinta de estruturas de hidratos de carbono N-ligadas, que afectam de forma variável o agrupamento de proteínas, secreção, ou actividade funcional. (Wright, A., and Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). A estrutura dos hidratos de carbono ligados no N varia consideravelmente, dependendo do grau de processamento, e pode incluir manose superior, multi-ramificada, assim como oligossacarídeos complexos de duas antenas. (Wright, A., and Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). Tipicamente existe um processamento heterogéneo das estruturas oligossacarídeas nucleares ligadas a um determinado local de glicosilação de tal modo que existem anticorpos monoclonais como formas glicosiladas múltiplas. De forma semelhante foi demonstrado que ocorrem grandes diferenças na glicosilação de anticorpos entre as linhas celulares, e são observadas mesmo pequenas diferenças numa determinada linha celular cultivadas em diferentes condições de cultura. (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5(8) (1995) 813-22).

Uma forma de obter grandes aumentos na potência, mantendo um processo de produção simples e evitando efeitos secundários significativos, indesejáveis é aumentar as funções efectoras naturais, mediadas por células dos anticorpos monoclonais submetendo a engenharia o seu componente oligossacarídeo de acordo com o descrito em Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 e na US 6,602,684. Anticorpos do tipo IgG1, os anticorpos habitualmente mais utilizados na imunoterapia do cancro são glicoproteínas que possuem um local de glicosilação ligado

a N em Asn297 em cada domínio CH2. Os dois complexos de oligossacarídeos de duas antenas ligados a Asn297 encontram-se enterrados entre os domínios CH2, formando contactos extensos com o esqueleto polipeptídico, e a sua presença é essencial para o anticorpo mediar funções efectoras, tal como citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC) (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., et al., *Immunol. Rev.* 163 (1998) 59-76; Wright, A. and Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 26-32).

Foi demonstrado previamente que a sobre-expressão em células (CHO) do ovário do hamster chinês de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferase III ("GnTIII17y), uma glicosiltransferase que catalisa a função de oligossacarídeos bissectados, aumenta significativamente a actividade ADCC *in vitro* de um anticorpo monoclonal quimérico antineuroblastoma (chCE7) produzido pelas células CHO submetidas a engenharia. (Ver Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180; e WO 99/154342). O anticorpo chCE7 pertence a uma grande classe de anticorpos monoclonais não conjugados que possuem uma elevada afinidade e especificidade tumoral, mas que possuem uma potência demasiado baixa para serem clinicamente úteis quando produzidos em linhas celulares industriais padrão a que lhes falta o enzima GnTIII (Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180). Este estudo foi o primeiro a mostrar que aumentos grandes da actividade de ADCC poderiam ser obtidos submetendo a engenharia as células que produzem anticorpos para expressarem GnTIII, o que levou também a um aumento na proporção da região constante (Fc)-associada a oligossacarídeos bissectados, incluindo oligossacarídeos bissectados, não-fucosilados, acima dos níveis encontrados nos anticorpos de ocorrência natural.

O termo "expressão do antigénio CD20" destina-se a indicar um nível significativo de expressão do antigénio CD20 numa célula, preferencialmente à superfície celular de uma célula T- ou célula B, mais preferencialmente uma célula B, de um tumor ou cancro, respectivamente, preferencialmente um tumor não sólido. Os doentes que possuem um "cancro que expressa CD20" podem ser determinados, através de testes padrão conhecidos no estado da técnica. Por ex. a expressão de antigénios CD20 é medida utilizando detecção imunohistoquímica (IHC) , FACS ou, por via da detecção à base de PCR do mARN correspondente.

O termo "cancro que expressa CD20", quando aqui utilizado diz respeito a todos os cancros, nos quais as células cancerígenas mostram uma expressão do antigénio CD20. Um tal cancro que expressa CD20 pode ser, por exemplo, linfoma, leucemias linfocíticas, cancro do pulmão, cancro do pulmão de não pequenas células (NSCL), cancro do pulmão de células bronco-alveolares, cancro do osso, cancro do pâncreas, cancro da pele, cancro da cabeça, ou pescoço, melanoma cutâneo, ou intra-ocular, cancro uterino, cancro do ovário, cancro rectal, cancro da região anal, cancro do estômago, cancro gástrico, cancro do cólon, cancro da mama, cancro uterino, carcinoma dos tubos de Falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo do útero, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, doença de Hodgkin, cancro do esófago, cancro do intestino delgado, cancro do sistema endócrino, cancro da glândula endócrina, cancro da glândula paratiroide, campo da glândula adrenal, sarcoma do tecido mole, cancro da uretra, cancro do pénis, cancro da próstata, cancro da bexiga, cancro do rim ou do uréter, carcinoma da célula renal, carcinoma da pélvis renal, mesotelioma, cancro hepatocelular, cancro biliar, neoplasma do sistema nervoso central (CNS), tumores da medula espinal, glioma do tronco cerebral, glioblastoma

multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas das células escamosas, adenoma pituitário, incluindo versões refractárias de qualquer um dos cancros acima, ou uma combinação de um ou vários dos cancros acima.

Preferencialmente o cancro que expressa CD20, quando aqui utilizado diz respeito a linfomas (preferencialmente linfomas de células B não Hodgkin (NHL)) e leucemias linfocíticas. Tais linfomas e leucemias linfocíticas incluem por ex. a) linfomas foliculares, b) linfomas de células pequenas não cindidas/ linfoma de Burkitt (incluindo linfoma de Burkitt endémico, linfoma de Burkitt esporádico e linfoma de não Burkitt) c) linfomas da zona marginal (linfoma de células B incluindo zona marginal extranodal (linfomas do tecido linfático associados a mucosa, MALT), linfoma da célula da zona marginal nodal e linfoma esplénico da zona marginal), d) linfomas das células de Mantle (MCL), e) linfomas das células grandes (incluindo linfoma de grandes células de células B difusas (DLCL), linfoma de células mistas difusas, linfoma imunoblástico, linfoma das células B mediastinais primárias, linfoma angiocêntrico- linfoma das células B pulmonares, f) leucemia de células pilosas, g) linfoma linfocítico, macroglobulinemia de waldenstrom, h) leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL)/ linfoma linfocítico pequeno (SLL), leucemia prolinfocítica de células B, i) neoplasmas de células de plasma, mieloma de células de plasma, mieloma múltiplo, plasmacitoma, j) doença de Hodgkin.

Mais preferencialmente o cancro que expressa CD20 é um linfoma de células não Hodgkin de células B (NHL). Especialmente, o cancro que expressa CD20 é um linfomas das células de Mantle (MCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de célula B

grandes difusas (DLCL), linfoma de Burkitt, leucemia de células pilosas, linfoma folicular, mieloma múltiplo, linfoma da zona marginal, desordem linfoproliferativa pós-transplante (PTLD), linfoma associado à SIDA, macroglobulinemia de Waldenström, ou linfoma primário do SNC.

O termo "um método de tratamento", ou seu equivalente, quando aplicado a, por exemplo a cancro refere-se a um procedimento ou decurso de uma acção que é desenhado para reduzir ou eliminar o número de células cancerígenas num doente, ou para aliviar os sintomas de um cancro. "Um método de tratamento" de cancro ou de qualquer outra desordem proliferativa não necessita necessariamente que as células de cancro ou outra desordem vão de facto ser eliminadas, que o número de células ou desordem vá de facto ser reduzido, ou que os sintomas de um cancro, ou outra desordem sejam de facto aliviados. Frequentemente, um método para o tratamento do cancro será efectuado, mesmo com uma baixa taxa de sucesso, mas que devido à história médica e esperança de sobrevivência estimada de um doente, é no entanto considerada induzir um decurso de acção globalmente benéfico.

Numa concretização, o tratamento com o anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade dependente de anticorpo acrescida (ADCC) está combinado com ciclofosfamida e vincristina.

O tratamento com o anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade dependente de anticorpo acrescida (ADCC) combinado com doxorubicina é também revelado.

O tratamento com o anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade dependente de anticorpo acrescida (ADCC) combinado com ciclofosfamida é também revelado.

Numa outra concretização o tratamento com o anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade dependente de

anticorpo acrescida (ADCC) está combinado com ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

Os termos "co-administração", "co-administrar", ou "em combinação", quando aqui utilizado diz respeito à administração do dito anticorpo anti-CD20 do tipo II e dos ditos agentes quimioterapêuticos como formulação única, ou como duas formulações separadas. A co-administração pode ser simultânea, ou sequencial por qualquer ordem, em que preferencialmente existe um período de tempo em que ambos (ou todos) os princípios activos exercem simultaneamente as suas actividades biológicas. O dito anticorpo anti-CD20 do tipo II e os ditos agentes quimioterapêuticos são co-administrados simultaneamente ou sequencialmente (por ex., por via intravenosa (i.v.), através de uma infusão contínua (uma para o anticorpo e eventualmente uma para os agentes quimioterapêuticos; ou o agente quimioterapêutico é administrado oralmente). Quando ambos os agentes terapêuticos são co-administrados sequencialmente a dose é administrada, ou no mesmo dia, ou em duas administrações separadas, ou um dos agentes é administrado no dia 1 e o segundo é co-administrado do dia 2 ao dia 7, preferencialmente do dia 2 ao dia 4. Assim, o termo "sequencialmente" significa num período de 7 dias após a dose do primeiro anticorpo, preferencialmente dentro de 4 dias após a dose do primeiro anticorpo; e o termo "simultaneamente" significa ao mesmo tempo. Os termos "co-administração" no que diz respeito à manutenção das doses do anticorpo anti-CD20 do tipo II e dos agentes quimioterapêuticos significa que as doses de manutenção podem ser co-administradas simultaneamente, se o ciclo de tratamento é adequado para ambos os fármacos, por ex. para cada semana. Ou os agentes quimioterapêuticos são por ex. administrados a cada primeiro a terceiro dia e o anticorpo anti-CD20 do tipo II é administrado cada semana. Ou as

doses de manutenção são co-administradas sequencialmente num período de um ou de vários dias.

É evidente que os anticorpos são administrados ao doente numa "quantidade terapêuticamente eficaz" (ou simplesmente "quantidade eficaz") que é a quantidade do composto respectivo ou combinação que vai provocar a resposta biológica ou médica de um tecido, sistema, animal ou humano que é procurado pelo investigador, veterinário, médico, ou outro clínico.

A quantidade de co-administração do dito anticorpo anti-CD20 tipo II e dos ditos agentes quimioterapêuticos e a altura de co-administração vai depender do tipo (espécies, género, idade, peso etc.) e condição do doente a ser tratado e gravidade da doença ou condição a ser tratada. O anticorpo anti-CD20 do tipo II e os ditos agentes quimioterapêuticos são co-administrados de forma adequada ao doente de uma só vez, ou ao longo de uma série de tratamentos. Dependendo do tipo e da gravidade da doença cerca de 1 µg /kg a 50 mg/kg (por ex. 0,1-20 mg/kg) do dito anticorpo anti-CD20 do tipo II e 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ex. 0,1-20 mg/kg) dos ditos agentes terapêuticos é uma dosagem inicial candidata a uma co-administração de ambos os fármacos ao doente. Se a administração é intravenosa para o tempo de infusão inicial para o dito anticorpo anti-CD20 do tipo II, ou ditos agentes quimioterapêuticos pode ser mais longa do que os tempos de infusão posteriores, por exemplo aproximadamente durante 90 minutos para a infusão inicial, e aproximadamente 30 minutos para infusões posteriores (se a infusão inicial for bem tolerada).

A dosagem preferida do dito anticorpo anti-CD20 do tipo II vai-se encontrar na gama de 0,05mg/kg a cerca de 30mg/kg. Assim, uma ou mais doses de cerca de 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 4,0mg/kg, 10mg/kg ou 30mg/kg (ou qualquer das suas combinações) podem ser co-administradas ao doente. A

dosagem preferida dos ditos agentes quimioterapêuticos vai estar na gama de 0,01 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, por ex. 0,1 mg/kg a 10,0 mg/kg de bortezomib. Dependendo do tipo de (espécie, género, idade, peso, etc.) e condição do doente e do tipo de anticorpo anti-CD2 e agentes quimioterapêuticos, a dosagem e o calendário de administração do dito anticorpo anti-CD20 pode diferir da dosagem dos agentes quimioterapêuticos. Por ex. o dito anticorpo anti-CD20 pode ser administrado por ex. cada uma a três semanas e os ditos agentes terapêuticos podem ser administrados diariamente ou cada 2 a 10 dias. Uma dose de carga inicial mais elevada, seguida por uma ou mais doses mais baixas podem também ser administradas.

Numa concretização preferida, o medicamento é útil para evitar ou reduzir metástases ou ainda a disseminação num tal doente que sofre de um cancro que expressa CD20. O medicamento é útil para aumentar a duração da sobrevivência de tal doente, aumentando a progressão da sobrevivência livre de tal doente, aumentando a duração da resposta, resultando numa melhoria estatisticamente significativa e com sentido do ponto de vista clínico do doente tratado medido pela duração da sobrevivência, progressão da sobrevivência livre, taxa de resposta ou duração de resposta. Numa concretização preferida o medicamento é útil para aumentar a taxa de resposta num grupo de doentes.

Pode ser utilizado o anticorpo anti-CD20 do tipo II em combinação com agentes quimioterapêuticos para o tratamento do cancro que expressa CD20. Tais moléculas encontram-se presentes de forma adequada na combinação em quantidades que são eficazes para o objectivo pretendido. Por isso, numa concretização, o tratamento com o anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) é administrado em combinação com um ou vários agentes terapêuticos seleccionados no grupo

constituído por ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina, um corticosteroide adicional, preferencialmente prednisona.

Numa concretização, o tratamento com o anticorpo anti-CD20 do tipo II em combinação com agentes quimioterapêuticos é utilizado sem corticosteroides adicionais.

A utilização do corticosteroide descrito acima, tal como nos regimes quimioterapêuticos encontra-se geralmente bem caracterizada no estado da técnica da terapia do cancro, e a sua utilização cai sob as mesmas considerações para monitorizar a tolerância e a eficácia e para controlar as vias de administração e dosagens, com alguns ajustamentos. Por exemplo, as dosagens reais dos agentes quimioterapêuticos e os corticosteroides podem variar dependendo da resposta das células cultivadas do doente determinada pela utilização de métodos de histocultura. Geralmente, a dosagem vai ser reduzida, quando comparada com a quantidade utilizada na ausência de outros agentes adicionais.

Dosagens típicas de agentes quimioterapêuticos eficazes e/ ou corticosteroides podem encontrar-se nas gamas recomendadas pelo fabricante, e quando indicado por respostas *in vitro* ou respostas em modelos animais podem ser reduzidas até cerca de uma ordem de magnitude de concentração ou quantidade. Assim, a dosagem real vai depender da avaliação do médico, do estado do doente e da eficácia do método terapêutico baseado na resposta *in vitro* das células malignas primárias cultivadas ou amostra de tecido histocultivado, ou nas respostas observadas nos modelos animais adequados.

No contexto desta invenção, uma quantidade eficaz de uma radiação ionizante pode ser efectuada e/ou pode ser utilizado um fármaco radioactivo para além do tratamento com anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade

celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) em combinação com agente quimioterapêutico para o tratamento do cancro que expressa CD20. A fonte de radiação pode ser externa ou interna em relação ao doente a ser tratado. Quando a fonte é externa em relação ao doente, a terapia é conhecida como terapia de radiação de feixe externo (EBRT). Quando a fonte de radiação é interna em relação ao doente, o tratamento é designado braquiterapia (BT). Átomos radioactivos para serem utilizados no contexto desta invenção podem ser seleccionados a partir do grupo que inclui, mas não se encontra limitado a rádio, céσιο-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 tais isótopos radioactivos. Preferencialmente, o tratamento com anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) em combinação com agente quimioterapêutico é utilizado sem uma tal radiação ionizante.

A terapia de radiação é um tratamento padrão para controlar tumores inoperáveis e/ou metástases tumorais. Foram observados melhores resultados quando a terapia de radiação foi combinada com a quimioterapia. A terapia de radiação encontra-se baseada no princípio que uma radiação de alta dose administrada a uma área alvo vai resultar na morte das células reprodutivas, tanto em tecidos de tumores como nos tecidos normais. O regime de dosagem da radiação é geralmente definido em termos de dose de radiação absorvida (Gy), tempo e fraccionamento, e tem de ser cuidadosamente definido pelo oncologista. A quantidade de radiação que um doente recebe vai depender de várias considerações, mas as duas mais importantes são a localização do tumor em relação a outras estruturas críticas ou órgãos do corpo e a extensão em que o tumor alastrou. Um decurso típico de tratamento de um doente submetido a terapia de radiação vai

ter um calendário de tratamento num período de 1 a 6 semanas, com uma dose total entre 10 e 80 Gy administrada ao doente numa fracção única diária de cerca de 1,8 a 2,0 Gy, 5 dias por semana. Numa concretização preferida desta invenção existe uma sinergia, quando tumores em doentes humanos são tratados com o tratamento de combinação da invenção e radiação. Por outras palavras, a inibição do crescimento do tumor, através de agentes que compreendem a combinação da invenção é aumentada, quando combinada com radiação, opcionalmente com agentes quimioterapêuticos adicionais, ou agentes anticancerígenos. Parâmetros de terapias de radiação adjuvante estão por exemplo contidos na WO 99/60023.

Anticorpos anti-CD20 do tipo II são administrados a um doente de acordo com métodos conhecidos, através de administração intravenosa por bolus ou através de infusão contínua ao longo de um período de tempo, pelas vias intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutânea, intra-articular, intrasinovial, ou intratecal. É preferida a administração intravenosa ou subcutânea dos anticorpos.

Os agentes quimioterapêuticos são administrados a um doente de acordo com métodos conhecidos, por ex. por administração intravenosa como bolus, ou através de infusão contínua ao longo de um período de tempo, pelas vias intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutânea, intra-articular, intrasinovial, ou intratecal, ou peroral. É preferida a administração intravenosa, subcutânea, ou oral dos agentes quimioterapêuticos.

O presente documento compreende ainda um kit compreendendo um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade acrescida dependente de anticorpo (ADCC) e um ou vários agentes quimioterapêuticos seleccionados no grupo que consiste em ciclofosfamida, vincristina e

doxorubicina, para o tratamento de combinação de um doente que sofre de um cancro que expressa CD20. Numa concretização preferida, os recipientes do kit podem ainda incluir um veículo farmacologicamente aceitável. O kit pode ainda incluir um diluente estéril, que é preferencialmente armazenado num recipiente adicional separado. O kit pode ainda incluir um folheto informativo na embalagem compreendendo instruções impressas direccionando o uso do tratamento combinado como um método para a doença de cancro que expressa CD20, preferencialmente um linfoma de células B não-Hodgkin (NHL).

O termo "folheto informativo" diz respeito a instruções habitualmente incluídas nas embalagens comerciais de produtos terapêuticos, que podem incluir informação sobre indicações, usos, dosagem, administração, contra-indicações e/ou avisos dizendo respeito ao uso de tais produtos terapêuticos.

Numa concretização preferida, os recipientes do artigo fabricado podem ainda incluir um veículo farmacologicamente aceitável. O artigo fabricado pode ainda incluir um diluente estéril, que é preferencialmente armazenado num recipiente separado adicional.

Quando aqui utilizado, "veículo farmacologicamente aceitável" destina-se a incluir qualquer, ou todo o material compatível com administração farmacêutica incluindo solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos e que atrasam a absorção, e outros materiais e compostos compatíveis com a administração farmacêutica. Com excepção de qualquer meio ou agente que seja incompatível com o princípio activo seja contemplado no uso nas composições da invenção. Princípios activos complementares podem também ser incorporados nas composições.

Composições Farmacêuticas:

Composições farmacêuticas podem ser obtidas processando o anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) e/ou os agentes quimioterapêuticos seleccionados no grupo constituído por ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina de acordo com esta invenção com veículos farmacêuticamente aceitáveis inorgânicos, ou orgânicos. Pode ser utilizada lactose, amido de milho ou os seus derivados, talco, ácidos esteáricos, ou os seus sais e análogos, por exemplo, tais como veículos para comprimidos, comprimidos revestidos, drageias e cápsulas de gelatina dura. Veículos adequados para cápsulas de gelatina moles são por exemplo, óleos vegetais, ceras, gorduras, polióis semi-sólidos e líquidos e semelhantes. Dependendo da natureza do princípio activo, não são geralmente necessários veículos no caso de cápsulas de gelatina mole. Veículos adequados para a produção de soluções e xaropes são por exemplo, água, polióis, gliceróis, óleo vegetal e análogos. Veículos adequados para supositórios são, por exemplo, óleos naturais ou endurecidos, ceras, gorduras, polióis semi-líquidos ou líquidos e análogos.

As composições farmacêuticas podem além disso, conter conservantes, solubilizantes, estabilizantes agentes molhantes, emulsionantes, edulcorantes, corantes, agentes que conferem sabor, sais para variar a pressão osmótica, tampões, agentes mascarantes ou antioxidantes. Eles podem ainda conter outras substâncias terapêuticamente valiosas.

Uma concretização da invenção é uma composição farmacêutica compreendendo tanto o anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente do anticorpo (ADCC) e um ou vários agentes quimioterapêuticos seleccionados no grupo constituído por ciclofosfamida,

vincristina e doxorubicina, em particular para o uso no cancro, que expressa CD20.

A dita composição farmacêutica pode ainda compreender um ou vários veículos farmacêuticamente aceitáveis.

A presente invenção compreende ainda uma composição farmacêutica, em particular para o uso no cancro, compreendendo

(i) uma primeira quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD20 do tipo II com uma citotoxicidade celular acrescida dependente do anticorpo (ADCC), e

(ii) uma segunda quantidade eficaz de um ou vários agentes quimioterapêuticos seleccionados a partir do grupo constituído por ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina. Tal composição compreende opcionalmente veículos farmacêuticamente aceitáveis e/ou excipientes.

Composições farmacêuticas do anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida (ADCC) dependente do anticorpo isoladamente utilizado de acordo com a presente invenção são preparadas para armazenamento misturando um anticorpo que possui o grau desejado de pureza com veículos farmacêuticamente aceitáveis opcionais, excipientes ou estabilizantes (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos aceitáveis, excipientes, ou estabilizantes são não tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações utilizadas e incluem tampões, tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio; fenol, álcool butílico, ou benzílico; alquil parabenos, tal como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de

baixo peso molecular (menos do que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina do soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros hidratos de carbono incluindo glucose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trehalose, ou sorbitol; contra-íões que formam sais, tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo complexos proteicos de Zn); e/ou agentes tensioactivos não iónicos, tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG).

Composições farmacêuticas dos agentes quimioterapêuticos seleccionados a partir do grupo constituído por cilofosfamida, vincristina e doxorubicina, dependem das suas propriedades farmacêuticas; por ex. para compostos químicos pequenos, tais como por ex. bortezomib, uma formulação poderia ser por ex. a seguinte:

a) Formulação dos comprimidos (Granulação a húmido):

Item	Ingredientes	mg/comprimido			
		5	25	100	500
1	Composto de fórmula (I)	5	25	100	500
2	Lactose anidra DTG	125	105	30	150
3	Sta-Rx-1500	6	6	6	30
4	Celulose microcristalina	30	30	30	150
5	Estearato de magnésio	1	1	1	1
	Total	167	167	167	831

Processo de Fabrico:

1. Misturar os itens 1, 2, 3 e 4 e granular com água purificada.
2. Secar os grânulos a 50°C.
3. Passar os grânulos, através de equipamento de moagem adequado.
4. Adicionar o item 5 e misturar durante três minutos; comprimir numa prensa adequada.

b) Formulação das Cápsulas:

Item	Ingredientes	mg/cápsula			
1	Composto de fórmula (I)	5	25	100	500
2	Lactose hidratada	159	123	148	--
3	Amido de milho	25	35	40	70
4	Talco	10	15	10	25
5	Estearato de magnésio	1	2	2	5
	Total	200	200	300	600

Processo de Fabrico:

1. Misturar os itens 1, 2, 3 num misturador adequado durante 30 minutos.
2. Adicionar os itens 4 e 5 e misturar durante 3 minutos.
3. Encher uma cápsula adequada.

Numa outra concretização da invenção as composições farmacêuticas de acordo com a invenção são preferencialmente duas formulações separadas para o dito anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo e para os agentes

quimioterapêuticos seleccionados no grupo que consiste em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina. Os princípios activos podem também estar encerrados em microcápsula, preparadas por exemplo por técnicas de coacervação ou por polimerização interracial, por exemplo microcápsulas de hidróximetilcelulose ou de gelatina e microcápsulas de pol-(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas para administração de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são reveladas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edição, Osol, A. Ed. (1980).

Podem ser fabricadas preparações de libertação prolongada. Exemplos adequados de preparações de libertação prolongada incluem matrizes semi-permeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, cujas matrizes encontram-se na forma de artigos com formas, por ex. películas, ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de libertação prolongada incluem poliésteres, hidrogeles (por exemplo, poli(2-hidróxi-*etil*-metacrilato), ou álcool poli(vinílico), polilactidos (US 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama-*etil*-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo não-degradável, copolímeros do ácido láctico -copolímeros do ácido glicólico degradáveis, tal como LUPRON DEPOTTM (microesferas injectáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolide), e ácido de poli-D-(-)-3-hidróxibutírico.

As formulações para serem utilizadas para administração *in vivo* têm de ser estéreis. Isto é facilmente conseguido por filtração, através de membranas de filtração estéreis.

A presente memória descritiva revela ainda um processo de tratamento do cancro, compreendendo a administração a um doente com necessidade de tal tratamento de (i) uma

primeira quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD20 do tipo II com uma citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC); e (ii) uma segunda quantidade eficaz de um ou vários agentes quimioterapêuticos seleccionados a partir do grupo constituído por ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

A presente descrição compreende ainda um método para o tratamento do cancro, compreendendo a administração a um doente com necessidade de tal tratamento (i) uma primeira quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD20 do tipo II com uma citotoxicidade celular acrescida dependente do anticorpo (ADCC); e (ii) uma segunda quantidade eficaz de um ou vários agentes quimioterapêuticos seleccionados a partir do grupo constituído por ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

Quando aqui utilizado o termo "doente" refere-se preferencialmente a um ser humano com necessidade de tratamento com anticorpo anti-CD20 do tipo II (por ex. um doente que sofre de cancro que expressa CD20) para qualquer finalidade, e mais preferencialmente um ser humano com necessidade de tal tratamento para tratar o cancro, ou um estado-pré-canceroso ou lesão. Contudo, o termo "doente" pode também referir-se a animais não humanos, preferencialmente a mamíferos, tais como cães, gatos, cavalos, vacas, porcos, ovelhas e primatas não humanos, entre outros.

A invenção compreende um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) para o tratamento do cancro que expressa CD20 em combinação com um ou vários agentes quimioterapêuticos seleccionados a partir do grupo que consiste em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina, caracterizado por o dito anticorpo anti-CD20 do tipo II ser um anticorpo B-Ly1 humanizado sujeito a modificado por

glicosilação, em que o anticorpo BLy1 humanizado possui uma região humanizada da cadeia pesada (VH) da SEQ ID No.7 e uma região variável da cadeia leve (VL) da SEQ ID No. 20, e o tratamento com o anticorpo anti-CD20 do tipo II é efectuado em combinação

- a) com ciclofosfamida e vincristina, ou
- b) ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

A descrição revela ainda um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente do anticorpo (ADCC) para o tratamento de um doente que sofre de um cancro que expressa CD20 em combinação com um ou vários agentes quimioterapêuticos seleccionados a partir do grupo que consiste em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

A invenção compreende ainda um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente do anticorpo (ADCC) e um ou vários agentes quimioterapêuticos seleccionados a partir do grupo que consiste em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina para ser utilizado no tratamento do cancro que expressa CD20. A descrição revela ainda um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente do anticorpo (ADCC) e um ou vários agentes quimioterapêuticos seleccionados a partir do grupo que consiste em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina para ser utilizado no tratamento de um doente que sofre de um cancro que expressa CD20.

Preferencialmente o anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente do anticorpo (ADCC) é um anticorpo B-Ly1 humanizado modificado por glicosilação. Preferencialmente o cancro que expressa CD20 é um linfoma de célula B de não Hodgkin (NHL).

Os exemplos seguintes, listagem de sequências e figuras são disponibilizados para auxiliar a compreensão da presente invenção, cujo verdadeiro âmbito é apresentado nas reivindicações em anexo.

Descrição da Listagem de Sequências:

SEQ ID NO: 1 sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada (VH) de anticorpo B-Ly1 monoclonal de murino anti-CD20.

SEQ ID NO: 2 sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve (VL) de anticorpo B-Ly1 monoclonal de murino anti-CD20.

SEQ ID NO: 3 -19 sequências de aminoácidos da região variável da cadeia pesada (VH) de anticorpos B-Ly1 humanizados (B-HH2 to B-HH9, B-HL8, e B-HL10 to B-HL17)

SEQ ID NO: 20 sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve (VL) de anticorpo B-Ly1 humanizado B-KV1.

Descrição das Figuras:

Figure 1 a) Actividade sinergística anti-tumoral do tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) com ciclofosfamida e vincristina

e

b) comparação com um tratamento combinado de anticorpo anti-CD20 do tipo I (rituximab) com ciclofosfamida e vincristina ao linfoma humano de célula B não Hodgkin WSU-DLCL2 (NHL). Valores médios do volume do tumor [mm³] +/- IQR representado no eixo dos yy; número de dias após

injecção de células tumorais representado no eixo dos xx. Legenda: A) Veículo (*círculos*), B) ciclofosfamida (25 mg/kg) e vincristina (0,25 mg/kg) uma vez por semana (*cruzes*), C) rituximab (30 mg/kg) uma vez por semana (*triângulos*), D) B-lyl humanizado modificado por glicosilação, (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) uma vez por semana (*quadrados*), E) rituximab (30 mg/kg) com ciclofosfamida (25 mg/kg) e vincristina (0,25 mg/kg), uma vez por semana (*rombos*) e F) B-lyl humanizado modificado por glicosilação (B-HH6-B-KV1 GE), (30 mg/kg) com ciclofosfamida (25 mg/kg) e vincristina (0,25 mg/kg), uma vez por semana (*sinais mais*).

Figura 2 Intensidade de fluorescência média (MFI, eixo dos yy esquerdo) do anticorpo anti-CD20 do tipo I (Cy5-rituximab = barra branca) e anticorpo anti-CD20 do tipo II (Cy5 -modificado por glicosilação, B-Ly1 humanizada B-HH6-B-KV1 GE = barras pretas) em células Raji (ATCC-No. CCL-86); Razão entre as capacidades de ligação ao anticorpo anti-CD20 do tipo I (rituximab) e do anticorpo anti-CD20 (B-HH6-B-KV1 GE) do tipo II comparado com rituximab (eixo do y do lado direito).

Figura 3 a) actividade sinergística anti-tumoral do tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) com doxorubicina e b) comparação com um tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 do tipo I (rituximab) com doxorubicina ao linfoma folicular RL humano não Hodgkin (NHL). Valores médios do volume tumoral [mm^3] +/- IQR representado no eixo dos yy; número de dias após a injecção de células tumorais representadas no eixo dos x. Legenda: A) veículo (*sinais mais*), B) doxorubicina (3 mg/kg) uma vez por semana

(cruzes), C) rituximab (30 mg/kg) uma vez por semana (*triângulos*),
 D) B-ly1 humanizado (B-HH6-B-KV1 GE), modificado por glicosilação, (30 mg/kg) uma vez por semana (quadrado), E) rituximab (30 mg/kg) com doxorubicina (3 mg/kg), uma vez por semana (*rombos*) e F) Bly1 humanizado (B-HH6-B-KV1 GE) modificado por glicosilação, (30 mg/kg) com doxorubicina (3 mg/kg), uma vez por semana (*círculos*).

Figure 4 a) Actividade sinergística anti-tumoral do tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) com ciclofosfamida e b) comparação com um tratamento combinado de anticorpo anti-CD20 do tipo I (rituximab) com ciclofosfamida ao linfoma humano folicular RL não Hodgkin (NHL). Valores médios do volume do tumor [mm³] +/- IQR representado no eixo dos yy; número de dias após injeção de células tumorais representado no eixo dos xx. Legenda: A) Veículo (*círculos*), B) ciclofosfamida (50 mg/kg) uma vez por semana (cruzes), C) rituximab (30 mg/kg) uma vez por semana (*triângulos*),
 D) B-ly1 humanizado modificado por glicosilação, (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) uma vez por semana (quadrados), E) rituximab (30 mg/kg) com ciclofosfamida (50 mg/kg) uma vez por semana (*rombos*) e F) B-ly1 humanizado modificado por glicosilação (B-HH6-B-KV1 GE), (30 mg/kg) com ciclofosfamida (50 mg/kg), uma vez por semana (*sinais mais*).

Procedimentos Experimentais

Exemplo 1

Actividade anti-tumoral do tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) com ciclofosfamida e vincristina.

Agentes de Teste:

Foi disponibilizado anticorpo anti-CD20 do tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) (B-Ly1= humanizado, B-HH6-B-KV1 modificado por glicosilação, ver WO 2005/044859 e WO 2007/031875) como solução mãe (c=9,4 mg/ml) da GlycArt, Schlieren, Suíça. O tampão do anticorpo incluiu histidina, trehalose e polissorbato 20. A solução de anticorpo foi diluída de forma adequada em PBS a partir da solução mãe para as injeções iniciais.

Rituximab foi disponibilizado por Hoffmann La Roche, Basileia.

Ciclofosfamida e vincristina foram adquiridas como formulações clínicas na Baxter Oncology GmbH, Halle, Alemanha ou medac, Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Hamburgo, Alemanha, respectivamente. A diluição foi ajustada a partir da solução mãe reconstituída.

Linhas celulares e condições de cultura:

Linfoma humano WSU-DLCL2 não-Hodgkin (NHL) foi gentilmente cedido pela Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, NJ, EUA. A linha celular tumoral foi cultivada em rotina em meio RPMI (Laboratórios PAA, Áustria) suplementado com 10% de soro fetal de bovino (Laboratórios PAA, Áustria) e 2 mM de L-glutamine, a 37°C numa atmosfera saturada com água a 5% de CO₂. A transferência 4 foi utilizada para transplantação. As células foram co-injectadas com Matrigel.

Animais:

Ratinhos fêmea bege SCID; idade 7-8 semanas à chegada (adquiridos a Charles River, Sulzfeld, Alemanha) foram mantidos em condições isentas de patogéneos específicos com ciclos diários de 12 h de luz/ 12 h de escuridão de acordo com as directivas seguidas (GV-Solas; Felasa; TierschG). O protocolo do estudo experimental foi revisto e aprovado pelo governo local. Após chegada, os animais foram mantidos na parte de quarentena das instalações dos animais durante uma semana para se habituarem ao novo ambiente e para observação. Monitorização contínua da saúde foi realizada numa base regular. Foi disponibilizada ad libitum alimentação de dieta (Provimi Kliba 3337) e água (acidificada pH 2,5-3).

Monitorização:

Os animais foram controlados diariamente no que diz respeito a sintomas clínicos e detecção de efeitos secundários. Para monitorizar durante a experiência o peso corporal dos animais foi documentado duas vezes por semana e o volume do tumor foi medido com um calibrador após faseamento.

Tratamento dos animais:

O tratamento dos animais iniciou-se no dia da aleatorização, 9 dias após transplantação das células. Anticorpo B-HH6-B-KV1 GE, humanizado modificado por glicosilação anti-CD20 do tipo II ou Rituximab foram administrados como agentes únicos i.v. q7d no dia 9, 15, 23, 30, 37, 44, 51 e 58 do estudo na dosagem indicada, 30 mg/kg. O veículo correspondente foi administrado nos mesmos

dias. Ciclofosfamida e vincristina foram administrados i.v. uma vez por semana no dia 9, 15, 23, 30, 37, 44, 51 e 58 a 25 mg/kg ou 0,25 mg/kg, respectivamente. Nos grupos terapêuticos da combinação, ambos os anticorpos foram administrados 24 horas após os agentes quimioterapêuticos no dia 10, 16, 24, 31, 38, 45, 52 e 59.

Estudo da inibição do crescimento tumoral *in vivo*:

No dia 35 após a transplantação de célula, houve uma inibição do crescimento tumoral significativa de 73%, 85%, 66%, 94% ou 90% nos animais, aos quais foi administrado rituximab, anticorpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE, quimioterapia, combinação da quimioterapia e anticorpo anti-CD20, ou combinação de quimioterapia e rituximab, respectivamente, quando comparado com o grupo de controle. No final da experiência, foi observada uma inibição do crescimento tumoral significativamente melhor no grupo de combinação quimioterapia/ anticorpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE, quando comparado com o grupo de combinação quimioterapia/rituximab.

O efeito dos diferentes tratamentos até ao final do estudo no dia 64 após o transplante da célula foi demonstrado pelo valor do Crescimento Tumoral Retardado (T-C, em que T é o tempo médio nos dias requeridos pelo grupo de tratamento para os tumores atingirem um tamanho pré-determinado de 1500 mm³, e C é o tempo médio em dias para os tumores do grupo de controle atingirem o mesmo tamanho). Os resultados são apresentados na Tabela seguinte:

Tabela 3

Atraso do crescimento tumoral dos grupos de tratamento comparado com os grupos de controlo em dias		
Grupo	Composto (dosagem)	Valor T-C (dias)
2	Rituximab (30 mg/kg)	13
3	Anticorpo B-HH6-B-KV1 GE anti CD20 (30mg/kg)	19
4	Ciclofosfamida (25 mg/kg) Vincristina (0,25 mg/kg)	14
5	Ciclofosfamida (25 mg/kg) Vincristina (0,25 mg/kg) anticorpo B-HH6-B-KV1 GE anti CD20 (30mg/kg)	38
6	Ciclofosfamida (25 mg/kg) Vincristina (0,25 mg/kg) Rituximab (30 mg/kg)	28

Exemplo 2**Determinação da razão das capacidades de ligação a CD20 em células Raji (ATCC-No. CCL-86) do anticorpo anti-CD20 do tipo II, quando comparados com rituximab**

Foram mantidas células Raji (ATCC-No. CCL-86) no meio de cultura RPMI-1640 (PanBiotech GmbH, Cat.-No. P04-18500) anti-CD20 contendo 10% FCS (Gibco, Cat.-No.10500-064). O anticorpo anti-CD20 do tipo II B-HH6-B-KV1 GE (anticorpo B-Ly1 humanizado, modificado por glicosilação) e rituximab foram marcados utilizando o éster mono Cy5 NHS (Amersham GE Healthcare, Catalogue No. PA15101) de acordo com as instruções do fabricante. O rituximab Cy5-conjugado possuía uma razão de marcação de 2,0 moléculas Cy5 por anticorpo. Cy5-conjugated B-HH6-B-KV1 possuía uma razão de marcação de 2,2 moléculas de Cy5 por anticorpo. Para determinar e comparar as capacidades de ligação de ambos os anticorpos,

foram geradas curvas de ligação (por titulação do Rituximab conjugado-Cy5 e B-HH6-B-KV1 GE Cy5-conjugado) por imunofluorescência directa utilizando a linha celular Raji do linfoma de Burkitt (ATCC-No. CCL-86). As intensidades de fluorescência médias (MFI) foram analisadas como EC50 (50% da intensidade máxima) para Rituximab conjugado-Cy5 e B-HH6-B-KV1 GE Cy5-conjugado, respectivamente. 5×10^5 células por amostra foram coradas durante 30 min a 4°C. Seguidamente, as células foram lavadas em meio de cultura. Coloração com iodeto de propídeo foi utilizada para excluir células mortas. As medições foram efectuadas utilizando FACSArray (Becton Dickinson), iodeto de propídeo (PI) foi medido em Far Red A e Cy5 a Red-A. A Figura 2 apresenta a intensidade de fluorescência média para ligação a EC50 (50% da intensidade máxima) de B-HH6-B-KV1 GE marcado com Cy5 (barra negra) e rituximab (barra branca) marcado com Cy5.

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

Razão entre as capacidades de ligação a CD20 em células Raji (ATCC-No. CCL-86)=

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

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

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

Assim, B-HH6-B-KV1 GE como um anticorpo anti-CD20 do tipo II mostra uma reduzida capacidade de ligação comparada com rituximab.

Exemplo 3

Actividade anti-tumoral do tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) com doxorubicina.

Agentes de Teste:

Foi disponibilizado anticorpo anti-CD20 do tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) (=B-Ly1 humanizado, B-HH6-B-KV1 modificado por glicosilação, ver WO 2005/044859 e WO 2007/031875) como solução mãe (c=9,4 mg/ml) da GlycArt, Schlieren, Suíça. O tampão do anticorpo incluiu histidina, trehalose e polissorbato 20. A solução de anticorpo foi diluída de forma adequada em PBS a partir da solução mãe para as injeções iniciais.

Rituximab foi disponibilizado por Hoffmann La Roche, Basileia. A doxorubicina foi adquirida como uma formulação clínica na Hexal, Holzkirchen, Alemanha. A diluição é ajustada a partir da solução mãe reconstituída.

Linhas celulares e condições de cultura:

Células de linfoma humano folicular RL não-Hodgkin foram gentilmente cedidas pelo Dr. Charles Dumontet, INSERM 590, Lion, França. A linha celular tumoral foi cultivada em rotina em meio RPMI (Laboratórios PAA, Áustria) suplementado com 10% de soro fetal de bovino (Laboratórios PAA, Áustria) e 2 mM de L-glutamina, a 37°C numa atmosfera saturada com água a 5% de CO₂. A transferência 2 foi utilizada para transplantação.

Animais:

Ratinhos fêmea, bege SCID; idade 7-8 semanas à chegada, (adquiridos a Charles River, Sulzfeld, Alemanha) foram mantidos em condições isentas de patógenos específicos com ciclos diários de 12 h de luz/ 12 h de escuridão de acordo

com as directivas seguidas (GV-Solas; Felasa; TierschG). O protocolo do estudo experimental foi revisto e aprovado pelo governo local. Após chegada os animais foram mantidos na parte de quarentena das instalações dos animais durante uma semana para se habituarem ao novo ambiente e para observação. Monitorização contínua da saúde foi realizada numa base regular. Foi disponibilizada ad libitum alimentação de dieta (Provimi Kliba 3337) e água (acidificada pH 2,5-3).

Monitorização:

Os animais foram controlados diariamente no que diz respeito a sintomas clínicos e detecção de efeitos secundários. Para monitorizar durante a experiência o peso corporal dos animais foi documentado duas vezes por semana e o volume do tumor foi medido com um calibrador após faseamento.

Tratamento dos animais:

O tratamento dos animais iniciou-se no dia da aleatorização, 14 dias após transplantação das células. Anticorpo B-HH6-B-KV1 GE humanizado modificado por glicosilação anti-CD20 do tipo II ou rituximab foram administrados como agentes únicos i.v. q7d no dia 14, 21, 28, 36 e 42 do estudo na dosagem indicada 30 mg/kg, ou 60 mg/kg. O veículo correspondente foi administrado nos mesmos dias, assim como doxorubicina que foi administrada i.v. uma vez por semana a 3 mg/kg. Nos grupos de terapia de combinação a doxorubicina foi administrada i.v. uma vez por semana no dia 15, 22, 29, 37 e 43 a 3 mg/kg e rituximab foi administrado i.v. uma vez por semana nos mesmos dias a 30 mg/kg, no grupo de terapia de combinação.

Exemplo 4

Actividade anti-tumoral do tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 do tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) e ciclofosfamida na linha celular RL.

Agentes de Teste:

Foi disponibilizado anticorpo anti-CD20 do tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) (=B-Ly1 humanizado, B-HH6-B-KV1 modificado por glicosilação, ver WO 2005/044859 e WO 2007/031875) como solução mãe (c=9,4 mg/ml) da GlycArt, Schlieren, Suíça. O tampão do anticorpo incluiu histidina, trehalose e polissorbato 20. A solução de anticorpo foi diluída de forma adequada em PBS a partir da solução mãe para as injeções iniciais.

Anticorpo anti-CD20 do tipo I rituximab foi disponibilizado como solução mãe (c=10 mg/ml) por Hoffmann La Roche, Basileia, Suíça. O tampão contém polissorbato 80, cloreto de sódio e citrato de sódio.

Ciclofosfamida foi adquirida como formulação clínica na Baxter Oncology GmbH, Halle, Alemanha, ou medac, Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Hamburgo, Alemanha, respectivamente. A diluição foi ajustada a partir da solução mãe reconstituída.

Linhas celulares e condições de cultura:

A linha celular de linfoma humano folicular RL não-Hodgkin foi cultivada em rotina em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal de bovino e antibióticos. Células RL crescem em suspensão e formam clusters. Células com crescimento exponencial foram injectadas subcutaneamente em ratinhos SCID.

Animais:

Os animais utilizados foram ratinhos SCID fêmea com seis semanas de idade fornecidos pela Charles River (L'Arbresle, França) com estatuto IPSOS. Os animais foram albergados pelo menos uma semana antes da injeção de células RL. As gaiolas continham 5 animais.

Monitorização:

Os animais foram controlados diariamente no que diz respeito a sintomas clínicos e detecção de efeitos secundários. Para monitorizar durante a experiência o peso corporal dos animais foi documentado duas vezes por semana e o volume do tumor foi medido com calibrador após faseamento. Os critérios de exclusão do estudo para os animais foram descritos e aprovados pelo Comité local dos Animais Experimentais.

Tratamento de animais:

O tratamento foi iniciado 31 dias após transplante celular na aleatorização. O anticorpo B-HH6-B-KV1 GE, anti-CD20 do tipo II humanizado, veículo, ou rituximab foram administrados i.v. uma vez por semana a animais numa dosagem de 30 mg/kg, (dia 31, 38, 45 e 52). A Ciclofosfamida foi injectada nos mesmos dias numa dose de 50 mg/kg. Foram preparadas diluições de anticorpo frescas a partir da solução mãe antes de serem utilizadas.

Estudo da inibição do crescimento tumoral *in vivo*:

No dia 66 após a transplantação das células, houve uma inibição do crescimento tumoral significativa de 54%, 85% ou 91% nos animais, aos quais foram administrados as combinações de rituximab e ciclofosfamida, anticorpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE e Rituximab ou anticorpo anti-CD20 B-

HH6-B-KV1 GE e ciclofosfamida. Assim, o tratamento de combinação de anticorpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE e ciclofosfamida deu origem à melhor actividade anti-tumoral comparada com o tratamento com ciclofosfamida isoladamente.

Listagem de Sequências

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Combination therapy of a type II anti-CD20 antibody
 with increased antibody dependent cellular cytotoxicity
 (ADCC)
 <130> 24858
 <150> 08005554.4
 <151> 2008-03-25
 <150> 08007172.3
 <151> 2008-04-11
 <160> 20
 <170> Patent In version 3.2
 <210> 1
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> amino acid sequence of variable region of the heavy
 chain (VH) of murine monoclonal anti-CD20 antibody
 B-Ly1
 <400> 1

Gly	Pro	Gln	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	1	5	10	15
Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Tyr	Ser	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Leu	20	25	30	
Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	35	40	45	
Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	50	55	60	
Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	65	70	75	80
Ser	Val	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Leu	Cys	Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	85	90	95	
Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	100	105	110	

<210> 2

<211> 103
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> amino acid sequence of variable region of the light
 chain (VL) of murine monoclonal anti-CD20 antibody B-Ly1
 <400> 2

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100

<210> 3
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> amino acid sequences of variable region of the heavy
 chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (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

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> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (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>

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (B-HH4)

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (B-HH5)

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (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>

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (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

<210> 9
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> amino acid sequences of variable region of the heavy
 chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (B-HH8)
 <400> 9

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

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

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

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

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

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
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> amino acid sequences of variable region of the heavy
 chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (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

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (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

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (B-HL10)

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (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> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (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> amino acid sequences of variable region of the heavy
 chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (B-HL13)
 <400> 15

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Lys Pro Gly Gly
1                5                10                15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
      20                25                30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
      35                40                45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
      50                55                60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65                70                75                80
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> amino acid sequences of variable region of the heavy
 chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (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

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> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (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> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (B-HL16)

<400> 18

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

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

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

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

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> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (B-HL17)

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> amino acid sequences of variable region of the light
 chain (VL) of humanized B-Ly1 antibody 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

Lisboa, 17 de Agosto de 2016.

Reivindicações

1. Uso de um anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) para o fabrico de um medicamento para o tratamento do cancro que expressa CD20 em combinação com um ou vários agentes terapêuticos seleccionados no grupo constituído por ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina, caracterizado por o dito anticorpo anti-CD20 do tipo II ser um anticorpo B-Ly1 humanizado modificado por glicosilação, em que o anticorpo B-Ly1 humanizado possui uma região variável da cadeia pesada (VH) da SEQ ID No.7 e uma região variável de cadeia leve (VL) da SEQ ID No. 20, e o tratamento com o anticorpo anti-CD20 do tipo II encontra-se combinado

- a) com ciclofosfamida e vincristina, ou
- b) ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o cancro que expressa CD20 ser um linfoma de célula B não-Hodgkin (NHL).

3. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado por ser administrado um corticosteroide adicional.

4. Anticorpo anti-CD20 do tipo II com citotoxicidade celular acrescida dependente de anticorpo (ADCC) destinado a ser utilizado no tratamento de um doente que sofre de cancro que expressa CD20 em combinação com um ou vários agentes quimioterapêuticos seleccionados no grupo constituído por ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina, caracterizado por o dito anticorpo anti-CD20 do tipo II ser um anticorpo B-Ly1 humanizado modificado por glicosilação,

em que o anticorpo B-Ly1 humanizado possui uma região variável da cadeia pesada (VH) da SEQ ID No.7 e uma região variável de cadeia leve (VL) da SEQ ID No. 20, e o tratamento com o anticorpo anti-CD20 do tipo II encontra-se combinado

- a) com ciclofosfamida e vincristina, ou
- b) ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

5. Anticorpo anti-CD20 do tipo II de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o cancro que expressa CD20 ser um linfoma de célula B não-Hodgkin (NHL).

6. Anticorpo anti-CD20 do tipo II de acordo com qualquer uma das reivindicações 4, ou 5, caracterizado por ser administrado um corticosteroide adicional.

Lisboa, 17 de Agosto de 2016.

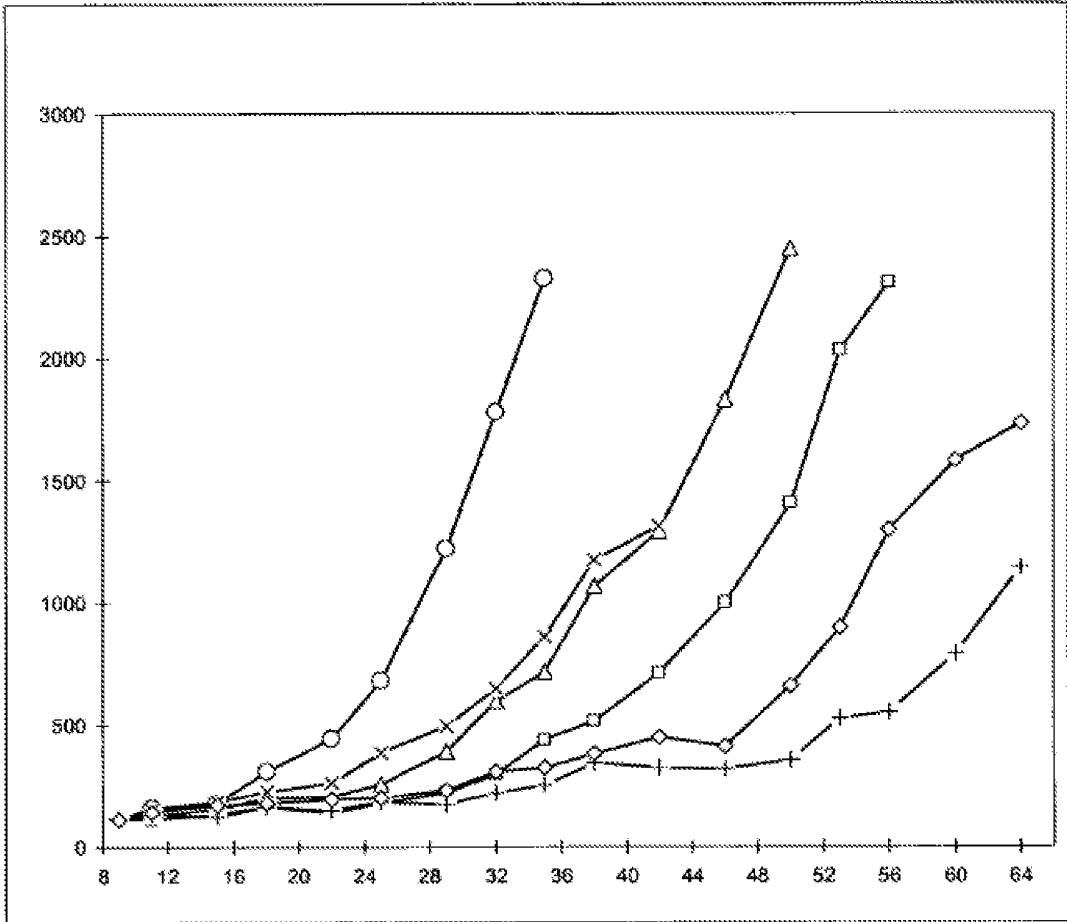


Figura 1

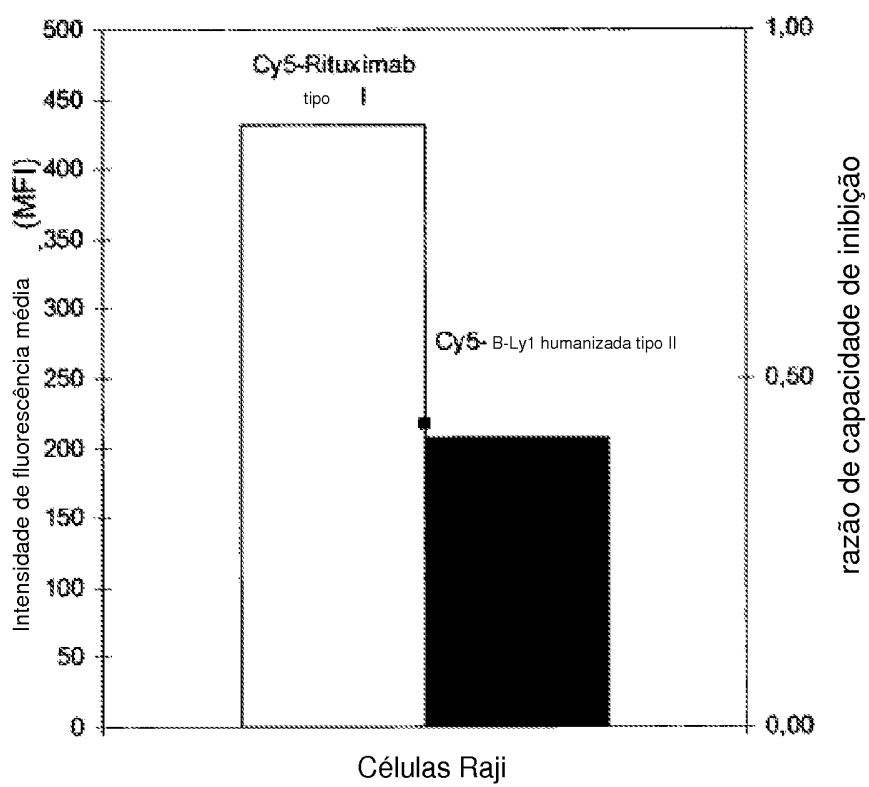


Figura 2

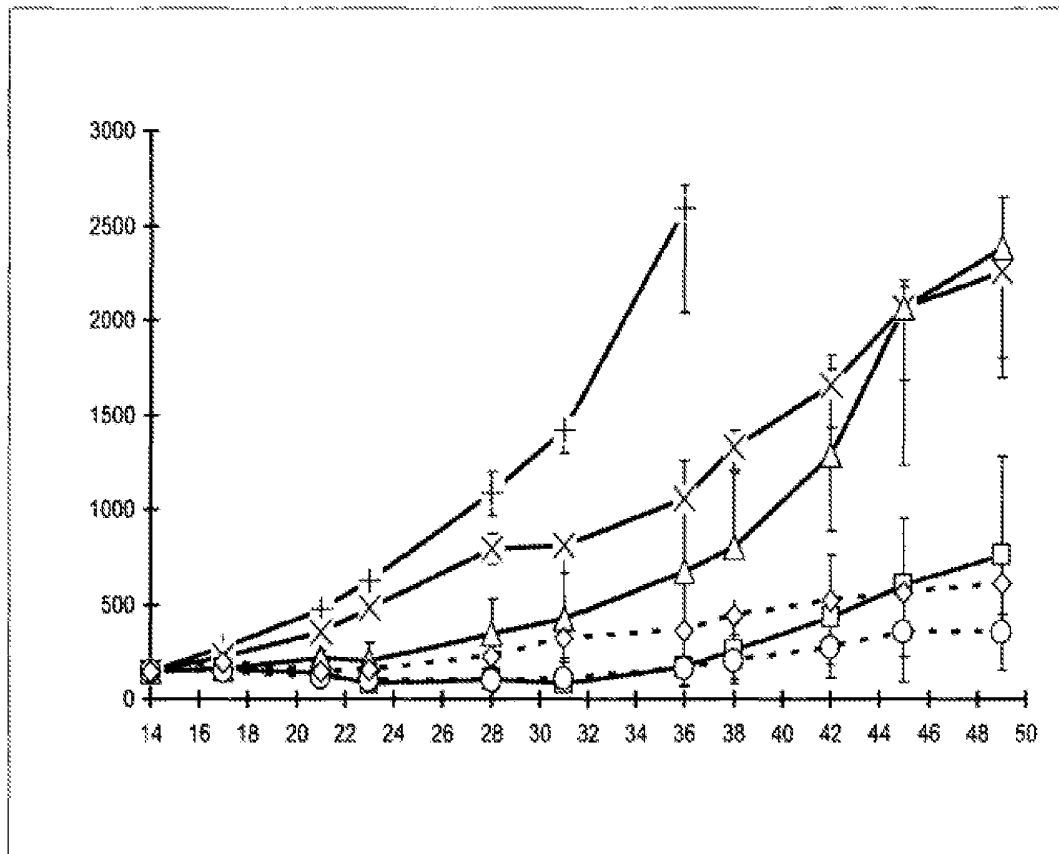


Figura 3

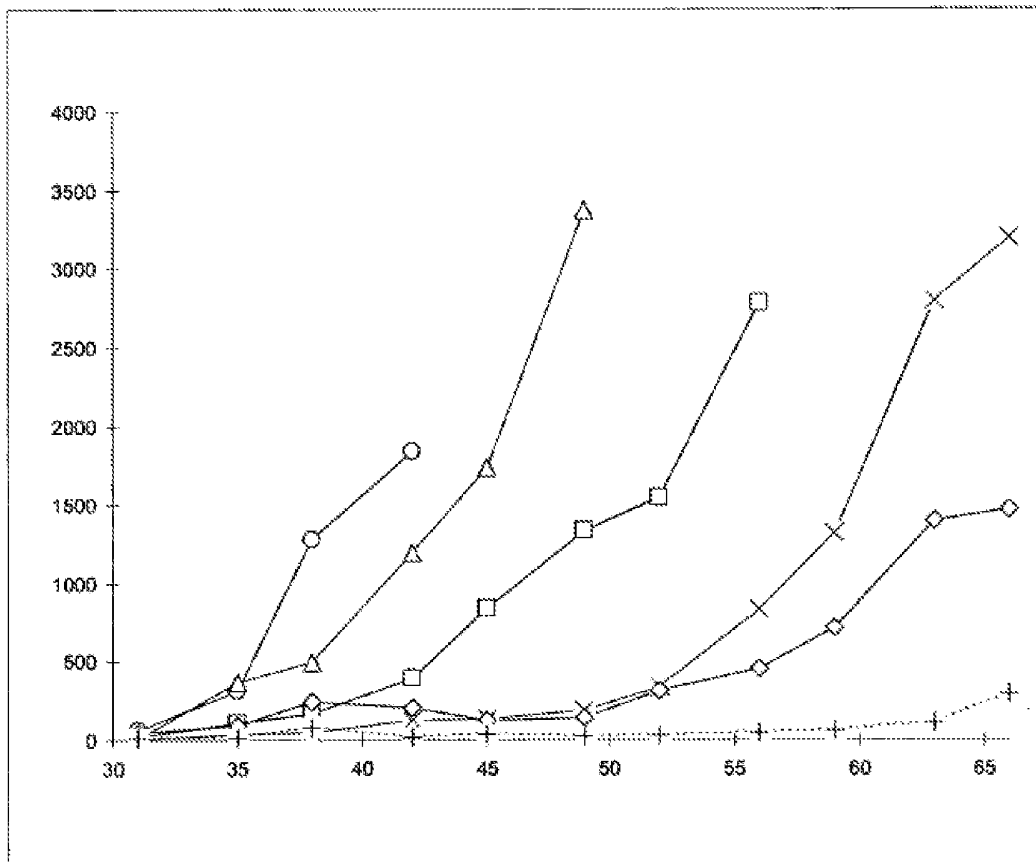


Figura 4