



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0909227-7 B1



(22) Data do Depósito: 23/03/2009

(45) Data de Concessão: 24/11/2020

(54) Título: USO DE UM ANTICORPO B-LY1 HUMANIZADO E UM OU MAIS AGENTES QUIMIOTERÁPICOS SELECIONADOS DO GRUPO CONSISTINDO EM CICLOFOSFAMIDA, VINCRISTINA E DOXORUBICINA PARA A FABRICAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO DE UM LINFOMA NÃO HODGKIN DE CÉLULAS B (NHL)

(51) Int.Cl.: A61K 39/395; C07K 16/28; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 11/04/2008 EP 08 007172.3; 25/03/2008 EP 08 005554.4.

(73) Titular(es): ROCHE GLYCART AG.

(72) Inventor(es): CHARLES DUMONTET; THOMAS FRIESS; FRANK HERTING; CHRISTIAN KLEIN; PABLO UMANA.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009002111 de 23/03/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/118142 de 01/10/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/09/2010

(57) Resumo: USO DE UM ANTICORPO ANTI-CD20 TIPO II COM AUMENTADA CITOTOXICIDADE CELULAR DEPENDENTE DE ANTICORPO (ADCC) EM COMBINAÇÃO COM CICLOFOSFAMIDA, VINCRISTINA E DOXORUBICINA PARA TRATAR LINFOMAS NÃO HODGKIN. A presente invenção refere-se ao uso de um anticorpo anti CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer especialmente de cânceres expressando CD20 em combinação com um ou mais agentes quimioterápicos selecionados do grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "USO DE UM ANTICORPO B-LY1 HUMANIZADO E UM OU MAIS AGENTES QUIMIOTERÁPICOS SELECIONADOS DO GRUPO CONSISTINDO EM CICLOFOSFAMIDA, VINCRISTINA E DOXORUBICINA PARA A FABRICAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO DE UM LINFOMA NÃO HODGKIN DE CÉLULAS B (NHL)".

[0001] A presente invenção refere-se ao uso de um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer, especialmente de cânceres expressando CD20 em combinação com um agente quimioterápico selecionado entre o grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

Antecedentes da Invenção

[0002] A molécula de CD20 (também denominado antígeno de diferenciação restrita a linfócito B humano ou Bp35) é uma proteína de transmembrana hidrofóbica com um peso molecular de cerca de 35 kD localizada sobre linfócitos pré-B e B maduros (Valentine, M.A., *et al.*, J. Biol. Chem. 264(19) (1989) 11282-11287; e Einfield, D.A., *et al.*, EMBO J. 7(3) (1988) 711-717). CD20 é encontrado sobre a superfície de mais de 90% das células B do sangue periférico ou órgãos linfoides e é expressa durante o desenvolvimento precoce de células pré-B e permanece até a diferenciação celular plasmática. CD20 está presente tanto sobre células B normais como sobre células B malignas. Em particular, CD20 é expresso em mais de 90% dos linfomas não Hodgkin de células B (NHL) (Anderson, K.C., *et al.*, Blood 63(6) (1984) 1424-1433)) mas não é encontrado em células-tronco hematopoiéticas, células pró-B, células plasmáticas normais, ou outros tecidos normais (Tedder, T.F., *et al.*, J. Immunol. 135(2) (1985) 973-979).

[0003] A região de terminal carboxila de 85 aminoácidos da proteína CD20 está localizada dentro do citoplasma. A extensão desta região

contrasta com a de outras estruturas superficiais específicas de células B tais como cadeias pesadas de IgM, IgD, e IgG ou antígenos de histocompatibilidade classe I1 cadeias α ou β , as quais têm regiões intracitoplasmáticas relativamente curtas de 3, 3, 28, 15, e 16 aminoácidos, respectivamente (Komaromy, M., *et al.*, NAR 11 (1983) 6775-6785). Dos últimos 61 aminoácidos de terminal carboxila, 21 são resíduos acidíferos, ao passo que somente 2 são básicos, indicam que esta região tem uma forte carga negativa pura. O Nº do Acesso do GenBank é NP-690605. Imagina-se que CD20 pode estar envolvida na regulação de uma ou mais etapas precoces no processo de ativação e diferenciação de células B (Tedder, T.F., *et al.*, Eur. J. Immunol. 16 (1986) 881-887) e pode funcionar como um canal de íons cálcio (Tedder, T.F., *et al.*, J. Cell. Biochem. 14D (1990) 195).

[0004] Existem dois tipos diferentes de anticorpos anti-CD20 diferindo significativamente em seu modo das atividades de ligação de CD20 e biológicas (Cragg, M.S., *et al.*, Blood 103 (2004) 2738-2743; e Cragg, M.S., *et al.*, Blood, 101 (2003) 1045-1052). Anticorpos tipo I, como, por exemplo, rituximab, são potentes em citotoxicidade mediada pelo complemento, ao passo que anticorpos tipo II, como, por exemplo, Tositumomab (B1), 11B8, AT80 ou anticorpos B-Ly1 humanizados, iniciam de modo eficaz a morte de células-alvo através de apoptose independente de caspase com exposição à fosfatidilserina concomitante.

[0005] As características comuns partilhadas de anticorpos anti-CD20 tipo I e tipo II estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1:

Propriedades de anticorpos anti-CD20 tipo I e tipo II

anticorpos anti-CD20 tipo I	anticorpos anti-CD20 tipo II
epítotope de CD20 tipo I	epítotope de CD20 tipo II

Localizam CD20 para rafts lipídicos	Não localizam CD20 para <i>rafts</i> lipídicos
CDC aumentada (caso isotipo IgG1)	CDC reduzida (caso isotipo IgG1)
Atividade de ADCC (caso isotipo IgG1)	Atividade de ADCC (caso isotipo IgG1)
Capacidade de ligação plena	Capacidade de ligação reduzida
Agregação homotípica	Agregação homotípica mais forte
Indução de apoptose na reticulação	Forte indução de morte celular sem reticulação

Sumário da Invenção

[0006] A invenção compreende o uso de um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer expressando CD20 em combinação com um ou mais agentes quimioterápicos selecionados entre o grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

[0007] A invenção compreende adicionalmente o uso de um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um paciente sofrendo de um câncer expressando CD20 em combinação com um ou mais agentes quimioterápicos selecionados entre o grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

[0008] A invenção compreende adicionalmente um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) para o tratamento de câncer expressando CD20 em combinação com um ou mais agentes quimioterápicos selecionados do grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

[0009] A invenção compreende adicionalmente um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) para o tratamento de um paciente sofrendo de um câncer expressando CD20 em combinação com um ou mais agentes

quimioterápicos selecionados do grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

[00010] Preferencialmente o tratamento com o anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) é em combinação com ciclofosfamida e vincristina.

[00011] Uma composição farmacêutica compreendendo tanto um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) quanto um ou mais agentes quimioterápicos selecionados entre o grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina para uso em câncer expressando CD20, em particular em linfomas Não Hodgkin de Células B (NHL).

[00012] Preferencialmente o referido anticorpo anti-CD20 tipo II é um anticorpo B-Ly1 humanizado, glicomanipulado.

Descrição Detalhada da Invenção

[00013] O termo "anticorpo" engloba as várias formas de anticorpos, inclusive mas não sendo limitados a, anticorpos totais, anticorpos humanos, anticorpos humanizados e anticorpos manipulados geneticamente como anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos ou anticorpos recombinantes bem como fragmentos de anticorpos similares na medida que sejam retidas as propriedades características de acordo com a invenção. Os termos " anticorpo monoclonal " ou "composição de anticorpos monoclonais" conforme usado aqui, neste requerimento de patente, referem-se a uma preparação de moléculas de anticorpo de uma única composição de aminoácidos. Por conseguinte, o termo "anticorpo monoclonal humano" refere-se a anticorpos apresentando uma única especificidade de ligação os quais têm regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Em uma modalidade, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma o qual inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico, por exemplo, um

camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve humana fundido a uma célula imortalizada.

[00014] Preferencialmente o referido anticorpo anti-CD20 tipo II é um anticorpo monoclonal.

[00015] O termo "anticorpo quimérico" refere-se a um anticorpo monoclonal compreendendo uma região variável, isto é, região de ligação, de uma fonte ou espécie e no mínimo uma porção de uma região constante derivada de uma fonte ou espécie diferente, geralmente preparada por técnicas de DNA recombinante. Anticorpos quiméricos compreendendo uma região variável murina e uma região constante humana são especialmente preferenciais. Os anticorpos quiméricos murinos / humanos são o produto de genes de imunoglobulina expressos compreendendo segmentos de DNA codificando regiões variáveis de imunoglobulina murina e segmentos de DNA codificando regiões constantes de imunoglobulina humana. Outras formas de "anticorpos quiméricos" englobadas pela presente invenção são aquelas nas quais a classe ou subclasse foi modificada ou alterada a partir daquela do anticorpo original. Tais anticorpos "quiméricos" referidos também são referidos como "anticorpos de classes ligadas" ("*switched class*"). Métodos para produzir anticorpos quiméricos envolvem técnicas de DNA recombinante convencional e de transfecção genética de conhecimento geral atualmente na técnica. Vide, por exemplo, Morrison, S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; patente dos Estados Unidos No. US 5.202.238 e patente Nº US 5.204.244.

[00016] O termo "anticorpo humanizado" refere-se a anticorpos nos quais as regiões de estrutura ou "regiões determinantes de complementaridade" (CDR) foram modificadas para compreender a CDR de uma imunoglobulina de especificidade diferente em comparação com a da imunoglobulina de origem. Em uma modalidade preferencial, uma CDR

murina é enxertada dentro da região de estrutura de um anticorpo humano para preparar o "anticorpo humanizado." Vide, por exemplo, Riechmann, L., *et al.*, Nature 332 (1988) 323-327; e Neuberger, M.S., *et al.*, Nature 314 (1985) 268-270. CDRs particularmente preferenciais correspondem àquelas representando sequências reconhecendo os antígenos mencionados acima para anticorpos quiméricos e bifuncionais.

[00017] O termo "anticorpo humano", conforme usado aqui, neste requerimento de patente, pretende incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Anticorpos humanos são de conhecimento geral no estado da técnica (van Dijk, M.A., e van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem Biol 5 (2001) 368-374). Com base em semelhante tecnologia, podem ser produzidos anticorpos humanos contra uma grande variedade de alvos. Exemplos de anticorpos humanos são, por exemplo, descritos em Kellermann, S. A., *et al.*, Curr Opin Biotechnol. 13 (2002) 593-597.

[00018] O termo "anticorpo humano recombinante", conforme usado aqui, neste requerimento de patente, pretende incluir todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como anticorpos isolados de uma célula hospedeira tal como uma célula NS0 ou CHO ou de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico para genes de imunoglobulina humana ou anticorpos expressos usando um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira. Os anticorpos humanos recombinantes referidos têm regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana em uma forma rearranjada. Os anticorpos humanos recombinantes de acordo com a invenção foram submetidos à hipermutação somática *in vivo*. Deste modo, as sequências de

aminoácidos das regiões VH e VL dos anticorpos recombinantes são sequências que, apesar de derivadas de e relacionadas com sequências de VH e VL da linhagem germinativa humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório de anticorpos humanos da linhagem germinativa *in vivo*.

[00019] Conforme usado aqui, neste requerimento de patente, "ligando especificamente" ou "liga especificamente a" refere-se a um anticorpo ligando especificamente ao antígeno CD20. Preferencialmente a afinidade de ligação é de valor de KD de 10^{-9} mol/l ou inferior (por exemplo, 10^{-10} mol/l), preferencialmente com um valor de KD de 10^{-10} mol/l ou inferior (por exemplo, 10^{-12} mol/l). A afinidade de ligação é determinada com um teste-padrão de ligação, tal como análise de mapa de Scatchard sobre células expressando CD20.

[00020] O termo "molécula de ácido nucleico", conforme usado aqui, neste requerimento de patente, pretende incluir moléculas de DNA e moléculas de RNA. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de fita única ou de fita dupla, mas preferencialmente é DNA de fita dupla.

[00021] Os "domínios constantes" não estão envolvidos diretamente na ligação do anticorpo a um antígeno mas estão envolvidos nas funções efectoras (ADCC, ligação de complemento, e CDC).

[00022] A "região variável" (região variável de uma cadeia leve (VL), região variável de uma cadeia pesada (VH)) conforme usado aqui, neste requerimento de patente, denota cada uma do par de cadeias leve e pesada a qual está envolvida diretamente na ligação do anticorpo ao antígeno. Os domínios de cadeias variáveis humanas leve e pesada têm a mesma estrutura geral e cada domínio compreende quatro regiões de estrutura (FR) cujas sequências são amplamente conservadas, conectadas por três "regiões hipervariáveis" (ou regiões determinantes de complementaridade, CDRs). As regiões de estrutura adotam uma conformação de b-sheet e as CDRs podem formar loops conectando a

estrutura b-sheet. As CDRs em cada cadeia são mantidas em sua estrutura tridimensional pelas regiões de estrutura e formam junto com as CDRs da outra cadeia o sítio de ligação antigênica. As regiões CDR3 de cadeia pesada e leve de anticorpo desempenham um papel particularmente importante na especificidade / afinidade de ligação dos anticorpos de acordo com a invenção e portanto proporcionam um objeto adicional da invenção.

[00023] O termo "região hipervariável" ou "porção de ligação antigênica de um anticorpo" quando usado aqui, neste requerimento de patente, refere-se aos resíduos aminoácidos de um anticorpo os quais são responsáveis por ligação de antígeno. A região hipervariável compreende resíduos aminoácidos das "regiões determinantes de complementaridade" ou "CDRs". Regiões de "estrutura" ou "FR" são as regiões de domínio variável diferentes dos resíduos de região hipervariável conforme definido aqui, neste requerimento de patente. Portanto, as cadeias leve e pesada de um anticorpo compreendem dos termos N- ao C- domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, e FR4. Especialmente, CDR3 da cadeia pesada é a região a qual contribui mais para a ligação antigênica. Regiões de 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)) e/ou os resíduos de um "loop hipervariável".

[00024] Os termos "CD20" e "antígeno CD20" são usados de modo intercambiável aqui, neste requerimento de patente, e incluem quaisquer variantes, isoformas e homólogos de espécies de CD20 humana as quais são naturalmente expressas por células ou são expressas sobre células transfectadas com o gene de CD20. A ligação de um anticorpo da invenção ao antígeno CD20 media a destruição de células expressando CD20 (por exemplo, uma célula tumoral) por

inativação de CD20. A destruição das células expressando CD20 pode ocorrer por um ou mais dos mecanismos seguintes: indução de morte celular / apoptose, ADCC e CDC.

[00025] Sinônimos de CD20, conforme reconhecido na técnica, incluem antígeno CD20 de linfócitos B, antígeno de superfície de linfócitos B B1, Leu-16, Bp35, BM5, e LF5.

[00026] O termo "anticorpo anti-CD20" de acordo com a invenção é um anticorpo que liga especificamente a antígeno CD20. Dependendo das propriedades de ligação e das atividades biológicas de anticorpos anti-CD20 para o antígeno CD20, dois tipos de anticorpos anti-CD20 (anticorpos anti-CD20 tipo I e tipo II) podem ser diferenciados de acordo com Cragg, M.S., *et al.*, Blood 103 (2004) 2738-2743; e Cragg, M.S., *et al.*, Blood 101 (2003) 1045-1052, vide a tabela 2.

Tabela 2:

Propriedades de anticorpos anti-CD20 tipo I e tipo II

anticorpos anti-CD20 tipo I	anticorpos anti-CD20 tipo II
epítotope de CD20 tipo I	epítotope de CD20 tipo II
Localizam CD20 para rafts lipídicos	Não localizam CD20 para rafts lipídicos
CDC Aumentada (caso isotipo IgG1)	CDC Reduzida (caso isotipo IgG1)
Atividade de ADCC (caso isotipo IgG1)	Atividade de ADCC (caso isotipo IgG1)
Capacidade de ligação plena	Capacidade de ligação reduzida
Agregação homotípica	Agregação homotípica mais forte
Indução de apoptose na reticulação	Forte indução de morte celular sem reticulação

[00027] Uma propriedade essencial de anticorpo anti-CD20 tipo I e tipo II é seu modo de ligação. Deste modo, anticorpos anti-CD20 tipo I e tipo II podem ser classificados pela proporção das capacidades de ligação a CD20 sobre células Raji (ATCC No. CCL-86) do referido

anticorpo anti-CD20 em comparação com rituximab.

[00028] Os anticorpos anti-CD20 tipo II têm uma proporção das capacidades de ligação a CD20 sobre células Raji (ATCC N° CCL-86) do referido anticorpo anti-CD20 em comparação 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 similares anti-CD20 tipo II incluem, por exemplo, tositumomab (B1 IgG2a), anticorpo B-Ly1 humanizado IgG1 (um anticorpo IgG1 humanizado quimérico conforme descrito na patente internacional N° WO 2005/044859), 11B8 IgG1 (conforme descrito na patente internacional N° WO 2004/035607), e AT80 IgG1. Preferencialmente o referido anticorpo anti-CD20 tipo II é um anticorpo monoclonal que liga ao mesmo epítopo que anticorpo B-Ly1 humanizado (conforme descrito na patente internacional N° WO 2005/044859).

[00029] Anticorpos anti-CD20 tipo I em contraste com os anticorpos tipo II têm uma proporção das capacidades de ligação a CD20 sobre células Raji (ATCC N° CCL-86) do referido anticorpo anti-CD20 em comparação com rituximab de 0,8 a 1,2, preferencialmente de 0,9 a 1,1. Exemplos de similares anticorpos anti-CD20 tipo I incluem, por exemplo, rituximab, 1F5 IgG2a (ECACC, hibridoma; Press, O.W., *et al.*, Blood 69/2 (1987) 584-591), HI47 IgG3 (ECACC, hibridoma), 2C6 IgG1 (conforme descrito na patente internacional N° WO 2005/103081), 2F2 IgG1 (conforme descrito na patente internacional N° WO 2004/035607 e na patente internacional N° WO 2005/103081) e 2H7 IgG1 (conforme descrito na patente internacional N° WO 2004/056312).

[00030] A "proporção das capacidades de ligação a CD20 sobre células Raji (ATCC N° CCL-86) de alguns anticorpos anti-CD20 em comparação com rituximab" é determinada por medição da imunofluorescência direta (são medidas as intensidades de fluorescência média (MFI)) usando o referido anticorpo anti-CD20 conjugado

com Cy5 e rituximab conjugado com Cy5 em um FACSArray (Becton Dickinson) com células Raji (ATCC No. CCL-86), conforme descrito no exemplo N° 2, e calculada como se segue:

[00031] A proporção das capacidades de ligação a CD20 sobre células Raji (ATCC N° CCL-86) =

MIF(Cy5-anticorpo anti-CD20) x proporção de marcação de Cy5(Cy5-rituximab)

MIF(Cy5-rituximab) proporção de marcação de Cy5(Cy5- anticorpo anti-CD20)

[00032] MFI é a intensidade fluorescente média. A "proporção de marcação Cy5" conforme usado aqui, neste requerimento de patente, significa o número de moléculas de marcação de Cy5 por molécula de anticorpo.

[00033] Tipicamente o referido anticorpo anti-CD20 tipo II tem uma proporção das capacidades de ligação a CD20 sobre células Raji (ATCC N° CCL-86) do referido segundo anticorpo anti-CD20 em comparação com rituximab de 0,3 a 0,6, preferencialmente de 0,35 a 0,55, mais preferencialmente de 0,4 a 0,5.

[00034] O referido anticorpo anti-CD20 tipo II de acordo com a invenção tem aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC).

[00035] Por "anticorpo tendo aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC)" ou "anticorpo com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC)" se indica um anticorpo, conforme este termo é definido aqui, neste requerimento de patente, tendo aumentada ADCC conforme determinado por qualquer método adequado conhecido daqueles versados na técnica. Um teste ADCC *in vitro* aceito é como se segue:

1) o teste usa células-alvo que se sabe que expressam o antígeno-alvo reconhecido pela região de ligação antigênica do

anticorpo;

2) o teste usa células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs), isoladas do sangue de um doador saudável escolhido aleatoriamente, como células efetoras;

3) o teste é realizado de acordo com o seguinte protocolo:

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

ii) as células-alvo são cultivadas por métodos de cultura de tecido de rotina, colhidas da fase de crescimento exponencial com uma viabilidade maior do que 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 ressuspensas em meio de cultura celular a uma densidade de 10^5 células/ml;

iii) 100 microlitros da suspensão de células-alvo final acima são transferidos para cada poço de uma lâmina de microtítulo de 96 poços;

iv) o anticorpo é diluído serialmente de 4000 ng/ml a 0,04 ng/ml em meio de cultura celular e 50 microlitros das soluções de anticorpos resultantes são adicionados às células-alvo na lâmina de microtítulo de 96 poços, testando em triplicata várias concentrações de anticorpo cobrindo toda a faixa de concentração acima;

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

vi) para os controles de liberação espontânea (SR), 3 poços adicionais na lâmina contendo as células-alvo marcadas, recebem 50 microlitros de meio de cultura celular RPMI em vez da solução de

anticorpo (ponto iv acima);

vii) a lâmina de microtítulo de 96 poços é em seguida centrifugada a 50 x g por 1 minuto e incubada por 1 hora a 4°C;

viii) 50 microlitros da suspensão de PBMC (ponto i acima) são adicionados a cada poço para produzir uma proporção de células efectoras : alvo de 25: 1 e as lâminas são colocadas dentro de uma incubadora sob atmosfera de CO₂ a 5% a 37° C por 4 horas;

ix) o sobrenadante livre de células de cada poço é colhido e a radioatividade liberada experimentalmente (ER) é quantificada usando um contador gama;

x) a percentagem de lise específica é calculada para cada concentração de anticorpo de acordo com a fórmula $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, onde ER é a radioatividade média quantificada (vide o ponto ix acima) para aquela concentração de anticorpo, MR é a radioatividade média quantificada (vide o ponto ix acima) para os controles de MR (vide o ponto V acima), e SR é a radioatividade média quantificada (vide o ponto ix acima) para os controles de SR (vide o ponto vi acima);

4) " ADCC aumentada " é definida como ou um aumento na percentagem máxima de lise específica observada dentro da faixa de concentração de anticorpo testada acima, e/ou uma redução na concentração de anticorpo requerida para obter metade da percentagem máxima de lise específica observada dentro da faixa de concentração de anticorpo testada acima. O aumento na ADCC é relativo para a ADCC, medido com o teste acima, mediado pelo mesmo anticorpo, produzido pelo mesmo tipo de células hospedeiras, usando os mesmos métodos de produção, purificação, formulação e armazenamento de rotina, os quais são conhecidos por aqueles versados na técnica, mas que não foram produzidos pelas células hospedeiras manipuladas para superexpressar GnTIII.

[00036] A referida " ADCC aumentada " pode ser obtida por

glicoengenharia dos referidos anticorpos, isto é, reforçando as referidas funções efetoras mediadas por células, naturais, de anticorpos monoclonais por manipulação de seu componente oligossacarídico conforme descrito em Umana, P., *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 e na Patente dos Estados Unidos N°US 6.602.684.

[00037] O termo "citotoxicidade dependente do complemento (CDC)" refere-se à lise de células-alvo tumorais humanas pelo anticorpo de acordo com a invenção na presença de complemento. A CDC é medida preferencialmente pelo tratamento de uma preparação de células expressando CD20 com um anticorpo anti-CD20 de acordo com a invenção na presença de complemento. É encontrada citotoxicidade dependente do complemento se o anticorpo induzir em uma concentração de 100 nM à lise (morte celular) de 20% ou mais das células tumorais depois de 4 horas. O teste é realizado preferencialmente com células tumorais marcadas com ^{51}Cr ou Eu e medição do ^{51}Cr ou Eu liberado. Os controles incluem a incubação das células-alvo tumorais com complemento mas sem o anticorpo.

[00038] Tipicamente anticorpos anti-CD20 tipo II do isotipo IgG1 apresentam propriedades de citotoxicidade dependente do complemento características. Anticorpos anti-CD20 tipo II têm uma citotoxicidade dependente do complemento reduzida (caso isotipo IgG1) em comparação com anticorpos tipo I do isotipo IgG1. Preferencialmente anticorpos anti-CD20 tipo II são anticorpos do isotipo IgG1.

[00039] O anticorpo "rituximab" (anticorpo de referência; exemplo de um anticorpo anti-CD20 tipo I) é um domínio constante murino gama 1 humano quimérico produzido geneticamente contendo anticorpo monoclonal direcionado contra o antígeno CD20 humano. Este anticorpo quimérico contém constantes domínios gama 1 humanos e é identificado pelo nome "C2B8" na patente dos Estados Unidos N° US 5.736.137 (Anderson, K.C., *et al.*) emitida em 17 de abril de 1998,

atribuída à IDEC Pharmaceuticals Corporation. Rituximab é aprovado para o tratamento de pacientes com linfoma não Hodgkin de células B, CD20 positivo, de baixo grau ou folicular recidivante ou refratário. Estudos do mecanismo de ação *in vitro* mostram que o rituximab apresenta citotoxicidade dependente do complemento humano (CDC) (Reff, M.E., *et al.*, Blood 83(2) (1994) 435-445). Adicionalmente, ele apresenta significativa atividade em testes que medem a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC).

[00040] O termo "anticorpo B-Ly1 humanizado" refere-se a anticorpo B-Ly1 humanizado conforme descrito na patente internacional N° WO 2005/044859 e na patente internacional N° WO 2007/031875, as quais foram obtidas a partir do anticorpo anti-CD20 B-Ly1 monoclonal murino (região variável da cadeia pesada murina (VH): SEQ ID NO: 1; região variável da cadeia leve murina (VL): SEQ ID NO: 2- vide Poppema, S. e Visser, L., Biotest Bulletin 3 (1987) 131-139;) por quimerização com um domínio constante humano de IgG1 e depois de humanização (vide a patente internacional N° WO 2005/044859 e a patente internacional N° WO 2007/031875). Estes "anticorpos B-Ly1 humanizados" são descritos em detalhes na patente internacional N° WO 2005/ 044859 e na patente internacional N° WO 2007/031875.

[00041] Preferencialmente o "anticorpo B-Ly1 humanizado" tem região variável da cadeia pesada (VH) selecionada entre o grupo de SEQ ID No. 3 a SEQ ID No. 20 (B-HH2 a B-HH9 e B-HL8 a B-HL17 da patente internacional N° WO 2005/044859 e da patente internacional N° WO 2007/031875). Especialmente preferenciais são Seq. ID No. 3, 4, 7, 9, 11, 13 e 15 (B-HH2, BHH-3, B-HH6, B-HH8, B-HL8, B-HL11 e B-HL13 da patente internacional N° WO 2005/044859 e da patente internacional N° WO 2007/031875). Preferencialmente o "anticorpo B-Ly1 humanizado" tem região variável da cadeia leve (VL) de SEQ ID N° 20 (B-KV1 da patente internacional N°. WO 2005/044859 e da patente internacional N°

WO 2007/031875). Além disso o anticorpo B-Ly1 humanizado é preferencialmente um anticorpo IgG1. Os anticorpos B-Ly1 humanizados referidos de acordo com a invenção são glicoproduzidos (GE) na região Fc de acordo com os procedimentos descritos na patente internacional N° WO 2005/044859, na patente internacional N°. WO 2004/065540, na patente internacional N° WO 2007/031875, Umana, P., *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 e na patente internacional N° WO 99/154342. Os "anticorpos B-Ly1 humanizados, glicoproduzidos" referidos têm um padrão de glicosilação alterado na região Fc, preferencialmente tendo um nível reduzido de resíduos de fucose. Preferencialmente no mínimo 40% ou mais (em uma modalidade entre 40% e 60%, em outra modalidade no mínimo 50%, e em ainda outra modalidade no mínimo 70% ou mais) dos oligossacarídeos da região Fc são não fucosilados. Além disso os oligossacarídeos da região Fc são preferencialmente bisseccionados.

[00042] O componente oligossacarídico pode afetar significativamente propriedades relevantes para a eficácia de uma glicoproteína terapêutica, inclusive estabilidade física, resistência a ataque por protease, interações com o sistema imune, farmacocinética, e atividade biológica específica. As propriedades referidas podem depender não somente da presença ou ausência, mas também das estruturas específicas, de oligossacarídeos. Podem ser feitas algumas generalizações entre estrutura do oligossacarídeo e função da glicoproteína. Por exemplo, algumas estruturas de oligossacarídeos mediam rápida liberação da glicoproteína da corrente sanguínea através de interações com proteínas de ligação de carboidrato específicas, ao passo que outras podem ser ligadas por anticorpos e dar origem a reações imunes indesejadas. (Jenkins, N., *et al.*, Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-81).

[00043] Células de mamíferos são os hospedeiros preferenciais para produção de glicoproteínas terapêuticas, devido à sua capacidade para

glicosilar proteínas na forma mais compatível para uso humano. (Cumming, D.A., *et al.*, *Glycobiology* 1 (1991) 115-30; Jenkins, N., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-81). Bactérias muito raramente glicosilam proteínas, e como outros tipos de hospedeiros comuns, tais como leveduras, fungos filamentosos, células de inseto e de plantas, produzem padrões de glicosilação associados com rápida liberação da corrente sanguínea, interações imunes indesejáveis, e em alguns casos específicos, atividade biológica reduzida. Entre as células de mamíferos, células de ovário de hamster chinês (CHO) têm sido mais comumente usadas durante as últimas duas décadas. Além de proporcionar padrões de glicosilação adequados, estas células permitem produção consistente de linhagens de células clonais altamente produtivas, geneticamente estáveis. Elas podem ser cultivadas até densidades elevadas em simples biorreatores usando meios livres de soro, e permitem o desenvolvimento de bioprocessos seguros e reprodutíveis. Outras células animais comumente usadas incluem células renais de hamster bebê (BHK), células de mieloma de camundongo NSO e SP2/0. Mais recentemente, também foi testada a produção de animais transgênicos. (Jenkins, N., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-981).

[00044] Todos os anticorpos contêm estruturas de carboidratos em posições conservadas nas regiões constantes de cadeia pesada, com cada isotipo possuindo um arranjo distinto de estruturas de carboidratos N-encadeadas, as quais afetam de modo variável a montagem, secreção ou atividade funcional de proteína. (Wright, A., e Monison, S. L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). A estrutura do carboidrato anexo N-ligado varia consideravelmente, dependendo do grau de processamento, e pode incluir manose elevada, multiplamente ramificada bem como oligossacarídeos complexos biantenários. (Wright, A., e Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). Tipicamente, há processamento

heterogêneo das estruturas de oligossacarídeos de núcleo anexas em um sítio de glicosilação particular de tal modo que mesmo anticorpos monoclonais existem como múltiplas glicoformas. Do mesmo modo, foi demonstrado que ocorrem diferenças maiores na glicosilação de anticorpo entre linhagens celulares, e mesmo diferenças menores são vistas para uma dada linhagem celular cultivada sob diferentes condições de cultura. (Lifely, M. R., *et al.*, *Glycobiology* 5(8) (1995) 813-22).

[00045] Um modo de obter grandes aumentos na potência, enquanto mantendo um simples processo de produção e potencialmente evitando efeitos colaterais significativos e indesejáveis, é reforçar as funções efetoras mediadas por células, naturais, de anticorpos monoclonais por manipulação de seu componente oligossacarídico conforme descrito em Umana, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 e na patente dos Estados Unidos Nº US 6.602.684. Anticorpos do tipo IgG1, os anticorpos mais comumente usados em imunoterapia de câncer, são glicoproteínas que têm um sítio de glicosilação N-ligado conservado em Asn297 em cada domínio CH2. Os dois oligossacarídeos complexos biantenários anexados a Asn297 são enterrados entre os domínios de CH2, formando contatos extensivos com a espinha dorsal de polipeptídeo, e sua presença é essencial para o anticorpo mediar funções efetoras tais como citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (Lifely, M. R., *et al.*, *Glycobiology* 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., *et al.*, *Immunol. Rev.* 163 (1998) 59-76; Wright, A. e Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 26-32).

[00046] Foi demonstrado previamente que a superexpressão em células de ovário de hamster chinês (CHO) de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferase I11 ("GnTII17y), uma glicosiltransferase catalisando a formação de oligossacarídeos bisseccionados, aumenta significativamente a atividade de ADCC *in vitro* de um anticorpo monoclonal

quimérico antineuroblastoma (chCE7) produzido pelas células CHO manipuladas. (Vide Umana, P., *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; e a patente internacional N° WO 99/154342, cujos conteúdos inteiros são por este incorporados por meio de referência). O anticorpo chCE7 pertence a uma grande classe de anticorpos monoclonais não conjugados os quais têm alta afinidade e especificidade tumoral, mas têm também muito pouca potência para serem clinicamente úteis quando produzidos em linhagens celulares industriais de rotina carecendo da enzima GnTIII (Umana, P., *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180). Este estudo foi o primeiro a mostrar que grandes aumentos da atividade de ADCC podem ser obtidos por manipulação das células produtoras de anticorpo para expressar GnTIII, as quais também levam a um aumento na proporção de oligossacarídeos bisseccionados, associados à região constante (Fc), incluindo oligossacarídeos não fucosilados, bisseccionados, acima dos níveis encontrados em anticorpos que ocorrem naturalmente.

[00047] O termo "expressão do antígeno CD20" pretende indicar um nível de expressão significativo do antígeno CD20 em uma célula, preferencialmente sobre a superfície celular de uma célula T ou B, mais preferencialmente uma célula B, de um tumor ou câncer, respectivamente, preferencialmente um tumor não sólido. Pacientes tendo um "câncer expressando CD20" podem ser determinados por meio de teste de rotina conhecidos na técnica. Por exemplo, a expressão de antígeno CD20 é medida usando detecção imuno-histoquímica (IHC), FACS ou através de detecção à base de PCR do RNAm correspondente.

[00048] O termo "câncer expressando CD20" conforme usado aqui, neste requerimento de patente, refere-se a todos os cânceres nos quais as células cancerígenas apresentam uma expressão do antígeno CD20. O câncer expressando CD20 referido pode ser, por exemplo, linfomas, leucemias linfocíticas, câncer pulmonar, câncer pulmonar de células

não pequenas (NSCL), câncer pulmonar de células bronquioloalveolares, câncer ósseo, câncer pancreático, câncer de pele, câncer de cabeça ou pescoço, melanoma cutâneo ou intraocular, câncer uterino, câncer de ovário, câncer retal, câncer da região anal, câncer de estômago, câncer gástrico, câncer de cólon, câncer de mama, câncer uterino, carcinoma das trompas de Falopio, carcinoma do endométrio, carcinoma do cólon uterino, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, Doença de Hodgkin, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino, câncer da glândula tiroide, câncer da glândula paratiroide, câncer da glândula adrenal, sarcoma de tecidos moles, câncer da uretra, câncer do pênis, câncer de próstata, câncer da bexiga, câncer do rim ou uréter, carcinoma celular renal, carcinoma da pelve renal, mesotelioma, câncer hepatocelular, câncer biliar, neoplasmas do sistema nervoso central (SNC), tumores do eixo espinhal, glioma do tronco cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, neurofibromas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma da pituitária, inclusive versões refratárias de qualquer um dos cânceres acima, ou uma combinação de um ou mais dos cânceres acima.

[00049] Preferencialmente câncer expressando CD20 conforme usado aqui, neste requerimento de patente, refere-se a linfomas (preferencialmente linfomas Não Hodgkin de Células B (NHL)) e leucemias linfocíticas. Os linfomas e leucemias linfocíticas referidos incluem, por exemplo, a) linfomas foliculares, b) linfomas de células não clivadas pequenas / linfoma de Burkitt (inclusive linfoma de Burkitt endêmico, linfoma de Burkitt esporádico e linfoma não Burkitt) c) linfomas de zona marginal (inclusive linfoma de células B de zona marginal extranodal (linfomas de tecido linfático associados à mucosa, MALT), linfoma de células B de zona marginal nodal e linfoma de zona marginal esplênica), d) linfoma de células do manto (MCL), e) linfoma de células grandes

(inclusive linfoma de células grandes difuso de células B (DLCL), linfoma celular misto difuso, linfoma imunoblástico, linfoma de células B mediastinal primário, linfoma angiocêntrico - linfoma de células B pulmonar) f) leucemia de células cabeludas, g) linfoma linfocítico, macroglobulinemia de waldenstrom, h) leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL)/ linfoma linfocítico pequeno (SLL), leucemia pró-linfocítica de células B, i) neoplasmas de células plasmáticas, mieloma de células plasmáticas, mieloma múltiplo, plasmacitoma j) doença de Hodgkin.

[00050] Mais preferencialmente o câncer expressando CD20 é alguns linfomas Não Hodgkin de células B (NHL). Especialmente o câncer expressando CD20 é um linfoma de células do manto (MCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma de células grandes difuso de células B (DLCL), linfoma de Burkitt, leucemia de células cabeludas, linfoma folicular, mieloma múltiplo, linfoma da zona marginal, distúrbio linfoproliferativo pós-transplante (PTLD), linfoma associado a HIV, macroglobulinemia de waldenstrom, ou linfoma primário do sistema nervoso central.

[00051] O termo "um método de tratar" ou seu equivalente, quando aplicado a, por exemplo, câncer refere-se a um procedimento ou curso de ação que é destinado a reduzir ou eliminar o número de células cancerígenas em um paciente, ou a aliviar os sintomas de um câncer. "Um método de tratar" câncer ou outro distúrbio proliferativo não significa necessariamente que as células cancerígenas ou outro distúrbio, de fato, serão eliminados, que o número de células ou distúrbio, de fato, será reduzido, ou que os sintomas de um câncer ou outro distúrbio, de fato, serão aliviados. Frequentemente, um método de tratar câncer será realizado mesmo com uma baixa probabilidade de sucesso, mas o qual, dado o histórico médico e a expectativa de sobrevida estimada de um paciente, não obstante se considera que

induz um curso de ação benéfico geral.

[00052] Em uma modalidade o tratamento com o anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) é em combinação com ciclofosfamida e vincristina.

[00053] Em outra modalidade o tratamento com o anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) é em combinação com doxorubicina.

[00054] Em outra modalidade o tratamento com o anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) é em combinação com ciclofosfamida.

[00055] Em outra modalidade o tratamento com o anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) é em combinação com ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

[00056] Os termos "coadministração", "coadministrar" ou "em combinação" conforme usado aqui, neste requerimento de patente, têm o mesmo significado que uma referência da administração do referido anticorpo anti-CD20 tipo II e os referidos agentes quimioterápicos como uma única formulação ou como duas formulações separadas. A coadministração pode ser simultânea ou sequencial em qualquer ordem, em que preferencialmente há um período de tempo enquanto ambos (ou todos) os agentes ativos simultaneamente exercem suas atividades biológicas. O anticorpo anti-CD20 tipo II referido e os agentes quimioterápicos referidos são coadministrados quer simultaneamente ou sequencialmente (por exemplo, através de uma infusão intravenosa (i.v.) através de uma infusão contínua (uma para o anticorpo e eventualmente uma para os agentes quimioterápicos; ou os agentes quimioterápicos são administrados por via oral). Quando ambos os agentes terapêuticos são coadministrados sequencialmente a dose é administrada quer no mesmo dia em duas administrações separadas,

ou um dos agentes é administrado no dia 1 e o segundo é coadministrado no dia 2 ao dia 7, preferencialmente no dia 2 a 4. Portanto, o termo "sequencialmente" significa dentro de 7 dias depois da dose do primeiro anticorpo, preferencialmente dentro de 4 dias depois da dose do primeiro anticorpo; e o termo "simultaneamente" significa ao mesmo tempo. Os termos "coadministração" com respeito às doses de manutenção do anticorpo anti-CD20 tipo II e dos agentes quimioterápicos significam que as doses de manutenção podem ser ou coadministradas simultaneamente, se o ciclo de tratamento for apropriado para ambos os fármacos, por exemplo, a cada semana. Ou os agentes quimioterápicos são, por exemplo, administrados, por exemplo, a cada primeiro a terceiro dias e anticorpo anti-CD20 tipo II for administrado a cada semana. Ou as doses de manutenção são coadministradas sequencialmente, quer dentro de um ou dentro de vários dias.

[00057] É autoevidente que os anticorpos são administrados ao paciente em uma "quantidade terapeuticamente eficaz" (ou simplesmente "quantidade eficaz") a qual é a quantidade do composto respectivo ou combinação que provocará a reação biológica ou médica de um tecido, sistema, animal ou humano que está sendo buscada pelo pesquisador, veterinário, médico ou outro clínico.

[00058] A quantidade de coadministração do referido anticorpo anti-CD20 tipo II e os referidos agentes quimioterápicos e o momento de coadministração dependerá do tipo (espécie, sexo, idade, peso, e etc.) e condição do paciente sendo tratado e da gravidade da doença ou condição sendo tratada. O anticorpo anti-CD20 tipo II referido e os agentes quimioterápicos referidos são convenientemente coadministrados ao paciente de uma vez ou durante uma série de tratamentos. Dependendo do tipo e da gravidade da doença, cerca de 1 µg /kg a 50 mg/kg (por exemplo, 0,1 a 20 mg/kg) do referido anticorpo anti-CD20 tipo II e 1 µg /kg a 50 mg/kg (por exemplo, 0,1 a 20 mg/kg) dos referidos

agentes quimioterápicos são uma dosagem candidata inicial para coadministração de ambos os fármacos ao paciente. Se a administração for intravenosa o tempo de infusão inicial para o referido anticorpo anti-CD20 tipo II ou os referidos agentes quimioterápicos pode ser mais longo do que tempos de infusão subsequentes, por exemplo, cerca de 90 minutos para a infusão inicial, e cerca de 30 minutos para infusões subsequentes (se a infusão inicial for bem tolerada).

[00059] A dosagem preferencial do referido anticorpo anti-CD20 tipo II será na faixa de cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 30 mg/kg. Deste modo, uma ou mais doses de cerca de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 10 mg/kg ou 30 mg/kg (ou qualquer combinação das mesmas) podem ser coadministradas ao paciente. A dosagem preferencial dos referidos agentes quimioterápicos serão na faixa de 0,01 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, por exemplo, 0,1 mg/kg a 10,0 mg/kg para bortezomib. Dependendo do tipo (espécie, sexo, idade, peso, e etc.) e da condição do paciente e do tipo de anticorpo anti-CD20 e agentes quimioterápicos, a dosagem e o esquema de administração do referido anticorpo anti-CD20 podem diferir da dosagem dos agentes quimioterápicos. Por exemplo, o referido anticorpo anti-CD20 pode ser administrado, por exemplo, a cada uma a três semanas e os referidos agentes quimioterápicos podem ser administrados diariamente ou a cada 2 a 10 dias. Uma dose de maior carga inicial, seguida por uma ou mais doses menores, também pode ser administrada.

[00060] Em uma modalidade preferencial, o medicamento é útil para prevenir ou reduzir metástase ou disseminação adicional em um paciente semelhante sofrendo de câncer expressando CD20. O medicamento é útil para aumentar a duração da sobrevida de um paciente semelhante, aumentando a sobrevida livre de progressão de um paciente semelhante, aumentando a duração da resposta, resultando em uma melhora estatisticamente importante e clinicamente

significativa do paciente tratado conforme medido pela duração da sobrevida, da sobrevida livre de progressão, da taxa de resposta ou da duração da resposta. Em uma modalidade preferencial, o medicamento é útil para aumentar a taxa de resposta em um grupo de pacientes.

[00061] Pode ser usado no anticorpo anti-CD20 tipo II e agentes quimioterápicos tratamento de combinação de câncer expressando CD20. As moléculas referidas convenientemente estão presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o fim pretendido. Portanto em uma modalidade, no tratamento com o anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) em combinação com um ou mais agentes quimioterápicos selecionados entre o grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina, é administrado um corticosteroide adicional, preferencialmente prednisona.

[00062] Em uma modalidade o tratamento de combinação de anticorpo anti-CD20 tipo II e agentes quimioterápicos é usado sem os corticosteroides adicionais referidos.

[00063] O uso do corticosteroide descrito acima como em regimes quimioterápicos é geralmente bem caracterizado nas técnicas de terapia do câncer, e seus usos aqui, neste requerimento de patente, está dentro das mesmas considerações para monitorar a tolerância e a eficácia e para controlar as vias e dosagens de administração, com alguns ajustes. Por exemplo, as dosagens reais dos agentes quimioterápicos e os corticosteroides podem variar dependendo da reação celular cultivada pelo paciente determinada usando métodos de histocultura. Geralmente, a dosagem será reduzida em comparação com a quantidade usada na ausência de outros agentes adicionais.

[00064] Dosagens típicas de um agente eficaz, dos agentes quimioterápicos e/ou os corticosteroides podem ser nas faixas recomendadas pelo fabricante, e onde indicado por reações *in vitro* ou reações em

modelos animais, podem ser reduzidas por até cerca de uma ordem de magnitude de concentração ou quantidade. Portanto, a dosagem real dependerá do critério do médico, da condição do paciente, e da eficácia do método terapêutico baseado na responsividade *in vitro* das células malignas cultivadas primárias ou amostra de tecido histocultivado, ou as reações observadas nos modelos animais apropriados.

[00065] No contexto desta invenção, uma quantidade eficaz de radiação ionizante pode ser realizada e/ou um radiofarmacêutico pode ser usado além do tratamento de combinação de anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e agente quimioterápico de câncer expressando CD20. A fonte de radiação pode ser ou externa ou interna ao paciente sendo tratado. Quando a fonte é externa ao paciente, a terapia é conhecida como terapia de radiação de feixe externo (EBRT). Quando a fonte de radiação é interna ao paciente, o tratamento é denominado braquiterapia (BT). Átomos radioativos para uso no contexto desta invenção podem ser selecionados do grupo incluindo, mas não limitados a, rádio, cézio-137, irídio-192, amerício-241, ouro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnécio-99, iodo-123, iodo-131, e índio-111. Também é possível marcar o anticorpo com os isótopos radioativos referidos. Preferencialmente o tratamento de combinação de anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e agente quimioterápico é usado sem a radiação ionizante referida.

[00066] A terapia de radiação é um tratamento de rotina para controlar tumores e/ou metástases tumorais não ressecáveis ou inoperáveis. Resultados aprimorados têm sido vistos quando terapia por radiação têm sido combinada com quimioterapia. A terapia de radiação se baseia no princípio de que alta dose de radiação liberada em uma area-alvo resultará na morte de células reprodutivas tanto em tecidos

tumorais quanto normais. O regime de dosagem de radiação é geralmente definido em termos de dose de radiação absorvida (Gy), tempo e fracionamento, e deve ser cuidadosamente definido pelo oncologista. A quantidade de radiação que um paciente recebe dependerá de várias considerações, mas as duas mais importantes são a localização do tumor em relação a outras estruturas cruciais ou órgãos do corpo, e da extensão na qual o tumor se disseminou. Um curso de tratamento típico para um paciente sendo submetido à terapia de radiação será um esquema de tratamento durante um período de 1 a 6 semanas, com uma dose total de entre 10 e 80 Gy administrados ao paciente em uma única fração diária de cerca de 1,8 a 2,0 Gy, 5 dias por semana. Em uma modalidade preferencial desta invenção há sinergia quando tumores em pacientes humanos são tratados com o tratamento de combinação da invenção e radiação. Em outras palavras, a inibição de crescimento tumoral por meio dos agentes compreendendo a combinação da invenção é reforçada quando combinada com radiação, opcionalmente com agentes quimioterápicos ou anticancerígenos adicionais. Parâmetros de terapias de radiação adjuvantes estão contidos, por exemplo, na patente internacional N° WO 99/60023.

[00067] Os anticorpos anti-CD20 tipo II são administrados a um paciente de acordo com métodos conhecidos, por administração intravenosa como um bolo ou por infusão contínua durante um período de tempo, por vias intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutânea, intra-articular, intrassinovial, ou intratecal. É preferencial administração intravenosa ou subcutânea dos anticorpos.

[00068] Os agentes quimioterápicos são administrados a um paciente de acordo com métodos conhecidos, por exemplo, por vias intravenosa como um bolo ou por infusão contínua durante um período de tempo, por administração intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutânea, intra-articular, intrassinovial, intratecal, ou peroral. É

preferencial administração intravenosa, subcutânea ou oral dos agentes quimioterápicos.

[00069] A invenção compreende adicionalmente um kit compreendendo um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e um ou mais agentes quimioterápicos selecionados do grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina, para o tratamento de combinação de um paciente sofrendo de um câncer expressando CD20. Em uma modalidade preferencial, os recipientes do kit podem incluir adicionalmente um veículo farmaceuticamente aceitável. O kit pode incluir adicionalmente um diluente estéril, o qual preferencialmente é armazenado em um recipiente adicional separado. O kit pode incluir adicionalmente uma bula compreendendo instruções impressas orientando o uso do tratamento combinado como um método para uma doença cancerígena expressando CD20, preferencialmente um linfoma Não Hodgkin de Células B (NHL).

[00070] O termo "bula" refere-se a instruções habitualmente incluídas dentro de embalagens comerciais de produtos terapêuticos, as quais podem incluir informação sobre as indicações, uso, dosagem, administração, contraindicações e/ou avisos concernentes ao uso de semelhantes produtos terapêuticos.

[00071] Em uma modalidade preferencial, os recipientes do artigo de fabricação podem incluir adicionalmente um veículo farmaceuticamente aceitável. O artigo de fabricação pode incluir adicionalmente um diluente estéril, o qual preferencialmente é armazenado em um recipiente adicional separado.

[00072] Conforme usado aqui, neste requerimento de patente, um "veículo farmaceuticamente aceitável" pretende incluir todo e qualquer material compatível com administração farmacêutica incluindo solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e

antifúngicos, agentes isotônicos e de retardamento da absorção, e outros materiais e compostos compatíveis com administração farmacêutica. Exceto na medida em que qualquer meio convencional ou agente é incompatível com o composto ativo, é contemplado o uso do mesmo nas composições da invenção. Compostos ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições.

Composições Farmacêuticas:

[00073] Composições farmacêuticas podem ser obtidas por processamento do anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou os agentes quimioterápicos selecionados entre o grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina de acordo com esta invenção com veículos inorgânicos ou orgânicos farmaceuticamente aceitáveis. Lactose, amido de milho ou derivados dos mesmos, talco, ácidos esteáricos ou seus sais e similares podem ser usados, por exemplo, como os veículos para comprimidos, comprimidos revestidos, drágeas e cápsulas de gelatina dura. Os veículos adequados para cápsulas de gelatina mole são, por exemplo, óleos vegetais, ceras, gorduras, polióis semissólidos e líquidos e similares. Dependendo da natureza da substância ativa, no entanto, geralmente não são necessários veículos no caso de cápsulas de gelatina mole. Veículos adequados para a produção de soluções e xaropes são, por exemplo, água, polióis, glicerol, óleo vegetal e similares. Veículos adequados para supositórios são, por exemplo, óleos naturais ou hidrogenados, ceras, gorduras, polióis semilíquidos ou líquidos e similares.

[00074] Além disso, as composições farmacêuticas podem conter conservantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes umectantes, emulsificantes, adoçantes, colorantes, aromatizantes, sais para variar a pressão osmótica, tampões, agentes de mascaramento ou antioxidantes. Também podem conter ainda outras substâncias terapeuticamente benéficas.

[00075] Uma modalidade da invenção é composição farmacêutica compreendendo tanto o referido anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) quanto um ou mais agentes quimioterápicos selecionados entre o grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina, em particular para uso em câncer expressando CD20.

[00076] A composição farmacêutica referida pode compreender adicionalmente um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis.

[00077] A presente invenção proporciona adicionalmente uma composição farmacêutica, em particular para uso em câncer, compreendendo (i) uma primeira quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), e (ii) uma segunda quantidade eficaz de um um ou mais agentes quimioterápicos selecionados do grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina. A composição referida opcionalmente compreende veículos e / ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

[00078] Composições farmacêuticas do anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) somente usado de acordo com a presente invenção são preparadas para armazenamento por mistura de um anticorpo tendo o grau de pureza desejado com veículos, excipientes ou estabilizantes opcionais farmaceuticamente aceitáveis (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edição, Osol, A. Ed. (1980)), sob a forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para receptores nas dosagens e concentrações empregadas, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de

benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquil parabenos tais como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos inclusive glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contraíons formadores de sais tais como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não iônicos tais como TWEEN®, PLURONICS® ou polietileno glicol (PEG).

[00079] Composições farmacêuticas dos agentes quimioterápicos selecionados do grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina dependem de suas propriedades farmacêuticas; por exemplo, para compostos químicos pequenos tais como, por exemplo, bortezomib, uma formulação pode ser, por exemplo, a seguinte:

a) Formulação de Comprimido (Granulação a Úmido):

Item	Ingredientes	mg/ comprimido			
1.	Composto de fórmula (I)	5	25	100	500
2.	Lactose Anídrica 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

Procedimento de Fabricação:

1. Mistura-se os itens 1, 2, 3 e 4 e granular com água purificada.
2. Seca-se os grânulos a 50°C.
3. Passa-se os grânulos através de equipamento de moagem adequado.

4. Adiciona-se o item 5 e misturar por três minutos; comprimir sobre uma prensa adequada.

b) Formulação de Cápsula:

Item	Ingredientes	mg/ cápsula			
1.	Composto de fórmula (I)	5	25	100	500
2.	Lactose Hídrica	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

Procedimento de Fabricação:

1. Mistura-se os itens 1, 2 e 3 dentro de um misturador adequado por 30 minutos.
2. Adiciona-se os itens 4 e 5 e misturar por 3 minutos.
3. Preenche-se uma cápsula adequada.

[00080] Em uma modalidade adicional da invenção as composições farmacêuticas de acordo com a invenção são preferencialmente duas formulações separadas para o referido anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e para os agentes quimioterápicos selecionados entre o grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina. Os ingredientes ativos também podem ser capturados dentro de microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interracial, por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou de gelatina e microcápsulas de poli- (metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de liberação de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. As técnicas referidas são descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a. edição, Osol, A. Ed. (1980).

[00081] Podem ser preparadas preparações de liberação gradual.

Exemplos adequados de preparações de liberação gradual incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, cujas matrizes são sob a forma de artigos modelados, por exemplo, filmes, ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação gradual incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(álcool vinílico)), polilactidas (patente dos Estados Unidos Nº US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmio e gama-etil-L-glutamato, acetato de vinila - etileno não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis tais como o LUPRON DEPOT® (microsfersas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

[00082] As formulações a serem usadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é prontamente realizado por filtração através de membranas de filtração estéreis.

[00083] A presente invenção proporciona adicionalmente um método para o tratamento de câncer, compreendendo administrar a um paciente que necessite do referido tratamento (i) uma primeira quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC); e (ii) uma segunda quantidade eficaz de um ou mais agentes quimioterápicos selecionados do grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

[00084] A presente invenção proporciona adicionalmente um método para o tratamento de câncer, compreendendo administrar a um paciente que necessite do referido tratamento (i) uma primeira quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC); e (ii) uma segunda quantidade eficaz de um ou mais agentes quimioterápicos selecionados entre o grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

Conforme usado aqui, neste requerimento de patente, o termo "paciente" preferencialmente refere-se a um humano que

necessite de tratamento com anticorpo anti-CD20 tipo II (por exemplo, um paciente sofrendo de câncer expressando CD20) para qualquer fim, e mais preferencialmente um humano que necessite de um tratamento semelhante para tratar câncer, ou uma condição ou lesão pré-cancerosa. No entanto, o termo "paciente" também pode se referir a animais não humanos, preferencialmente mamíferos tais como cães, gatos, cavalos, vacas, porcos, carneiros e primatas não humanos, entre outros.

[00085] A invenção compreende adicionalmente um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) para o tratamento de câncer expressando CD20 em combinação com um ou mais agentes quimioterápicos selecionados do grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

[00086] A invenção compreende adicionalmente um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) para o tratamento de um paciente sofrendo de um câncer expressando CD20 em combinação com um ou mais agentes quimioterápicos selecionados do grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

[00087] A invenção compreende adicionalmente um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e um ou mais agentes quimioterápicos selecionados do grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina para uso em o tratamento de câncer expressando CD20.

[00088] A invenção compreende adicionalmente um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e um ou mais agentes quimioterápicos selecionados do grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina para uso em o tratamento de um paciente sofrendo de um câncer expressando CD20.

[00089] Preferencialmente o referido anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) é um anticorpo B-Ly1 humanizado, glicoproduzido.

[00090] Preferencialmente o câncer expressando CD20 é um linfoma Não Hodgkin de Células B (NHL).

[00091] Os exemplos, listagem de sequências e figuras que se seguem são proporcionados para ajudar no entendimento da presente invenção, cujo verdadeiro escopo é determinado nas reivindicações anexas. Deve ser entendido que podem ser feitas modificações nos procedimentos determinados sem se afastar do espírito da invenção.

Descrição da Listagem de Sequências:

[00092] **SEQ ID NO: 1** sequência de aminoácidos de região variável da cadeia pesada (VH) de anticorpo anti-CD20 monoclonal murino B-Ly1.

[00093] **SEQ ID NO: 2** sequência de aminoácidos de região variável da cadeia leve (VL) de anticorpo anti-CD20 monoclonal murino B-Ly1.

[00094] **SEQ ID NO: 3 -19** sequências de aminoácidos de região variável da cadeia pesada (VH) de anticorpos B-Ly1 humanizados (B-HH2 a B-HH9, B-HL8, e B-HL10 a B-HL17)

[00095] **SEQ ID NO: 20** sequências de aminoácidos de região variável da cadeia leve (VL) de anticorpo B-Ly1 humanizado B-KV1

Descrição das Figuras:

Figura 1

a) Atividade antitumoral sinérgica do tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) com ciclofosfamida e vincristina e

b) comparação com um tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 tipo I (rituximab) com ciclofosfamida e vincristina sobre linfoma Não Hodgkin de células B humano WSU-DLCL2 (NHL).

[00096] Valores médios do volume tumoral [mm³] +/- IQR plotado sobre o eixo y; número de dias depois da injeção de células tumorais plotadas sobre o eixo x plotado sobre o eixo y; número de dias depois da injeção de células tumorais plotadas sobre o eixo x. 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-ly1 humanizado, glicomanipulado (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 (**losangos**) e F) B-ly1 humanizado, glicomanipulado (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) com ciclofosfamida (25 mg/kg) e vincristina (0,25 mg/kg), uma vez por semana (**sinais de mais**).

Figura 2

[00097] Intensidade de Fluorescência Média (MFI, eixo y à esquerda) de anticorpo anti-CD20 tipo I (Cy5-rituximab = barra branca) e anticorpo anti-CD20 tipo II (Cy5 – B-Ly1 humanizado, glicomanipulado B-HH6-B-KV1 GE = barra preta) sobre células Raji (ATCC N° CCL-86); Proporção das capacidades de ligação a CD20 de anticorpo anti-CD20 tipo I (rituximab) e anticorpo anti-CD20 tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) em comparação com rituximab (medida sobre o eixo y à direita).

Figura 3

a) Atividade antitumoral sinérgica do tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) com doxorubicina e

b) comparação com um tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 tipo I (rituximab) com doxorubicina sobre linfoma Não Hodgkin folicular humano RL (NHL).

[00098] Valores médios do volume tumoral [mm³] +/- IQR plotado

sobre o eixo y; número de dias depois da injeção de células tumorais plotadas sobre o eixo x. Legenda: A) Veículo (***sinais de 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, glicomanipulado (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) uma vez por semana (***quadrados***), E) rituximab (30 mg/kg) com doxorubicina (3 mg/kg), uma vez por semana (***losangos***) e F) B-ly1 humanizado, glicomanipulado (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) com doxorubicina (3 mg/kg) , uma vez por semana (***círculos***).

Figura 4

a) Atividade antitumoral sinérgica do tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) com ciclofosfamida e

b) comparação com um tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 tipo I (rituximab) com ciclofosfamida sobre linfoma Não Hodgkin folicular humano RL (NHL).

[00099] Valores médios do volume tumoral [mm³] +/- IQR plotado sobre o eixo y; número de dias depois da injeção de células tumorais plotadas sobre o eixo x. 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, glicomanipulado (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 (***losangos***) e F) B-ly1 humanizado, glicomanipulado (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) com ciclofosfamida (50 mg/kg) , uma vez por semana (***sinais de mais***).

Procedimentos Experimentais

Exemplo 1

[000100] Atividade antitumoral de tratamento combinado de um

anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) com ciclofosfamida e vincristina.

Agentes de teste:

[000101] Anticorpo anti-CD20 tipo II B-HH6-B-KV1 GE (= B-Ly1 humanizado, glicomanipulado B-HH6-B-KV1, vide a patente internacional N°. WO 2005/044859 e a patente internacional N° WO 2007/031875) foi proporcionado como solução de matéria-prima (c=9,4 mg/ml) pela GlycArt, Schlieren, Suíça. Tampão de anticorpo incluiu histidina, trealose e polissorbato 20. A solução de anticorpo foi diluída adequadamente em PBS a partir da matéria-prima para injeções prévias.

[000102] Rituximab foi proporcionado pela Hoffmann La Roche, Basel.

[000103] Ciclofosfamida e vincristina foram adquiridas como formulação clínica da Baxter Oncology GmbH, Halle, Alemanha ou medac, *Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH*, Hamburg, Alemanha, respectivamente. A diluição foi ajustada a partir da solução de matéria-prima reconstituída.

Linhagens celulares e condições de cultura:

[000104] Células de linfoma Não Hodgkin humano WSU-DLCL2 (NHL) foram gentilmente proporcionadas pela Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, NJ, Estados Unidos. A linhagem de células tumorais foi rotineiramente cultivada em meio RPMI (PAA, Laboratories, Áustria) suplementado com 10% de soro fetal bovino (PAA Laboratories, Áustria) e L-glutamina a 2 mM, a 37°C em uma atmosfera saturada com água a 5% de CO₂. A passagem 4 foi usada para transplantação. As células foram coinjetadas com Matrigel.

Animais:

[000105] Camundongos fêmeas SCID bege; idade de 7 a 8 semanas na chegada (adquiridos da Charles River, Sulzfeld, Alemanha) foram

mantidos sob condição livre de patógeno específico com ciclos diários de 12 h de luz /12 h de escuridão de acordo com diretrizes submetidas a um comitê (GV-Solas; Felasa; TierschG). O protocolo de estudo experimental foi revisado e aprovado pelo governo local. Depois da chegada os animais foram mantidos na parte de quarentena da instalação animal por uma semana para se tornarem habituados ao novo ambiente e para observação. Foi realizado monitoramento de saúde contínuo em base regular. Foram proporcionados alimento de dieta (Provimi Kliba 3337) e água (acidificada pH 2,5 a 3) à vontade.

Monitoramento:

[000106] Os animais foram controlados diariamente para sintomas clínicos e detecção de efeitos adversos. Para monitoramento do início ao fim do experimento o peso corporal dos animais foi documentado duas vezes por semana e o volume do tumor foi medido por compasso de calibre depois de estagiamento.

Tratamento dos animais:

[000107] O tratamento dos animais começou no dia de randomização 9 dias depois da transplantação celular. Anticorpo anti-CD20 tipo II humanizado glicomanipulado B-HH6-B-KV1 GE ou Rituximab foi administrado como agentes únicos i.v. a cada 7 dias nos dias de estudo 9, 15, 23, 30, 37, 44, 51 e 58 na dosagem indicada de 30 mg/kg. O veículo correspondente foi administrado nos mesmos dias. Ciclofosfamida e vincristina foram administrados i.v. uma vez por semana nos dias 9, 15, 23, 30, 37, 44, 51 e 58 a 25 mg/kg ou 0,25 mg/kg, respectivamente. Nos grupos de terapia de combinação, ambos os anticorpos foram administrados 24 horas depois dos agentes quimioterápicos nos dias 10, 16, 24, 31, 38, 45, 52 e 59.

Estudo de inibição de crescimento tumoral *in vivo*:

[000108] No dia 35 depois da transplantação celular, houve uma significativa inibição de crescimento tumoral de 73%, 85%, 66%, 94%

ou 90% nos animais que receberam rituximab, anticorpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE, quimioterapia, combinação de quimioterapia e anticorpo anti-CD20 ou combinação de quimioterapia e rituximab, respectivamente, em comparação com o grupo controle. Ao final do experimento, uma inibição de crescimento tumoral significativamente melhor foi observada no grupo de combinação de quimioterapia / anticorpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE em comparação com o grupo de combinação de quimioterapia / rituximab.

[000109] O efeito dos diferentes tratamentos até o fim do estudo no dia 64 depois da transplantação celular foi demonstrado pelo valor do Adiamento do Crescimento Tumoral (T-C, em que T é o tempo médio em dias requerido para os tumores do grupo de tratamento atingirem uma medida predeterminada de 1500 mm³, e C é o tempo médio em dias para os tumores do grupo controle atingirem a mesma medida). Os resultados são mostrados na tabela a seguir:

Tabela 3:

Adiamento do crescimento tumoral dos grupos de tratamento comparados com o grupo controle em dias

Grupo	Composto (Dosagem)	valor T – C (dias)
2	Rituximab (30 mg/kg)	13
3	Anticorpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE (30 mg/kg)	19
4	Ciclofosfamida (25 mg/kg) Vincristina (0,25 mg/kg)	14
5	Ciclofosfamida (25mg/kg) Vincristina (0,25 mg/kg) anticorpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE (30 mg/kg)	38
6	Ciclofosfamida (25 mg/kg) Vincristina (0,25 mg/kg) Rituximab (30 mg/kg)	28

Exemplo 2

Determinação da proporção das capacidades de ligação a CD20 sobre células Raji (ATCC N° CCL-86) de anticorpo anti-CD20 tipo II em comparação com rituximab

[000110] Células Raji (ATCC N° CCL-86) foram mantidas em cultura em meio RPMI-1640 (PanBiotech GmbH, Cat. No. PO4-18500) contendo 10% de FCS (Gibco, Cat. N°10500-064). O anticorpo anti-CD20 tipo II B-HH6-B-KV1 GE (anticorpo B-Ly1 humanizado, glicomanipulado) e rituximab foram marcados usando Cy5 Mono NHS éster (Amersham GE Healthcare, Catálogo N° PA15101) de acordo com as instruções do fabricante. Rituximab conjugado a Cy5 tinha uma proporção de marcação de 2,0 moléculas Cy5 por anticorpo. B-HH6-B-KV1 conjugado a Cy5 tinha uma proporção de marcação de 2,2 moléculas Cy5 por anticorpo. De modo a determinar e comparar as capacidades e modo de ligação de ambos os anticorpos, curvas de ligação (por titulação de Rituximab conjugado a Cy5 e B-HH6-B-KV1 GE conjugado a Cy5) foram geradas por imunofluorescência direta usando a linhagem celular Raji de linfoma de Burkitt (ATCC N° CCL-86). Intensidades de fluorescência média (MFI) foram analisadas como EC50 (50% da intensidade máxima) para Rituximab conjugado a Cy5 e B-HH6-B-KV1 GE conjugado a Cy5, respectivamente. 5*10⁵ células por amostra foram coradas por 30 min a 4°C. Depois disso, as células foram lavadas em meio de cultura. Tintura de iodeto de propídio (PI) foi usada para excluir células mortas. Foram realizadas medições usando o FACSArray (Becton Dickinson), Iodeto de propídio (PI) foi medido em Far Red A e Cy5 a Red-A. A figura 2 mostra a Intensidade de fluorescência média (MFI) para ligação a EC50 (50% da intensidade máxima) de B-HH6-B-KV1 GE conjugado a Cy5 (barra preta) e rituximab conjugado a Cy5 (barra branca).

[000111] Em seguida a proporção das capacidades de ligação a CD20 sobre células Raji (ATCC-No. CCL-86) é calculada de acordo com a

seguinte fórmula:

[000112] Proporção das capacidades de ligação a CD20 sobre células Raji (ATCC-Nº CCL-86) =

MIF(Cy5-anticorpo anti-CD20) x proporção de marcação de Cy5(Cy5-rituximab)

MIF(Cy5-rituximab) proporção de marcação de Cy5(Cy5- anticorpo anti-CD20)

= MFI(B - HH6 - B - KV1) x proporção de marcação de Cy5 (Cy5-rituximab)

MIF(Cy5-rituximab) proporção de marcação de Cy5 (B - HH6 - B - KV1)
= 207 x 2,2 = 0,44 433 2,0

[000113] Portanto B-HH6-B-KV1 GE como um anticorpo anti-CD20 tipo II típico apresenta capacidade de ligação reduzida em comparação com rituximab.

Exemplo 3

Atividade antitumoral de tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 tipo II com aumentada citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) com doxorubicina.

Agentes de teste:

[000114] Anticorpo anti-CD20 tipo II B-HH6-B-KV1 GE (= B-Ly1 humanizado, glicomanipulado B-HH6-B-KV1, vide a patente internacional Nº WO 2005/044859 e a patente internacional Nº WO 2007/-031875) foi proporcionado como solução de matéria-prima (c=9,4 mg/ml) pela GlycArt, Schlieren, Suíça. Tampão de anticorpo incluiu histidina, trealose e polissorbato 20. A solução de anticorpo foi diluída adequadamente em PBS da matéria-prima para injeções prévias.

[000115] Rituximab foi proporcionado pela Hoffmann La Roche, Basel.

[000116] Doxorubicina foi adquirida como formulação clínica da Hexal, Holzkirchen, Alemanha. A diluição é ajustada a partir da solução de matéria-prima reconstituída.

Linhagens celulares e condições de cultura:

[000117] Células de linfoma Não Hodgkin folicular humano RL foram gentilmente proporcionadas pelo Dr. Charles Dumontet, INSERM 590, Lyon, França. A linhagem de células tumorais foi rotineiramente cultivada em meio RPMI (PAA, Laboratories, Áustria) suplementado com 10% de soro fetal bovino (PAA Laboratories, Áustria) e L-glutamina a 2 mM, a 37°C em uma atmosfera saturada com água a 5% de CO₂. A oassagem 2 foi usada para transplantação.

Animais:

[000118] Camundongos fêmeas SCID bege; idade de 7 a 8 semanas na chegada (adquiridos da Charles River, Sulzfeld, Alemanha) foram mantidos sob condição livre de patógeno específico com ciclos diários de 12 h de luz /12 h de escuridão de acordo com diretrizes submetidas a um comitê (GV-Solas; Felasa; TierschG). O protocolo de estudo experimental foi revisado e aprovado pelo governo local. Depois da chegada os animais foram mantidos na parte de quarentena da instalação animal por uma semana para se tornarem habituados ao novo ambiente e para observação. Foi realizado monitoramento de saúde contínuo em base regular. Foram proporcionados alimento de dieta (Provimi Kliba 3337) e água (acidificada pH 2,5 a 3) à vontade.

Monitoramento:

[000119] Os animais foram controlados diariamente para sintomas clínicos e detecção de efeitos adversos. Para monitoramento do início ao fim do experimento o peso corporal dos animais foi documentado duas vezes por semana e o volume tumoral foi medido por compasso de calibre depois de estagiamento.

Tratamento dos animais:

[000120] O tratamento dos animais começou no dia da randomização 14 dias depois da transplantação celular. Anticorpo anti-CD20 tipo II humanizado, glicomanipulado B-HH6-B-KV1 GE ou Rituximab foi

administrado como agentes únicos i.v. a cada 7 dias nos dias de estudo 14, 21, 28, 35 e 42 na dosagem indicada de 30 mg/kg ou 60 mg/kg. O veículo correspondente foi administrado nos mesmos dias bem como Doxorubicina a qual foi administrada i.v. uma vez por semana a 3 mg/kg. Nos grupos de terapia de combinação, doxorubicina foi administrada i.v. uma vez por semana nos dias 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

Atividade antitumoral de tratamento combinado de um anticorpo anti-CD20 tipo II (B-HH6-B-KV1 GE) e Ciclofosfamida na linhagem celular RL.

Agentes de teste:

[000121] Anticorpo anti-CD20 tipo II B-HH6-B-KV1 GE (= B-Ly1 humanizado, glicomanipulado B-HH6-B-KV1, vide a patente internacional N° WO 2005/044859 e a patente internacional N°. WO 2007/031875) foi proporcionado como solução de matéria-prima (c=9,4 mg/ml) da GlycArt, Schlieren, Suíça. Tampão de anticorpo incluiu histidina, trealose e polissorbato 20. Solução de anticorpo foi diluída adequadamente em PBS a partir de matéria-prima para injeções prévias.

[000122] Anticorpo anti-CD20 tipo I Rituximab foi proporcionado como solução de matéria-prima (c=10 mg/ml) da Hoffmann La Roche, Basel, Suíça. O tampão contém polissorbato 80, Cloreto de sódio e Citrato de sódio.

[000123] Ciclofosfamida foi adquirida como formulação clínica da Baxter Oncology GmbH, Halle, Alemanha ou medac, *Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH*, Hamburgo, Alemanha, respectivamente. A diluição foi ajustada a partir da solução de matéria-prima reconstituída.

Linhagens celulares e condições de cultura:

[000124] A linhagem de células de linfoma Não Hodgkin folicular humano RL é cultivada rotineiramente em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro de feto de vitelo e antibióticos. As células RL crescem em suspensão e formam aglomerados. Células de crescimento exponencial foram injetadas por via subcutânea em camundongos SCID.

Animais:

[000125] Os animais usados foram camundongos SCID fêmeas de 6 semanas de idade, proporcionados pela Charles River (L'Arbresle, França) com status IPSOS. Os animais foram alojados no mínimo uma semana antes da injeção de células RL. As gaiolas continham 5 animais.

Monitoramento:

[000126] Os animais foram controlados diariamente para sintomas clínicos e detecção de efeitos adversos. Para monitoramento do início ao fim do experimento o peso corporal dos animais foi documentado duas vezes por semana e o volume do tumor foi medido por compasso de calibre depois de estagiamento. Os critérios de exclusão do estudo para os animais foram descritos e aprovados pelo Comitê de Animais Experimentais local.

Tratamento de animais:

[000127] O tratamento começou 31 dias depois da transplantação celular na randomização. Anticorpo anti-CD20 tipo II humanizado B-HH6-B-KV1 GE, veículo ou rituximab foram administrados por i.v. uma vez por semana aos animais em uma dosagem de 30 mg/kg, (dia 31, 38, 45 e 52). A ciclofosfamida foi injetada nos mesmos dias em uma dose de 50 mg/kg. As diluições de anticorpos foram recém-preparadas do estoque antes do uso.

Estudo de inibição de crescimento tumoral *in vivo*:

[000128] No dia 66 depois da transplantação celular, houve uma

significativa inibição de crescimento tumoral de 54%, 85% ou 91% nos animais aos quais foram administradas 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. Deste modo, o tratamento de combinação de anticorpo anti-CD20 B-HH6-B-KV1 GE e ciclofosfamida produziu a melhor atividade antitumoral comparada com o tratamento com ciclofosfamida somente.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um anticorpo anti-CD20 que é o anticorpo B-Ly1 humanizado compreendendo 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 um ou mais agentes quimioterápicos selecionados do grupo consistindo em ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer expressando CD20.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o tratamento com o agente quimioterápico é ciclofosfamida e vincristina.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente quimioterápico é ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina.

4. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD20 é glicomanipulado.

5. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o câncer expressando CD20 é um linfoma não Hodgkin de Células B (NHL).

6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que prednisona adicional é usada.

FIG. 1

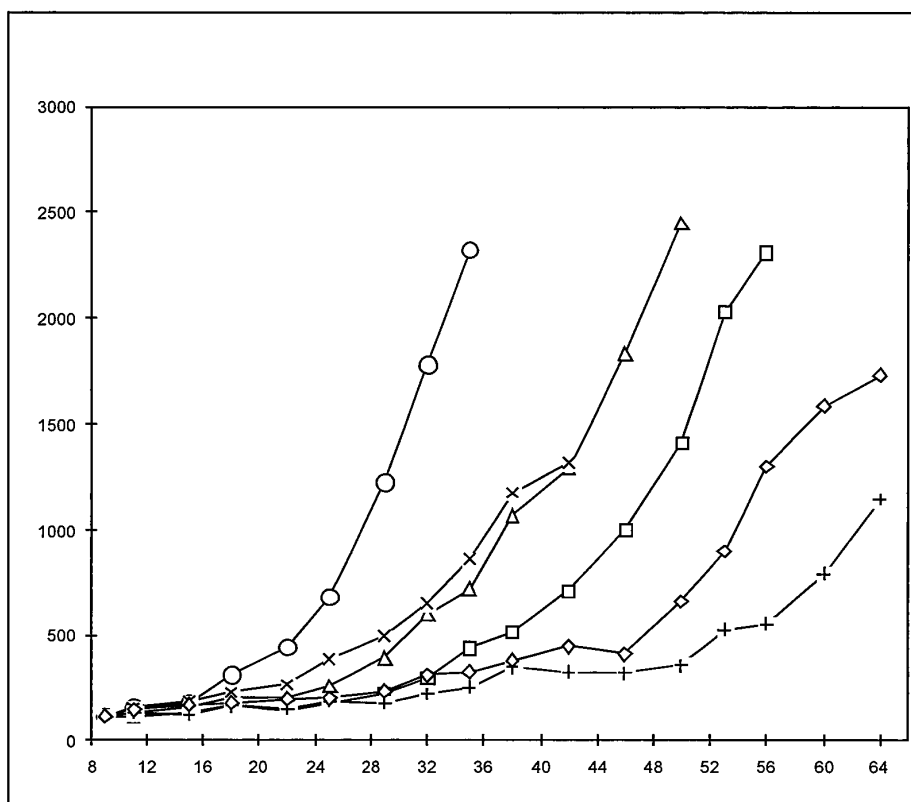


FIG. 2

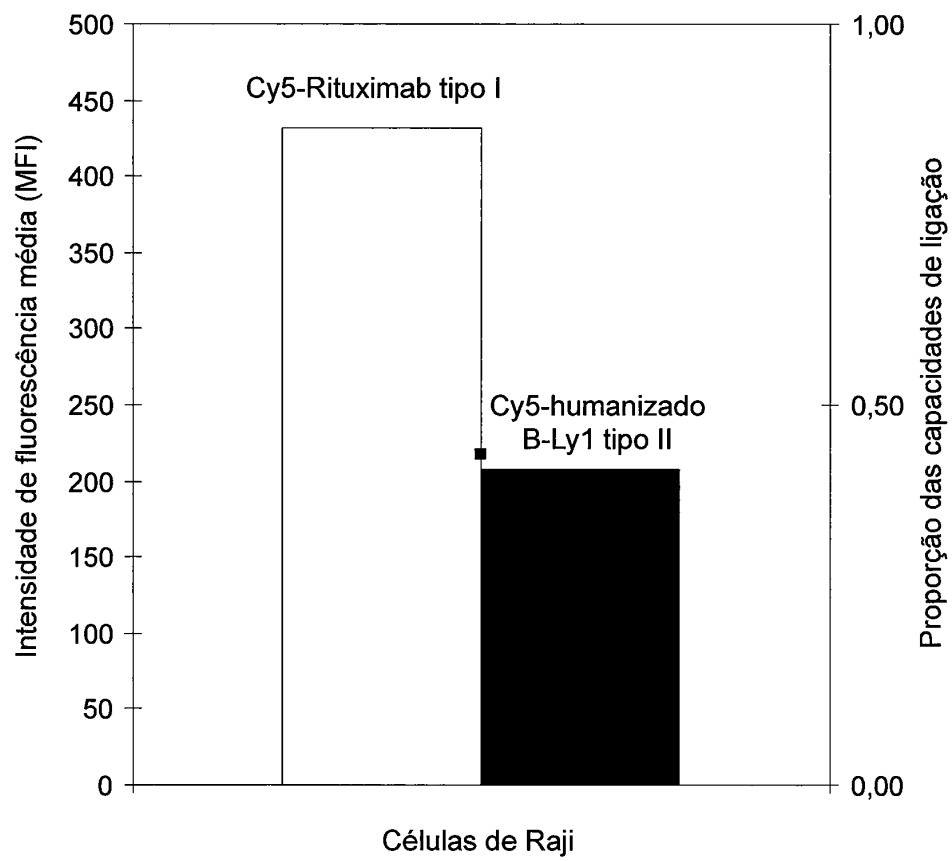


FIG. 3

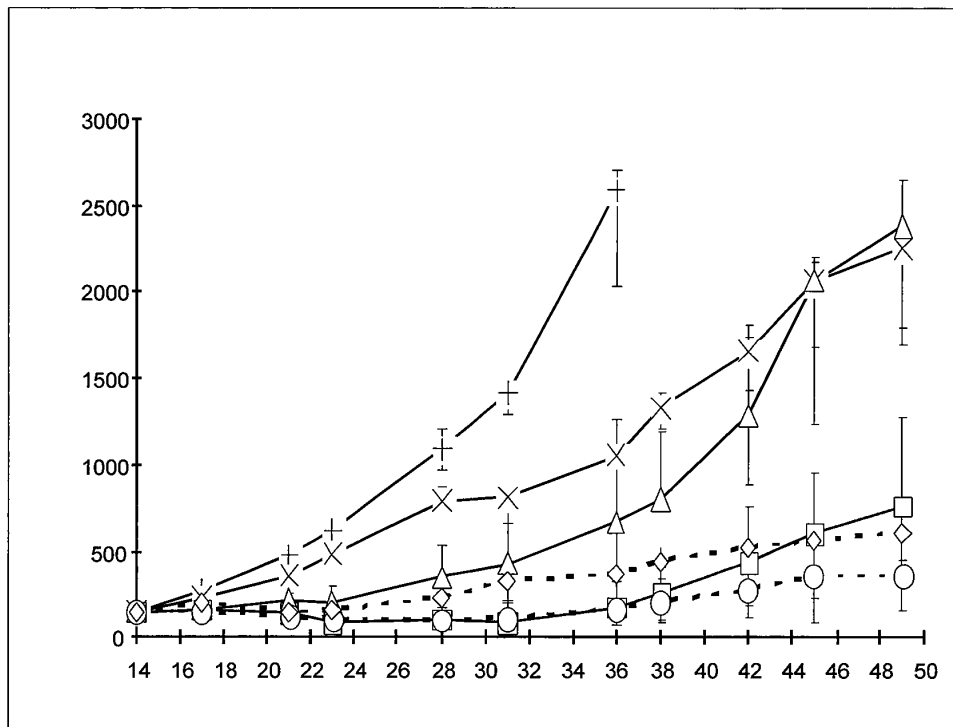


FIG. 4

