

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 343**

51 Int. Cl.:

<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)
<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/519</b>	(2006.01)
<b>A61P 37/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2013 E 16185090 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3150256**

54 Título: **Combinación de anticuerpo anti-CD20 e inhibidor selectivo de PI3 quinasa**

30 Prioridad:

**02.11.2012 IN 4595CH2012**  
**02.03.2013 US 201361771812 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.03.2021**

73 Titular/es:

**TG THERAPEUTICS INC. (33.3%)**  
**2 Gransevoort Street, 9th Floor**  
**New York, NY 10014, US;**  
**RHIZEN PHARMACEUTICALS S.A. (33.3%) y**  
**LABORATOIRE FRANÇAIS DU**  
**FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES**  
**(33.3%)**

72 Inventor/es:

**WEISS, MICHAEL;**  
**MISKIN, HARI;**  
**SPORTELLI, PETER y**  
**VAKKALANKA, SWAROOP K.V.S**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

**ES 2 813 343 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Combinación de anticuerpo anti-CD20 e inhibidor selectivo de PI3 quinasa

## 5 Campo de la invención

En la presente descripción se proporcionan las combinaciones altamente efectivas de un compuesto de la Fórmula A (un inhibidor selectivo de PI3K $\delta$ ) y los anticuerpos anti-CD20 para el tratamiento y la mejora de las enfermedades y los trastornos mediados por PI3K $\delta$  y/o CD20. En particular, la combinación puede usarse para tratar los cánceres y las enfermedades autoinmunitarias. Más particularmente, la invención proporciona una combinación de un compuesto de la Fórmula A, o los estereoisómeros de este, y el ublituximab para el tratamiento y/o la mejora de las neoplasias hematológicas tales como la leucemia y el linfoma.

## 15 Antecedentes de la invención

Hay evidencia considerable que indica que las enzimas PI3K $\delta$  y el CD20 contribuyen individualmente a la tumorigénesis en una amplia variedad de cánceres humanos y especialmente en las neoplasias hematológicas. Las fosfoinositida 3-quinasas (PI3K) son una familia de enzimas que regulan diversas funciones biológicas en cada tipo de célula mediante la generación de moléculas de segundo mensajero de fosfoinositida. Como la actividad de estos segundos mensajeros de fosfoinositida se determina por su estado de fosforilación, las quinastas y las fosfatasa que actúan para modificar estos lípidos son fundamentales para la correcta ejecución de los eventos de señalización intracelular. Las PI3K fosforilan los lípidos en el residuo 3-hidroxilo de un anillo de inositol (Whitman y otros, Nature 332:664 (1988)) para generar fosfolípidos fosforilados (PIP3) que actúan como segundos mensajeros que reclutan quinastas con dominios de unión a lípidos (que incluye las regiones con homología a la pleckstrina (PH)), tales como la Akt y la quinasa dependiente de fosfoinositida 1 (PDK1). La unión de Akt a los PIP3 de la membrana provoca la translocación de Akt a la membrana plasmática, poniendo a Akt en contacto con PDK1, que es responsable de activar a Akt. La fosfatasa supresora de tumores, PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina eliminado en el cromosoma Diez), desfosforila PIP3 y, por lo tanto, actúa como un regulador negativo de la activación de Akt. Las PI3-quinastas Akt y PDK1 son importantes en la regulación de muchos procesos celulares, que incluyen la regulación del ciclo celular, la proliferación, la supervivencia, la apoptosis y la motilidad, y son componentes importantes de los mecanismos moleculares de enfermedades como el cáncer, la diabetes y la inflamación inmunitaria (Vivanco y otros, Nature Rev. Cancer 2:489 (2002); Phillips y otros, Cancer 83:41 (1998)).

La familia PI3K está constituida por cuatro clases diferentes: Clases I, II, III y IV. Las Clases I-III son lípido quinastas y la Clase IV son proteínas serina/treonina quinastas.

Los miembros de la familia de la Clase I de las PI3K son dímeros de una subunidad reguladora y catalítica. La familia de la Clase I consta de cuatro isoformas, determinadas por las subunidades catalíticas de 110 kDa  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . Ver Engelman J.A., Nat Rev Genet 7:606-619 (2006); Carnero A., Curr Cancer Drug Targets 8:187-198 (2008); y Vanhaesebroeck B., Trends Biochem Sci 30:194-204 (2005). La Clase I puede subdividirse en dos subclases: Clase Ia, formada por la combinación de p110  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ , y una subunidad reguladora (p85, p55 o p50); y Clase Ib, formada por las subunidades reguladoras p101 y p110  $\gamma$ .

Varios grupos de investigación han publicado estudios sobre PI3K y las vías de proteína quinasa relacionadas, que incluyen Liu y otros, Nature Reviews Drug Discovery 8:627-644 (2009); Nathan y otros, Mol. Cancer Ther. 8(1) (2009); y Marone y otros, Biochimica et Biophysica Acta 1784:159-185 (2008). Dos inhibidores conocidos de PI3K, LY294002 y Wortmannin, son inhibidores no específicos de PI3K, ya que no distinguen a los cuatro miembros de la Clase I de PI3K:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . Varios inhibidores de PI3K han entrado en ensayos clínicos para el tratamiento de cánceres, y se consideran áreas de interés terapéutico varios tipos de cánceres, que incluyen el cáncer de mama, el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y los cánceres hematológicos.

El CD20 es una proteína transmembrana hidrófoba con un peso molecular de 35-37 kDa que está presente en la superficie de los linfocitos B maduros. Se expresa durante el desarrollo de las células de linfocitos B (células B) desde la etapa pre-B temprana hasta la diferenciación en plasmocitos, una etapa en la que esta expresión desaparece. El CD20 está presente tanto en los linfocitos B normales como en las células B malignas que incluyen la mayoría de los linfomas de células B no Hodgkin (NHL) y la leucemia linfocítica crónica de tipo B (B-CLL). El antígeno CD20 no se expresa en las células madre hematopoyéticas o en los plasmocitos.

Los anticuerpos anti-CD20 se han desarrollado y se siguen desarrollando para el tratamiento de las enfermedades de células B. Se han informado éxitos para el anticuerpo anti-CD20 rituximab. Sin embargo, hay un número considerable de pacientes que son resistentes al tratamiento con el rituximab o que desarrollan resistencia en el curso de un tratamiento prolongado con el rituximab (usado como agente único o incluso en combinación con regímenes quimioterapéuticos).

En consecuencia, existe la necesidad de terapias más efectivas para el tratamiento y/o la mejora de las enfermedades o los trastornos asociados con la modulación de las enzimas PI3Kδ y/o la proteína CD20, y en particular para el tratamiento y/o la mejora de las enfermedades de células B.

5 El documento WO2010/014595 describe los métodos para tratar una neoplasia de células B en un sujeto, que comprende usar una estrategia de secuenciación para evitar el antagonismo entre un agente potenciador inmunitario innato que comprende la lenalidomida y un anticuerpo anti-CD20 que comprende el rituximab en un régimen terapéutico para el sujeto.

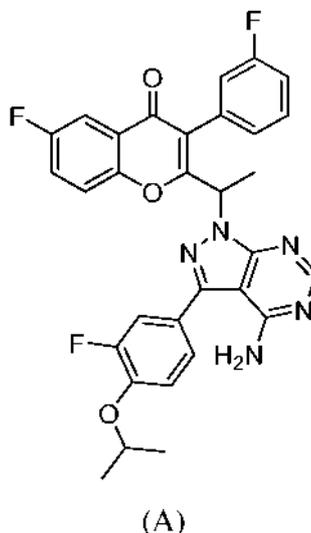
10 El documento EP2000541 describe un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD20 humano que muestra las características biológicas adecuadas para usar como un producto farmacéutico.

El documento WO2014/006572 se refiere a inhibidores selectivos de proteínas quinasas PI3K delta que tienen un sistema de anillo de 1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina.

15 Breve descripción de la invención

La presente invención se dirige a un método *in vitro* para inhibir la proliferación de una población celular que comprende poner en contacto la población con una combinación que comprende

20 (i) un compuesto de la Fórmula A,



45 un estereoisómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, y

(ii) un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este.

50 En determinadas modalidades, dicho anticuerpo anti-CD20 es el ublituximab o se une al mismo epítipo que el ublituximab o es un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo. En determinadas modalidades, dicho anticuerpo o fragmento comprende la región CDR1, CDR2 y CDR3 de VH de las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y la región CDR1, CDR2 y CDR3 de VL de las secuencias SEQ ID NO: 6, 7 y 8, opcionalmente, en donde el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende el VH de la SEQ ID NO: 4 y el VL de la SEQ ID NO: 9.

55 En determinadas modalidades, dicho compuesto de la Fórmula A es (RS)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; o (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona.

60 En determinadas modalidades, la población se pone en contacto con una composición que comprende

(i) un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en (RS)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y

(ii) el anticuerpo anti-CD20.

En determinadas modalidades, la población se pone en contacto con

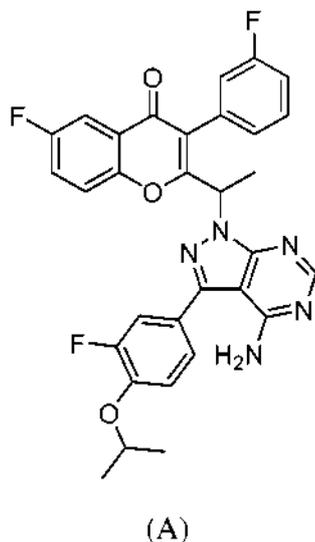
(i) una primera composición que comprende un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en (RS)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y

(ii) una segunda composición que comprende el anticuerpo anti-CD20.

En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 es el ublituximab. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula A es (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona.

La presente invención también se dirige a una combinación terapéutica que comprende:

(i) un compuesto de la Fórmula A,



un estereoisómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este;

y

(ii) un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este,

para usar como un medicamento para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la proliferación excesiva de células B, el cáncer o una enfermedad o un trastorno autoinmunitario.

La presente invención también se dirige a un compuesto de la Fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, para usar como un medicamento en un método para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la proliferación excesiva de células B, el cáncer o una enfermedad o un trastorno autoinmunitario, el método que comprende administrar el compuesto en combinación con un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este.

La presente invención también se dirige a un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este para usar como un medicamento en un método para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la proliferación excesiva de células B, el cáncer o una enfermedad o un trastorno autoinmunitario, el método que comprende administrar el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento en combinación con un compuesto de la Fórmula (A) o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este.

La combinación es adecuada para usar en el tratamiento de una enfermedad, un trastorno o una afección asociada a la enzima PI3Kδ y/o la proteína CD20, por ejemplo, una enfermedad proliferativa como el cáncer. En particular, la

combinación es adecuada para el tratamiento y/o la mejora de las enfermedades de células B, por ejemplo, las neoplasias hematológicas.

Por lo tanto, de acuerdo con las reivindicaciones, se proporcionan los métodos *in vitro* para inhibir la proliferación de una población celular. También se proporciona, de acuerdo con las reivindicaciones, una combinación terapéutica; un compuesto de la Fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este; o un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este, para usar como un medicamento en un método para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la proliferación excesiva de células B, el cáncer o una enfermedad o un trastorno autoinmunitario.

En algunas modalidades, el método comprende poner en contacto la población con una combinación que comprende (i) un compuesto de la Fórmula A, un estereoisómero de este, un tautómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, (ii) y un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este, en donde el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento se une al mismo epítipo que el ublituximab.

En algunas modalidades, el método comprende poner en contacto la población celular con una combinación que comprende (i) un compuesto de la Fórmula A, un estereoisómero de este, un tautómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, y (ii) un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este, en donde el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento exhibe una alta afinidad por Fc-gammaRIII (CD16).

En algunas modalidades, el método comprende poner en contacto la población celular con una combinación que comprende (i) un compuesto de la Fórmula A, un estereoisómero de este, un tautómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, y (ii) un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este, en donde el contenido de fucosa del anticuerpo o el fragmento es menor que el 65 %.

En algunas modalidades, el método comprende poner en contacto la población celular con una combinación que comprende (i) un compuesto de la Fórmula A, un estereoisómero de este, un tautómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, y (ii) un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este, en donde el anticuerpo o el fragmento comprende la región CDR1, CDR2 y CDR3 de VH de las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y la región CDR1, CDR2 y CDR3 de VL de las secuencias SEQ ID NO: 6, 7 y 8. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende el VH de la SEQ ID NO: 4 y el VL de la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 es el ublituximab.

En algunas modalidades, el compuesto de la Fórmula A es

(RS)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona;

(S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; o

(R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona.

En algunas modalidades, el compuesto de la Fórmula A es (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona.

En algunas modalidades, el método *in vitro* para inhibir la proliferación de una población celular comprende poner en contacto la población con una combinación que comprende (i) al menos un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en 2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y (ii) al menos un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este.

En algunas modalidades, el método *in vitro* para inhibir la proliferación de una población celular comprende poner en contacto la población con una combinación que comprende (i) un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en 2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y (ii) al menos un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este, en donde el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de este se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos y fragmentos de este que se unen al mismo epítipo que ublituximab, rituximab, ofatumumab, ocrelizumab, veltuzumab, GA101, AME-133v, PRO131921, tositumomab, hA20 y PRO70769.

En algunas modalidades, la población se pone en contacto con una composición que comprende

(i) un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en

2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona;

(S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y

(R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y

(ii) el anticuerpo anti-CD20.

En algunas modalidades, la población se pone en contacto con

(i) una primera composición que comprende un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en

2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona;

(S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y

1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y

(ii) una segunda composición que comprende el anticuerpo anti-CD20.

En algunas modalidades, la población comprende las células B.

En algunas modalidades de la combinación terapéutica; el compuesto de la Fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este; o el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con las reivindicaciones, la población está en un sujeto humano.

De acuerdo con las reivindicaciones, el sujeto tiene una enfermedad o un trastorno asociado con la proliferación excesiva de células B, el cáncer o una enfermedad o un trastorno autoinmunitario.

En algunas modalidades, el sujeto tiene cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es una neoplasia hematológica. En algunas modalidades, la neoplasia hematológica es el linfoma o la leucemia. En algunas modalidades, la neoplasia hematológica se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), mieloma múltiple (MM), linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma folicular, macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma de células B y linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). En algunas modalidades, el cáncer sobreexpresa el CD20. En algunas modalidades, el cáncer es resistente a la quimioterapia.

En algunas modalidades, el sujeto tiene una enfermedad o un trastorno autoinmunitario. En algunas modalidades, la enfermedad o el trastorno autoinmunitario es la rinitis alérgica, el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) o la artritis reumatoide.

En algunas modalidades, el sujeto es resistente al rituximab.

En algunas modalidades, el sujeto se ha tratado previamente con la quimioterapia, el rituximab o una combinación de estos.

En algunas modalidades, la (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona y el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento se administran secuencialmente.

En algunas modalidades, la (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona y el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento se administran simultáneamente. En algunas modalidades, la (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona y el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento se incluyen en la misma composición farmacéutica. En algunas modalidades, la (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona y el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento están en composiciones farmacéuticas separadas.

5 En algunas modalidades de la combinación terapéutica; el compuesto de la Fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este; o el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con las reivindicaciones, el método comprende además administrar al menos un agente terapéutico adicional al sujeto. En algunas modalidades, al menos un agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de proteasoma, Bortezomib (Velcade®), Carfilzomib (PR-171), PR-047, disulfiram, lactacistina, PS-519, eponemicina, epoxomicina, aclacinomicina, CEP-1612, MG-132, CVT-63417, PS-341, inhibidores de tripéptido de vinilsulfona, ritonavir, PI-083, (+/-)-7-metilomuralida, (-)-7-metilomuralida, lenalidomida y las combinaciones de estos.

10 En algunas modalidades de la combinación terapéutica; el compuesto de la Fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este; o el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con las reivindicaciones, el método comprende además administrar al menos dos agentes terapéuticos adicionales al sujeto, en donde al menos dos agentes terapéuticos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en: a) CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona); b) R-CHOP (rituximab-CHOP); c) hiperCV AD (ciclofosfamida hiperfraccionada, vincristina, doxorubicina, dexametasona, metotrexato, citarabina); d) R-hiper-CV AD (rituximab-hiperCV AD); e) FCM (fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona); f) R-FCM (rituximab, fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona); g) bortezomib y rituximab; h) temsirolimus y rituximab; i) temsirolimus y Velcade®; j) yodo-131 tositumomab (Bexxar.RTM.) y CHOP; k) CVP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona); l) R-CVP (rituximab-CVP); m) ICE (ifosfamida, carboplatino, etopósido); n) R-ICE (rituximab-ICE); o) FCR (fludarabina, ciclofosfamida, rituximab); p) FR (fludarabina, rituximab); y q) D.T. PACE (dexametasona, talidomida, cisplatino, adriamicina, ciclofosfamida, etopósido).

25 En algunas modalidades, se proporcionan los métodos para reducir las células B. En algunas modalidades, el método comprende poner en contacto una composición que comprende las células B con (i) al menos un compuesto de la Fórmula A que se selecciona del grupo que consiste en 2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y (ii) al menos un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este.

30 En algunas modalidades, se proporcionan los métodos para promover la apoptosis. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto una célula B con (i) al menos un compuesto de la Fórmula A que se selecciona del grupo que consiste en 2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y (ii) al menos un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este.

40 En algunas modalidades, se proporcionan los métodos para promover la detención del ciclo celular. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto una célula con (i) al menos un compuesto de la Fórmula A que se selecciona del grupo que consiste en 2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y (ii) al menos un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este.

45 En algunas modalidades, el compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento se administran secuencialmente.

50 En algunas modalidades, el compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento se administran simultáneamente. En algunas modalidades, el compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento se administran en la misma composición. En algunas modalidades, el compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento se administran en composiciones separadas.

55 También se proporciona de acuerdo con la invención un kit que comprende (i) un compuesto de la Fórmula A, un estereoisómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, y (ii) un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este.

60 En algunas modalidades, el kit comprende

(i) un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en

2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona;

65

(S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y

5 (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y

(ii) un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento y el compuesto se incluyen dentro de la misma composición.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento y el compuesto están en composiciones separadas.

15 En algunas modalidades, el kit comprende además uno o más agentes activos adicionales.

También se proporciona de acuerdo con la invención una composición farmacéutica que comprende:

(i) un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en

20 2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona;

25 (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y

(R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y

30 (ii) un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende

(i) un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en

35 2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona;

40 (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y

(R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y

45 (ii) un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este, en donde el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento (a) se une al mismo epítipo que el ublituximab, (b) exhibe una alta afinidad por Fc-gammaRIII (CD16), o (c) tiene un contenido de fucosa menor que el 65 %.

#### Breve descripción de dibujos/figuras

50 Figura 1: Gráficos de barras que muestran el efecto del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el ublituximab sobre la reducción de células CD19-positivas (izquierda) y la reducción de células CD20-positivas (derecha) de sangre total humana.

55 Figura 2: Gráficos de barras que muestran el efecto del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el ublituximab sobre la proliferación celular CD19-positiva inducida por LPS.

Figura 3: Gráficos de barras que muestran el efecto del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el ublituximab sobre la proliferación celular CD20-positiva inducida por LPS.

60 Figura 4: Gráficos de barras que muestran el efecto del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el ublituximab sobre la apoptosis en células Daudi, RPMI-8226, Raji y U266B1.

Figura 5: Histogramas que muestran el efecto del isómero S de un compuesto de la Fórmula A sobre el ciclo celular en células U226B1.

65

Figura 6: Histogramas que muestran el efecto del anticuerpo anti-CD20 ublituximab sobre el ciclo celular en células U226B1.

5 Figura 7: Histogramas que muestran el efecto del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 ublituximab sobre el ciclo celular en células U226B1.

Figura 8: Histogramas que muestran el efecto del isómero S de un compuesto de la Fórmula A sobre el ciclo celular en células Raji.

10 Figura 9: Histogramas que muestran el efecto del anticuerpo anti-CD20 ublituximab sobre el ciclo celular en células Raji.

Figura 10: Histogramas que muestran el efecto del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 ublituximab sobre el ciclo celular en células Raji.

15 Figura 11: Gráficos de la actividad de la caspasa 3 que muestran el efecto del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el ublituximab sobre la apoptosis en células LY1.

20 Figura 12: Gráficos de la actividad de la caspasa 3 que muestran el efecto del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el ublituximab sobre la apoptosis en células Raji.

Descripción detallada de la invención

#### I. Definiciones

25 Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se definen varios términos y frases.

30 El término "CD20" (también conocido como antígeno CD20 de linfocitos B, MS4A1, antígeno B1 de superficie de linfocitos B, Bp35, antígeno Leu-16 de superficie de leucocitos) se refiere a cualquier CD20 nativo, a menos que se indique de cualquier otra manera. El término "CD20" abarca el CD20 "de longitud completa", sin procesar, así como también cualquier forma de CD20 que resulte del procesamiento dentro de la célula. El término también abarca las variantes naturales de CD20, por ejemplo, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas. Los polipéptidos CD20 que se describen en la presente descripción pueden aislarse a partir de una variedad de fuentes, tales como a partir de tipos de tejido humano o de otra fuente, o prepararse por métodos de síntesis o recombinantes. Los ejemplos de secuencias de CD20 incluyen, pero no se limitan a, los números de referencia del NCBI, NP\_068769.2 y NP\_690605.1.

40 El término "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a un objetivo, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o las combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento al antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente descripción, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv), mutantes de cadena sencilla Fv (scFv), anticuerpos multispecíficos tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación de antígeno de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento al antígeno siempre que los anticuerpos exhiban actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o las subclases (isotipos) de estas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), según la identidad de sus dominios constantes de la cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, proteínas, etc.

50 Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une, tal como el CD20. En una determinada modalidad, los anticuerpos de bloqueo o los anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. Idealmente, la actividad biológica se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso 100 %.

60 El término "anticuerpo anti-CD20" o "un anticuerpo que se une a CD20" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a CD20 con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en la orientación a CD20. El grado de unión de un anticuerpo anti-CD20 a una proteína no CD20, no relacionada, es menor que aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a CD20 según lo medido, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En determinadas modalidades, un anticuerpo que se une a CD20 tiene una constante de disociación (K<sub>d</sub>) de ≤1 μM, ≤100 nM, ≤10 nM, ≤1 nM o ≤0,1 nM.

65

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogéneos involucrados en el reconocimiento altamente específico y la unión de un único determinante antigénico, o epítipo. Esto está en contraste con los anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término "anticuerpo monoclonal" abarca anticuerpos monoclonales intactos y de longitud completa, así como también fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), mutantes de cadena sencilla (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento al antígeno. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a tales anticuerpos fabricados de varias maneras, que incluyen, pero no se limitan a, el hibridoma, la selección de fagos, la expresión recombinante y los animales transgénicos.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son cadenas de inmunoglobulinas específicas, inmunoglobulinas quiméricas o fragmentos de estas que contienen secuencias mínimas no humanas (por ejemplo, murinas). Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de la región determinante de la complementariedad (CDR) se reemplazan por residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster) que tienen la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas (Jones y otros, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y otros, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven y otros, *Science*, 239:1534-1536 (1988)). En algunos casos, los residuos de la región marco de Fv (FR) de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de residuos adicionales en la región marco de Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, la afinidad y/o la capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos o tres dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana, mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR son los de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región o dominio constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente el de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de los métodos usados para generar anticuerpos humanizados se describen en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,225,539 o 5,639,641.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten en cuatro regiones marco (FR) conectadas por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de las secuencias entre especies (es decir, Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de los complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani y otros, *J. Molec. Biol.* 273:927-948 (1997)). Además, las combinaciones de estos dos enfoques a veces se usan en la técnica para determinar las CDR.

El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se refiere a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat y otros, *Sequences of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

La numeración de la posición de los aminoácidos según Kabat, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de la cadena pesada o los dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Mediante el uso de este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o más, correspondientes a un acortamiento o inserción en un FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir una sola inserción de aminoácidos (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc., de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante la alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar". Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). El final del bucle CDR-H1 de Chothia cuando se numera mediante el uso de la convención de la numeración de Kabat varía entre H32 y H34 en dependencia de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presentes, el bucle termina en 32; si solo 35A está presente, el bucle termina en 33; si están presentes tanto 35A como 35B, el bucle termina en 34). Las regiones

hipervariables del AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan por el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B H26-H32..34 (Numeración de Kabat)	
H1	H31-H35	H26-H35 H26-H32 (Numeración de Chothia)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

El término "anticuerpo humano" significa un anticuerpo producido por un humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un humano fabricado mediante el uso de cualquier técnica conocida en la técnica. Esta definición de un anticuerpo humano incluye los anticuerpos intactos o de longitud completa, los fragmentos de estos y/o los anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de la cadena pesada y/o ligera humana tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende la cadena ligera murina y los polipéptidos de la cadena pesada humana.

El término "anticuerpos quiméricos" se refiere a los anticuerpos en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Típicamente, la región variable de las cadenas ligeras y pesadas corresponde a la región variable de los anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en los anticuerpos derivados de otra (generalmente humana) para evitar provocar una respuesta inmunitaria en esa especie.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se usa indistintamente en la presente descripción y se refiere a esa porción de un antígeno capaz de unirse específicamente y reconocerse por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítipos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos y aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente tras la desnaturalización de la proteína, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente tras la desnaturalización de la proteína. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

La "afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de cualquier otra manera, como se usa en la presente descripción, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y generalmente puede representarse por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, incluidos los que se describen en la presente descripción. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos por más tiempo. En la técnica se conocen diversos métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los fines de la presente invención. En la presente descripción se describen modalidades ilustrativas específicas.

"O mejor", cuando se usa en la presente descripción para referirse a la afinidad de unión, se refiere a una unión más fuerte entre una molécula y su pareja de unión. "O mejor" cuando se usa en la presente descripción, se refiere a una unión más fuerte, representada por un valor numérico de Kd más pequeño. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una afinidad por un antígeno de "0,6 nM o mejor", la afinidad del anticuerpo por el antígeno es <0,6 nM, es decir, 0,59 nM, 0,58 nM, 0,57 nM, etc., o cualquier valor menor que 0,6 nM.

La frase "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", como se usa en la presente descripción, denota un grado de similitud suficientemente alto entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador) tal que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene poca o ninguna importancia biológica y/o estadística dentro del contexto de las características biológicas medidas por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es menor que aproximadamente el 50 %, menor que aproximadamente el 40 %, menor que aproximadamente el 30 %, menor que aproximadamente el 20 %, o menor que aproximadamente el 10 % en función del valor para el anticuerpo de referencia/comparador.

Un polipéptido, un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula o una composición que está "aislado" es un polipéptido, un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula o una composición que está en una forma que no

se encuentra en la naturaleza. Los polipéptidos, los anticuerpos, los polinucleótidos, los vectores, las células o las composiciones aisladas incluyen aquellos que se han purificado hasta el punto de que ya no están en una forma en la que se encuentran en la naturaleza. Un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula o una composición que se aísla, puede estar sustancialmente pura.

5 Como se usa en la presente descripción, "sustancialmente puro" se refiere al material que es al menos 50 % puro (es decir, libre de contaminantes), al menos 90 % puro, al menos 95 % puro, al menos 98 % puro o al menos 99 % puro.

10 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos en los que una población de células se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o

15 uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello.

20 "Tumor" y "neoplasia" se refieren a cualquier masa de tejido que resulta del crecimiento o la proliferación celular excesiva, ya sea benigna (no cancerosa) o maligna (cancerosa), incluidas las lesiones precancerosas.

25 Los términos "célula cancerosa", "célula tumoral" y los equivalentes gramaticales se refieren a la población total de las células derivadas de un tumor o una lesión precancerosa, que incluyen ambas células no tumorigénicas, que comprenden la mayor parte de la población celular tumoral, y las células madre tumorigénicas (células madre cancerosas). Como se usa en la presente descripción, el término "célula tumoral" se modificará por el término "no tumorigénico" cuando se refiera únicamente a aquellas células tumorales que carecen de la capacidad de renovarse y diferenciarse para distinguir esas células tumorales de las células madre cancerosas.

30 El término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), que incluye, pero no se limita a humanos, primates no humanos, roedores y similares, que serán receptores de un tratamiento particular. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en la presente descripción en referencia a un sujeto humano.

35 Una "población" celular puede referirse a una sola célula o a múltiples células. La célula o las células pueden ser células en cultivo o células en un organismo. Por ejemplo, una población celular puede estar en un sujeto o paciente.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administraría la formulación. Dicha formulación puede ser estéril.

40 Una "cantidad efectiva" de un anticuerpo como se describe en la presente descripción es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito específicamente establecido. Una "cantidad efectiva" puede determinarse empíricamente y de manera rutinaria, en relación con el propósito establecido.

45 El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un anticuerpo u otro fármaco efectivo para "tratar" una enfermedad o un trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir la cantidad de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor, inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y, en una determinada modalidad, detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y en una determinada modalidad, detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Ver la definición en la presente descripción de "tratar". En la medida en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

50

55

60 Los términos como "tratar" o "tratamiento" o "aliviar" se refieren a 1) las medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado y 2) las medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o retrasan el desarrollo de una afección o trastorno patológico específico. Por lo tanto, aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos en quienes debe prevenirse el trastorno. En determinadas modalidades, un sujeto es "tratado" con éxito para el cáncer de acuerdo con los métodos de la presente invención si el paciente muestra uno o más de los siguientes: reducción en la caquexia, aumento en el tiempo de supervivencia, prolongación en el tiempo de la progresión del tumor, reducción en la masa del tumor, reducción de la carga tumoral y/o una prolongación del tiempo de la metástasis tumoral, tiempo de la recurrencia del tumor, respuesta del tumor, respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable, enfermedad progresiva, supervivencia libre de progresión (SLP), supervivencia

65

general (SG), cada una medida por los estándares establecidos por el National Cancer Institute y el U.S. Food and Drug Administration de los Estados Unidos para la aprobación de nuevos fármacos. Ver Johnson y otros, J. Clin. Oncol. 21(7):1404-1411 (2003).

5 Una "combinación" de un anticuerpo anti-CD20 y un inhibidor selectivo de PI3K $\delta$  se refiere a un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de este y al Compuesto A como se define en la presente descripción que se destinan a administrarse a la misma población de células o al mismo sujeto de forma simultánea, secuencial o tanto simultánea como secuencial. Por consiguiente, a modo de ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de este antes o después (por ejemplo, por una hora, un día, una semana o un mes) de la administración del Compuesto A constituye la administración de una combinación de un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de este y el Compuesto A. Además, la administración simultánea de un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de este y el Compuesto A constituye además la administración de una combinación del anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de este y el Compuesto A, independientemente de si el anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de este y el Compuesto A se administran juntos en una sola formulación farmacéutica o se administran simultáneamente en formulaciones farmacéuticas separadas por las mismas o diferentes vías de administración.

Un tumor que "no responde", "responde mal" o es "resistente" al tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 no muestra una mejora estadísticamente significativa en respuesta a un tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 en comparación con ningún tratamiento o el tratamiento con placebo en un ensayo clínico en humanos o modelo animal reconocido, o que responde a un tratamiento inicial con los anticuerpos anti-CD20 pero crece a medida que continúa el tratamiento.

La capacidad de un tipo de célula o tumor para responder a un anticuerpo anti-CD20 puede evaluarse mediante el uso de líneas celulares de laboratorio tales como Raji o WiI2-S, o líneas celulares de pacientes donantes. Además, la actividad puede medirse mediante el uso de ensayos de reducción de células B, por ejemplo, en sangre total de pacientes.

"Polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa indistintamente en la presente descripción, se refiere a los polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse a un polímero mediante la ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura de los nucleótidos puede impartirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante la conjugación con un componente marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "protectores", sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, cabamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), aquellos que contienen restos laterales, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como también formas no modificadas de polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares puede reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores estándar, o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o puede conjugarse a soportes sólidos. El OH terminal 5' y 3' puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos orgánicos de grupos protectores de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que generalmente se conocen en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, modalidades en donde el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR<sub>2</sub> ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH<sub>2</sub> ("formacetal"), en el que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en la presente descripción, incluidos el ARN y el ADN.

El término "vector" significa un constructo que es capaz de suministrar y expresar uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores de plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y determinadas células eucariotas, tales como células productoras.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender

aminoácidos modificados y puede interrumpirse por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de manera natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente marcador. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como también otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos de esta invención se basan en anticuerpos, en determinadas modalidades, los polipéptidos pueden aparecer como cadenas individuales o cadenas asociadas.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo espacios vacíos, si es necesario) para una correspondencia máxima, sin considerar ninguna sustitución conservadora de aminoácidos como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad puede medirse mediante el uso de programas informáticos o algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Se conocen varios algoritmos y programas informáticos en la técnica que pueden usarse para obtener alineaciones de secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Un ejemplo no limitante de un algoritmo de alineación de secuencia es el algoritmo que se describe en Karlin y otros, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:2264-2268 (1990), según se modificó en Karlin y otros, Proc. Natl. Acad. Sci., 90:5873-5877 (1993), y se incorporó en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul y otros, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1991)). En determinadas modalidades, Gapped BLAST puede usarse como se describe en Altschul y otros, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997). BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul y otros, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) o Megalign (DNASTAR) son programas informáticos disponibles públicamente que pueden usarse para alinear secuencias. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse mediante el uso del programa GAP en el programa informático GCG (por ejemplo, mediante el uso de una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de espacio vacío de 40, 50, 60, 70 o 90 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6). El programa GAP en el paquete de programa informático GCG, que incorpora el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) puede usarse para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo, mediante el uso de una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio vacío de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5). Alternativamente, el porcentaje de identidad entre las secuencias de nucleótidos o aminoácidos puede determinarse mediante el uso del algoritmo de Myers y Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)). Por ejemplo, el porcentaje de identidad puede determinarse mediante el uso del programa ALIGN (versión 2.0) y mediante el uso de un PAM120 con tabla de residuos, una penalización de longitud de espacio vacío de 12 y una penalización de espacio vacío de 4. Un experto en la técnica puede determinar los parámetros apropiados para la alineación máxima mediante un programa informático de alineación particular. Pueden usarse los parámetros predeterminados del programa informático de alineación. El porcentaje de identidad "X" de una primera secuencia de aminoácidos con una segunda secuencia de aminoácidos puede calcularse como  $100 \times (Y/Z)$ , donde Y es el número de residuos de aminoácidos calificados como coincidencias idénticas en la alineación de la primera y la segunda secuencias (alineadas mediante inspección visual o un programa particular de alineación de secuencias) y Z es el número total de residuos en la segunda secuencia. Si la longitud de una primera secuencia es mayor que la segunda secuencia, el porcentaje de identidad de la primera secuencia a la segunda secuencia será mayor que el porcentaje de identidad de la segunda secuencia a la primera secuencia.

Como un ejemplo no limitante, si un polinucleótido particular tiene un determinado porcentaje de identidad de secuencia (por ejemplo, es al menos 80 % idéntico, al menos 85 % idéntico, al menos 90 % idéntico y, por ejemplo, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico) a una secuencia de referencia puede determinarse, en determinadas modalidades, mediante el uso del programa Bestfit (Paquete de análisis de secuencia de Wisconsin, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95 % idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente invención, los parámetros se establecen de tal manera que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud total de la secuencia de nucleótidos de referencia y se permiten los espacios vacíos en la homología de hasta el 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

Dos ácidos nucleicos o polipéptidos pueden ser sustancialmente idénticos, lo que significa que tienen al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, y en algunas modalidades al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de nucleótidos o residuos de aminoácidos, cuando se compara y alinea para una correspondencia máxima, medido mediante el uso de un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. La identidad puede existir sobre una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 40-60 residuos de longitud o cualquier valor integral entre ellos, o sobre una región más larga que 60-80 residuos, al menos aproximadamente 90-100 residuos, o las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las secuencias que se comparan, tal como la región de codificación de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo.

Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que un residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluidas las cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), las cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), las cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), las cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), las cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y las cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. En determinadas modalidades, las sustituciones conservadoras en las secuencias de los polipéptidos y los anticuerpos de la invención no anulan la unión del polipéptido o el anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos al antígeno(s), es decir, el FOLR1 al cual el polipéptido o el anticuerpo se unen. Los métodos para identificar las sustituciones conservadoras de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell y otros, *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi y otros, *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); y Burks y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

Todos los números en esta descripción que indican las cantidades, las relaciones de materiales, las propiedades físicas de los materiales y/o el uso deben entenderse como modificados por la palabra "aproximadamente", excepto que se indique explícitamente de cualquier otra manera. El término "aproximadamente", cuando se refiere a un número o un intervalo numérico, significa que el número o el intervalo numérico al que se hace referencia es una aproximación dentro de la variabilidad experimental (o dentro del error estadístico experimental) y, por lo tanto, el número o el intervalo numérico puede variar, por ejemplo, entre el 1 % y el 15 % del número o el intervalo numérico establecido.

El compuesto de la invención puede contener uno o más centros asimétricos (centros quirales) y, por lo tanto, puede dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que pueden definirse, en términos de estereoquímica absoluta, como (R)- o (S)-. La presente descripción pretende abarcar todas esas formas posibles, así como también sus formas racémicas y resueltas y las mezclas de estas. Los enantiómeros individuales pueden separarse de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica a la vista de la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, el término "estereoisómeros" es un término general para todos los isómeros de moléculas individuales que difieren solo en la orientación de sus átomos en el espacio. Este incluye los enantiómeros y los isómeros de los compuestos con más de un centro quiral que no son imágenes especulares entre sí (diastereómeros).

El término "centro quiral" se refiere a un átomo de carbono al que están unidos cuatro grupos diferentes.

Los términos "enantiómero" y "enantiomérico" se refieren a una molécula que no puede superponerse en su imagen especular y, por lo tanto, es ópticamente activa, en donde el enantiómero gira el plano de luz polarizada en una dirección y su compuesto de imagen especular gira el plano de luz polarizada en la dirección opuesta.

El término "racémico" se refiere a una mezcla de partes iguales de enantiómeros y cuya mezcla es ópticamente inactiva.

El término "resolución" se refiere a la separación, concentración o reducción de una de las dos formas enantioméricas de una molécula.

La presente descripción abarca los solvatos de los compuestos de la invención. Los solvatos típicamente no alteran significativamente la actividad fisiológica o la toxicidad de los compuestos, y como tales pueden funcionar como equivalentes farmacológicos. El término "solvato" como se usa en la presente descripción es una combinación, asociación física y/o solvatación de un compuesto de la presente descripción con una molécula de disolvente, por ejemplo, un disolvato, monosolvato o hemisolvato, donde la relación de la molécula de disolvente al compuesto de la presente descripción es aproximadamente 2:1, aproximadamente 1:1 o aproximadamente 1:2, respectivamente. Esta asociación física implica diversos grados de enlace iónico y covalente, incluido el enlace de hidrógeno. En determinados casos, el solvato puede aislarse, como cuando se incorporan una o más moléculas de disolvente en la red cristalina de un sólido cristalino. Por lo tanto, el "solvato" abarca tanto la fase de solución como los solvatos aislables. Los compuestos de la invención pueden estar presentes como formas solvatadas con un disolvente farmacéuticamente aceptable, tal como el agua, el metanol, el etanol y similares, y se pretende que la descripción incluya las formas tanto solvatadas como no solvatadas de los compuestos de la invención. Un tipo de solvato es un hidrato. Un "hidrato" se refiere a un subgrupo particular de solvatos donde la molécula disolvente es el agua. Los solvatos típicamente pueden funcionar como equivalentes farmacológicos. La preparación de los solvatos se conoce en la técnica. Ver, por ejemplo, M. Caira y otros, *J. Pharmaceut. Sci.*, 93(3):601-611 (2004); E.C. van Tonder y otros, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 5(1):Article 12 (2004); y A.L. Bingham y otros, *Chem. Commun.* 603-604 (2001). Un proceso típico, no limitante, de preparación de un solvato implicaría disolver un compuesto de la invención en un disolvente deseado (orgánico, agua o una mezcla de estos) a temperaturas de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C, y luego enfriar la solución a una velocidad suficiente para formar los cristales, y aislar los cristales por métodos conocidos, por ejemplo, la filtración. Pueden usarse las técnicas analíticas como la espectroscopia infrarroja para confirmar la presencia del disolvente en un cristal del solvato.

El término "profármaco" se refiere a un compuesto, que es un precursor inactivo de un compuesto, que se convierte en su forma activa en el cuerpo por procesos metabólicos normales. El diseño de profármacos se discute generalmente en Hardma y otros, (Eds.), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª ed., pp. 11-16 (1996). Se proporciona una discusión exhaustiva en Higuchi y otros, Prodrugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14, ASCD Symposium Series, y en Roche (ed.), Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association y Pergamon Press (1987). Para ilustrar, los profármacos pueden convertirse en una forma farmacológicamente activa a través de la hidrólisis de, por ejemplo, un enlace éster o amida, mediante la introducción o la exposición de ese modo de un grupo funcional en el producto resultante. Los profármacos pueden diseñarse para reaccionar con un compuesto endógeno para formar un conjugado soluble en agua que mejora aún más las propiedades farmacológicas del compuesto, por ejemplo, aumento de la vida media circulatoria. Alternativamente, los profármacos pueden diseñarse para sufrir modificaciones covalentes en un grupo funcional con, por ejemplo, el ácido glucurónico, el sulfato, el glutatión, los aminoácidos o el acetato. El conjugado resultante puede inactivarse y excretarse en la orina, o hacerse más potente que el compuesto original. Los conjugados de alto peso molecular también pueden excretarse en la bilis, someterse a escisión enzimática y liberarse nuevamente en la circulación, aumentando así de manera efectiva la vida media biológica del compuesto administrado originalmente.

La descripción instantánea también incluye los compuestos que difieren solo en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente, por ejemplo, el reemplazo de hidrógeno con deuterio o tritio, o el reemplazo de un carbono por carbono enriquecido con  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$ . Los compuestos de la presente invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen tales compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar radiomarcados con isótopos radiactivos, como por ejemplo tritio ( $^3\text{H}$ ), yodo-125 ( $^{125}\text{I}$ ) o carbono-14 ( $^{14}\text{C}$ ). Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, sean radiactivas o no, se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

La presente descripción abarca además las sales de los compuestos de la invención, incluidas las sales no tóxicas farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de las sales de adición farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos y las sales básicas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales metálicas tales como sal de sodio, sal de potasio, sal de cesio y similares; metales alcalinotérreos tales como sal de calcio, sal de magnesio y similares; sales de aminas orgánicas tales como sal de trietilamina, sal de piridina, sal de picolina, sal de etanolamina, sal de trietanolamina, sal de dicitclohexilamina, sal de N,N'-dibenciletilendiamina y similares; sales de ácidos inorgánicos tales como clorhidrato, bromhidrato, fosfato, sulfato y similares; sales de ácidos orgánicos tales como citrato, lactato, tartrato, maleato, fumarato, mandelato, acetato, dicloroacetato, trifluoroacetato, oxalato, formiato, succinatos, palmoatos, benzoatos, salicilatos, ascorbato, glicerofosfatos, cetoglutaratatos y similares; sulfonatos tales como metanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y similares; sales de aminoácidos naturales tales como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, norleucina, tirosina, cistina, cisteína, metionina, prolina, hidroxiprolina, histidina, ornitina, lisina, arginina y serina; y sales de aminoácidos no naturales tales como isómeros D o aminoácidos sustituidos; sales de guanidina; y sales de guanidina sustituida en donde los sustituyentes se seleccionan de sales de nitro, amino, alquilo, alquenilo, alquinilo, amonio o amonio sustituido y sales de aluminio.

El término "inhibidor selectivo", como se aplica a un agente biológicamente activo, se refiere a la capacidad del agente para reducir selectivamente la actividad de señalización del objetivo en comparación con la actividad de señalización fuera del objetivo, a través de la interacción directa o indirecta con el objetivo.

El término "inhibidor selectivo de PI3K $\delta$ " se refiere al Compuesto A como se define en la presente descripción, que inhibe selectivamente la actividad de la isoforma PI3K $\delta$  de forma más efectiva que otras isoformas de la familia PI3K ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). Por ejemplo, un compuesto de la Fórmula A puede ser un compuesto que exhibe una concentración inhibitoria del 50 % ( $\text{IC}_{50}$ ) con respecto a la PI3-quinasa tipo  $\delta$  que es al menos 20 veces menor que la  $\text{CI}_{50}$  del inhibidor con respecto al resto de las otras isoformas de PI3K (es decir,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ).

La inhibición de PI3K $\delta$  puede ser de beneficio terapéutico en el tratamiento de diversas afecciones, por ejemplo, afecciones caracterizadas por una respuesta inflamatoria que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades alérgicas y enfermedades artríticas. Es importante destacar que la inhibición de la función de PI3K $\delta$  no parece afectar las funciones biológicas tales como la viabilidad y la fertilidad.

La "respuesta inflamatoria", como se usa en la presente descripción, se caracteriza por enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor (es decir, inflamación) e implica típicamente lesión o destrucción del tejido. Una respuesta inflamatoria por lo general es una respuesta de protección, localizada, provocada por una lesión o destrucción de tejidos, que sirve para destruir, diluir o aislar (secuestrar) tanto el agente nocivo como el tejido lesionado. Las respuestas inflamatorias se asocian notablemente con la afluencia de leucocitos y/o la quimiotaxis de leucocitos (por ejemplo, neutrófilos). Las respuestas inflamatorias pueden ser el resultado de la infección con organismos y virus patógenos, medios no infecciosos tales como trauma o reperusión después de un infarto de miocardio o accidente cerebrovascular, respuestas inmunitarias a antígenos extraños y enfermedades autoinmunitarias. Las respuestas inflamatorias susceptibles al tratamiento de acuerdo con la invención abarcan las afecciones asociadas con reacciones

del sistema de defensa específico, así como también afecciones asociadas con reacciones del sistema de defensa no específico.

5 Los métodos terapéuticos que se proporcionan en la presente descripción incluyen los métodos para el tratamiento de las afecciones asociadas con la activación de células inflamatorias. La "activación de células inflamatorias" se refiere a la inducción por un estímulo (que incluye, pero no se limita a, citocinas, antígenos o autoanticuerpos) de una respuesta celular proliferativa, la producción de mediadores solubles (que incluye, pero no se limita a citocinas, radicales de oxígeno, enzimas, prostanoïdes o aminos vasoactivas), o la expresión en la superficie celular de nuevos o mayores números de mediadores (que incluyen, pero no se limitan a, los principales antígenos de histocompatibilidad o las moléculas de adhesión celular) en las células inflamatorias (que incluyen, pero no se limitan a, monocitos, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, granulocitos (leucocitos polimorfonucleares, que incluye neutrófilos, basófilos y eosinófilos), mastocitos, células dendríticas, células de Langerhans y células endoteliales). Los expertos en la técnica apreciarán que la activación de uno, o una combinación, de estos fenotipos en estas células puede contribuir al inicio, perpetuación o exacerbación de una afección inflamatoria.

15 El término "enfermedad autoinmunitaria", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier grupo de trastornos en los que la lesión del tejido se asocia con respuestas humorales o mediadas por células a los propios constituyentes del cuerpo.

20 El término "rechazo de trasplante", como se usa en la presente descripción, se refiere a una respuesta inmunitaria dirigida contra el tejido injertado (que incluye órganos o células, por ejemplo, la médula ósea, caracterizada por una pérdida de la función de los tejidos injertados y circundantes, dolor, hinchazón, leucocitosis y trombocitopenia).

25 El término "enfermedad alérgica", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier síntoma, daño al tejido o pérdida de la función del tejido resultante de la alergia.

El término "enfermedad artrítica", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier enfermedad que se caracteriza por lesiones inflamatorias de las articulaciones atribuibles a una variedad de etiologías.

30 El término "dermatitis", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquiera de una gran familia de enfermedades de la piel que se caracterizan por la inflamación de la piel atribuible a una variedad de etiologías.

35 El término "efecto sinérgico", como se usa en la presente descripción, se refiere a un efecto terapéutico superior al aditivo producido por una combinación de compuestos en donde el efecto terapéutico obtenido con la combinación excede los efectos aditivos que de otro modo resultarían de la administración individual de los compuestos solos. Las modalidades de la invención incluyen los métodos para producir un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer hematológico, en donde dicho efecto es al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 100 %, al menos el 200 %, al menos el 500 % o al menos el 1000 % mayor que el efecto aditivo correspondiente.

40 "Sinergia terapéutica", como se usa en la presente descripción, significa que una combinación de un anticuerpo anti-CD20 con el Compuesto A produce un efecto terapéutico en el tratamiento que es mayor que los efectos aditivos del anticuerpo anti-CD20 y el inhibidor selectivo de PI3Kδ cuando cada uno se usa solo.

45 Como se usa en la presente descripción y las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen las formas plurales a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera.

50 Se entiende que siempre que se describan las modalidades en la presente descripción con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan las modalidades análogas que se describen en los términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

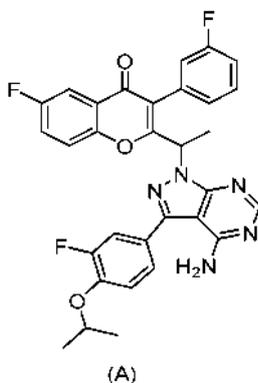
## II. Inhibidor selectivo de PI3Kδ

55 Como se proporciona en la presente descripción, el inhibidor selectivo de PI3Kδ usado en combinación con los anticuerpos anti-CD20 y los fragmentos de unión al antígeno de estos es un compuesto de la Fórmula A:

5

10

15



y un estereoisómero de este, las sales farmacéuticamente aceptables o los solvatos de este.

20

En una modalidad, el Compuesto A usado en combinación con los anticuerpos anti-CD20 y los fragmentos de unión al antígeno de estos, es (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H- pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, las sales farmacéuticamente aceptables, o los solvatos de este. Este estereoisómero también se denomina en la presente descripción "isómero S de un compuesto de la Fórmula A", "isómero S", "TGR-1202" y "RP 5307".

25

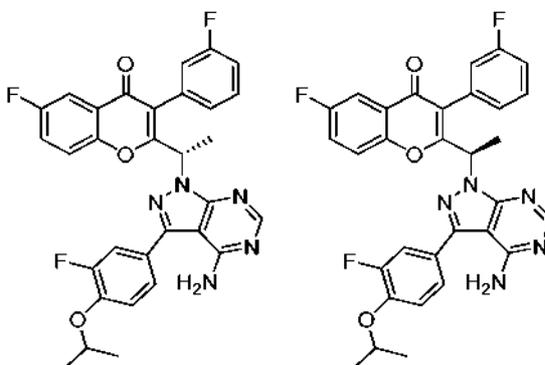
En otra modalidad, el Compuesto A usado en combinación con los anticuerpos anti-CD20 y los fragmentos de unión al antígeno de estos, es (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H- pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, las sales farmacéuticamente aceptables, o los solvatos de este.

30

Las estructuras químicas de estos compuestos se muestran a continuación:

35

40



45

### III. Anticuerpos anti-CD20

50

El CD20 es una fosfoproteína con cuatro dominios transmembrana que se expresa predominantemente en células pre-B y en células B periféricas maduras en humanos y ratones. En humanos, el CD20 también se expresa de manera fuerte y homogénea en la mayoría de las neoplasias de células B maduras.

Como se proporciona en la presente descripción, los anticuerpos anti-CD20 y los fragmentos de unión al antígeno de estos pueden usarse en combinación con el inhibidor selectivo de PI3Kδ.

55

Se conocen varios anticuerpos anti-CD20, que incluyen, por ejemplo, ublituximab rituximab, ofatumumab (Hu-Max; Intracel), ocrelizumab, veltuzumab, GA101 (obinutuzumab), AME-133v (Applied Molecular Evolution), ocaratuzumab (Mentrik Biotech), PRO131921, tositumomab, ibritumomab-tiuxetan, hA20 (Immunomedics, Inc.), BLX-301 (Biolex Therapeutics), Reditux (Dr. Reddy's Laboratories) y PRO70769 (que se describe en el documento WO2004/056312).

60

El ublituximab (Utuxin™, LFB-R603, TG20, EMAB603) es un anticuerpo monoclonal que se dirige a un epítipo específico y único en CD20 y que se ha diseñado por bioingeniería para mejorar la potencia y la actividad clínica.

65

El rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano diseñado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20. El rituximab es el anticuerpo llamado "C2B8" en la patente de los Estados Unidos núm. 5,736,137. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo rituximab y los métodos ilustrativos para su producción mediante la expresión

recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO) se describen en la patente de los Estados Unidos núm. 5,736,137.

5 El ofatumumab es un anticuerpo monoclonal humano anti-CD20 IgG1K. Los estudios indican que el ofatumumab se disocia del CD20 a una velocidad más lenta en comparación con el rituximab y se une a un epítipo proximal a la membrana. Zhang y otros, *Mabs* 1: 326-331 (2009). El mapeo de epítopos ha indicado que el ofatumumab se une a un epítipo ubicado más cerca del extremo N-terminal de CD20 en comparación con la ubicación objetivo del rituximab e incluye un bucle extracelular del antígeno.

10 Por lo tanto, en algunas modalidades, el anticuerpo anti CD-20 o el fragmento de este se selecciona del grupo que consiste en los anticuerpos que se unen al mismo epítipo que ublituximab rituximab, ofatumumab, ocrelizumab, veltuzumab, GA101, AME-133v, PRO131921, tositumomab, hA20 o PRO70769. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de este es ublituximab, rituximab, ofatumumab, ocrelizumab, veltuzumab, GA101, AME-133v, PRO131921, tositumomab, hA20, PRO70769, o un fragmento de este.

15 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de este se une al mismo epítipo que el ublituximab. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de este se une a una secuencia que comprende los aminoácidos N153-S179 de CD20. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de este se une a un epítipo discontinuo en los aminoácidos N153-S179 de CD20.

20 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de este se une al CD20 con una afinidad caracterizada por una constante de disociación KD menor que aproximadamente  $10^{-7}$  M, menor que aproximadamente  $10^{-8}$  M o menor que aproximadamente  $10^{-9}$  M. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de este se une al CD20 con una afinidad caracterizada por una constante de disociación KD de  $10^{-10}$  a  $10^{-9}$  M. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de este se une al CD20 con una afinidad caracterizada por una constante de disociación KD de  $0,7 \times 10^{-9}$  M. Como se usa en el contexto de las constantes de disociación de unión a anticuerpos, el término "aproximadamente" permite el grado de variación inherente en los métodos usados para medir la afinidad de los anticuerpos. Por ejemplo, dependiendo del nivel de precisión de la instrumentación usada, el error estándar basado en el número de muestras medidas y el error de redondeo, el término "aproximadamente  $10^{-2}$  M" podría incluir, por ejemplo, de 0,05 M a 0,005 M.

30 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 exhibe una alta afinidad por Fc-gammaRIII (CD16). En algunas modalidades, como resultado de su alta afinidad por la región Fc del anticuerpo a CD16, dichos anticuerpos no se desplazan por los anticuerpos policlonales IgG, especialmente por la IgG presente en el suero sanguíneo. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a CD16 (por ejemplo, expresado en un macrófago) con una afinidad de al menos  $2 \times 10^6$  M<sup>-1</sup>, al menos  $2 \times 10^7$  M<sup>-1</sup>,  $2 \times 10^8$  M<sup>-1</sup> o  $2 \times 10^7$  M<sup>-1</sup>, por ejemplo, según se determinó por el análisis Scatchard o la tecnología BIAcore (tecnología basada en la resonancia de plasmón superficial sin marcaje).

35 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 exhibe un patrón de glicosilación caracterizado por un bajo contenido de fucosa en su región Fc. Por ejemplo, en algunas modalidades, una composición comprende los anticuerpos anti-CD20 en los que los anticuerpos comprenden cadenas de azúcar unidas a N-glucósidos unidas en el sitio de glicosilación de Fc-gamma (Asn 297, numeración de la UE), en donde entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósidos de todos los anticuerpos de la composición, el contenido de fucosa es menor que el 65 %, menor que el 60 %, menor que el 55 %, menor que el 50 %, menor que el 45 % o menor que el 40 %. En algunas modalidades, entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósidos de todos los anticuerpos de la composición, el contenido de fucosa es del 15 al 45 % o del 20 al 40 %.

40 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 exhibe una potente citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos *in vitro* (ADCC). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 produce una meseta ADCC de al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 25 % o al menos aproximadamente el 30 % a una concentración de 50 ng/ml mediante el uso de las células asesinas naturales (NK) de donantes sanos. Las técnicas para medir la ADCC se conocen en la técnica y se proporcionan, por ejemplo, en de Romeauf y otros, *British Journal of Hematology* 140: 635-643 (2008). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 produce una meseta ADCC a aproximadamente el 35 % a una concentración de 50 ng/ml mediante el uso de las células NK de donantes sanos.

45 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 puede disminuir la actividad de NF-kappa-B. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 puede disminuir la expresión de SNAIL. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 puede aumentar la actividad de RKIP. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 puede aumentar la actividad de PTEN. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 puede aumentar la sensibilización de una célula a la apoptosis por TRAIL.

50 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 se optimiza para Fc-gamma-RIIIA (CD16). Los anticuerpos capaces de activar los receptores Fc de tipo III y que tienen una estructura particular de glucano se han descrito, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos núm. 7,931,895. Por lo tanto, en algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 se modifica en Asn 297 (numeración de la UE) con N-glucosilaciones del tipo biantenarico y/u oligomanósido como se

describe en la patente de los Estados Unidos núm. 7,931,895. Los métodos para producir anticuerpos con fuerte afinidad por el receptor CD16 de las células efectoras del sistema inmunitario se proporcionan, por ejemplo, en la solicitud publicada de los Estados Unidos núm. 2005/0271652.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 tiene una alta actividad de ADCC. Los métodos para producir anticuerpos con alta actividad de ADCC se proporcionan, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos núm. 7,713,524.

El ublituximab comprende las secuencias de anticuerpos proporcionadas a continuación:

10

CDR1 de la cadena pesada variable: Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn (SEQ ID NO: 1)  
 CDR2 de la cadena pesada variable: Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr (SEQ ID NO: 2)  
 CDR3 de la cadena pesada variable: Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr (SEQ ID NO: 3)

15 Cadena pesada variable:

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys  
 Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys  
 20 Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp  
 Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ser  
 Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe  
 Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val  
 Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:4)

25 Cadena pesada constante:

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 30 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp  
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 35 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 40 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO: 5)

45

CDR1 de la cadena ligera variable: Ser Ser Val Ser Tyr (SEQ ID NO: 6)  
 CDR2 de la cadena ligera variable: Ala Thr Ser (SEQ ID NO: 7)  
 CDR3 de la cadena ligera variable: Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr (SEQ ID NO: 8)

50 Cadena ligera variable:

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val  
 Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys  
 55 Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val  
 Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr IleSer Arg  
 Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys (SEQ ID NO: 9)

60 Cadena ligera constante:

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

## ES 2 813 343 T3

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys (SEQ ID NO: 10)

- 5 Por lo tanto, en algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (dominio VH), en donde al menos una (es decir, una, dos o tres) de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o idéntica a la región CDR1, CDR2 o CDR3 de las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 o 3, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este que comprende el dominio VH puede unirse específica o preferentemente a CD20.
- 10 En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (dominio VH), en donde al menos una (es decir, una, dos o tres) de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones conservadoras de aminoácidos, a la región CDR1, CDR2 o CDR3 de las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 o 3, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este que comprende el dominio VH puede unirse específica o preferentemente a CD20.
- 15 En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de VH de la SEQ ID NO: 4, en donde un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, una variante, o un derivado de este que comprende el dominio VH puede unirse específica o preferentemente a CD20.
- 20 En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende las SEQ ID NO: 4 y 5, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este que comprende la cadena pesada puede unirse específica o preferentemente a CD20.
- 25 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina (dominio VL), en donde al menos una (es decir, una, dos o tres) de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o idéntica a la región CDR1, CDR2 o CDR3 de las secuencias SEQ ID NO: 6, 7 u 8, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este que comprende el dominio VL puede unirse específica o preferentemente a CD20.
- 30 En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina (dominio VL), en donde al menos una (es decir, una, dos o tres) de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones conservadoras de aminoácidos, en la región CDR1, CDR2 o CDR3 de las SEQ ID NO: 6, 7 u 8, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este que comprende el dominio VL puede unirse específica o preferentemente a CD20.
- 35 En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de VL de la SEQ ID NO: 9, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este que comprende el dominio VL puede unirse específica o preferentemente a CD20.
- 40 En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende las SEQ ID NO: 9 y 10, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este que comprende la cadena ligera puede unirse específica o preferentemente a CD20.
- 45 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (dominio VH) y un dominio variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina (dominio VL), en donde al menos una (es decir, una, dos o tres) de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o idéntica a la región CDR1, CDR2 o CDR3 de las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 o 3, en donde al menos una (es decir, una, dos o tres) de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o idéntica a la región CDR1, CDR2 o CDR3 de las secuencias SEQ ID NO: 6, 7 u 8, y en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este que comprende el dominio VH y VL puede unirse específica o preferentemente a CD20.
- 50 En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (dominio VH), y un
- 55
- 60
- 65

dominio variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina (dominio VL), en donde al menos una (es decir, una, dos o tres) de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones conservadoras de aminoácidos, a la región CDR1, CDR2 o CDR3 de las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 o 3, en donde al menos una (es decir, una, dos o tres) de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto por 1, 2, 3, 4, o 5 sustituciones conservadoras de aminoácidos, a la región CDR1, CDR2 o CDR3 de las SEQ ID NO: 6, 7 u 8, y en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este que comprende VH y VL puede unirse específica o preferentemente a CD20.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende la región CDR1, CDR2 y CDR3 de VH de las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y la región CDR1, CDR2 y CDR3 de VL de las secuencias SEQ ID NO: 6, 7 y 8.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio VH y un dominio VL, en donde el VH tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de VH de la SEQ ID NO: 4, en donde el dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de VL de la SEQ ID NO: 9, y en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este que comprende el dominio VH y VL puede unirse específica o preferentemente a CD20.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende el VH de la SEQ ID NO: 4 y el VL de la SEQ ID NO: 9.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende el VH de la SEQ ID NO: 4 y el VL de la SEQ ID NO: 9.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende las SEQ ID NO: 4 y 5, en donde la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende las SEQ ID NO: 9 y 10, y en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este que comprende la cadena pesada puede unirse específica o preferentemente a CD20.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena pesada que comprende las SEQ ID NO: 4 y 5 y una cadena ligera que comprende las SEQ ID NO: 9 y 10.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 es el ublituximab.

En algunas modalidades, el anticuerpo es el EMAB603 (véase el documento WO2006/064121), producido por el clon R603-12D11, depositado en la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes con el número de acceso CNCM 1-3529.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 se produce en la línea celular YB2/0 de hibridoma de rata (célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, registrada en la American Type Culture Collection con el número ATCC CRL-1662).

La estructura química precisa de un anticuerpo capaz de unirse específicamente a CD20 y retener la actividad deseada depende de varios factores. Como los grupos amino y carboxilo ionizables están presentes en la molécula, puede obtenerse un polipéptido particular como una sal ácida o básica, o en forma neutra. Todas las preparaciones que retienen su actividad biológica cuando se colocan en condiciones ambientales adecuadas se incluyen en la definición de anticuerpos anti-CD20 como se usa en la presente descripción. Además, la secuencia de aminoácidos primaria del anticuerpo puede aumentarse mediante la derivatización mediante el uso de restos de azúcar (glucosilación) o mediante otras moléculas suplementarias tales como lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. También puede aumentarse mediante la conjugación con sacáridos. Determinados aspectos de dicho aumento se logran mediante sistemas de procesamiento postraduccionales del huésped productor; otras modificaciones de este tipo pueden introducirse *in vitro*. En cualquier caso, tales modificaciones se incluyen en la definición de un anticuerpo anti-CD20 usado en la presente descripción, siempre que no se destruyan las propiedades deseadas del anticuerpo anti-CD20. Se espera que tales modificaciones puedan afectar cuantitativa o cualitativamente la actividad, ya sea por el aumento o la disminución de la actividad del polipéptido, en los diversos ensayos. Además, los residuos de aminoácidos individuales en la cadena pueden modificarse por oxidación, reducción u otra derivatización, y el polipéptido puede escindirarse para obtener los fragmentos que retienen la actividad. Tales alteraciones que no destruyen las propiedades

deseadas (por ejemplo, la especificidad de unión por CD20) no eliminan la secuencia de polipéptidos de la definición de anticuerpos anti-CD20 de interés como se usa en la presente descripción.

5 La técnica proporciona una guía sustancial con respecto a la preparación y el uso de las variantes de polipéptidos. Al preparar variantes de una molécula de unión anti-CD20, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, una variante o un derivado de este, un experto en la técnica puede determinar fácilmente qué modificaciones a la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de la proteína nativa resultarán en una variante que es adecuada para usar como un componente terapéuticamente activo de una composición farmacéutica.

10 Es posible introducir las mutaciones solo en las regiones marco o solo en las regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones sin sentido, silenciosas o neutrales, es decir, no tienen, o tienen poco efecto sobre la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones o mejorar la producción de anticuerpos de un hibridoma. Alternativamente, las mutaciones sin sentido no neutrales pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Es probable que la ubicación de la mayoría de las mutaciones sin sentido neutrales y silenciosas se encuentre en las regiones marco, mientras que es probable que la ubicación de la mayoría de las mutaciones sin sentido neutrales se encuentre en las CDR, aunque esto no es un requisito absoluto. Un experto en la técnica sería capaz de diseñar y probar las moléculas mutantes con propiedades deseadas, tales como ninguna alteración en la actividad de unión al antígeno o alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de manera rutinaria y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (por ejemplo, la capacidad de unirse inmunoespecíficamente al menos a un epítipo de un polipéptido CD20) puede determinarse mediante el uso de las técnicas que se describen en la presente descripción o mediante la modificación de manera rutinaria de las técnicas conocidas en la técnica.

25 En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD20 comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) optimizada. Por "CDR optimizada" se pretende que la CDR se haya modificado y se hayan seleccionado las secuencias optimizadas en base a la afinidad de unión sostenida o mejorada y/o la actividad anti-CD20 que se imparte a un anticuerpo anti-CD20 que comprende la CDR optimizada. La "actividad anti-CD20" puede incluir, por ejemplo, la actividad que modula una o más de las siguientes actividades asociadas con CD20, por ejemplo, la capacidad de inducir apoptosis de las células B, la capacidad de inducir ADCC contra las células B (por ejemplo, células de CLL), la capacidad de inhibir la actividad de NF-kappaB, la capacidad de inhibir la expresión de Snail, la capacidad de desreprimir RKIP, la capacidad de desreprimir PTEN, la capacidad de sensibilizar una célula tumoral a la apoptosis por TRAIL o cualquier otra actividad asociada con CD20. Tales actividades se describen, por ejemplo, en Baritaki y otros, International Journal of Oncology 38: 1683-1694 (2011). Las modificaciones pueden implicar el reemplazo de residuos de aminoácidos dentro de la CDR de manera que un anticuerpo anti-CD20 retiene la especificidad para el antígeno CD20 y tiene una afinidad de unión mejorada y/o una actividad anti-CD20 mejorada.

40 En determinados anticuerpos anti-CD20, o fragmentos de unión al antígeno de estos, al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante se han eliminado o alterado de otro modo para proporcionar las características bioquímicas deseadas tales como las funciones efectoras reducidas, la capacidad de dimerizar no covalentemente, mayor capacidad de localización en el sitio de un tumor, la semivida sérica reducida o la semivida sérica aumentada en comparación con un anticuerpo completo inalterado de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, determinados anticuerpos son anticuerpos de dominios eliminados que comprenden una cadena de polipéptidos similar a una cadena pesada de la inmunoglobulina, pero que carecen de al menos una porción de uno o más dominios de la cadena pesada. Por ejemplo, en determinados anticuerpos, se eliminará un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo, se eliminará todo o parte del dominio CH2.

50 En determinados anticuerpos anti-CD20 o fragmentos de unión al antígeno de estos, la porción Fc puede mutarse para disminuir la función efectora mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, las modificaciones de la región constante pueden usarse para modificar los enlaces disulfuro o los restos de oligosacáridos que permiten una localización mejorada debido a una especificidad al antígeno o flexibilidad del anticuerpo aumentada. El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones pueden medirse y cuantificarse fácilmente mediante el uso de las técnicas inmunológicas que se conocen bien sin experimentación excesiva.

60 En determinadas modalidades, un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este no provocará una respuesta inmunitaria perjudicial en el animal a tratar, por ejemplo, en un humano. En una modalidad, los anticuerpos anti-CD20 o los fragmentos de unión al antígeno de estos pueden modificarse para reducir su inmunogenicidad mediante el uso de las técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser humanizados, primatizados, desinmunizados o pueden fabricarse anticuerpos quiméricos. Estos tipos de anticuerpos se derivan de un anticuerpo no humano, típicamente un anticuerpo murino o de primates, que retiene, o retiene sustancialmente, las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo original, pero que es menos inmunogénico en humanos. Esto puede lograrse mediante varios métodos, que incluyen (a) injertar los dominios variables no humanos completos en las regiones constantes humanas para generar los anticuerpos quiméricos; (b) injertar al menos una

parte de una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas en un marco humano y las regiones constantes con o sin retención de los residuos críticos del marco; o (c) trasplantar todos los dominios variables no humanos, pero "encubrirlos" con una sección similar a la humana mediante el reemplazo de los residuos superficiales. Dichos métodos se describen en Morrison y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855 (1984); Morrison y otros, Adv. Immunol. 44:65-92 (1988); Verhoeven y otros, Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31:169-217 (1994), y las patentes de los Estados Unidos núms. 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762 y 6,190,370.

Las formas modificadas de los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno de estos pueden prepararse a partir de anticuerpos originales o precursores completos mediante el uso de las técnicas conocidas en la técnica.

Los anticuerpos anti-CD20 o los fragmentos de unión al antígeno de estos pueden prepararse o fabricarse mediante el uso de las técnicas conocidas en la técnica. En determinadas modalidades, las moléculas de anticuerpo o los fragmentos de estos se "producen de forma recombinante", es decir, se producen mediante el uso de la tecnología del ADN recombinante. Los anticuerpos anti-CD20 o los fragmentos de estos pueden generarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, que incluyen la generación de anticuerpos policlonales o la preparación de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, a través del hibridoma o la presentación en fago.

Puede usarse una variedad de sistemas de vectores de expresión en el huésped para expresar las moléculas de anticuerpos. La célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión, el primer vector codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de los polipéptidos de la cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un solo vector que codifica los polipéptidos de la cadena pesada y ligera. En tales situaciones, la cadena ligera se coloca ventajosamente antes de la cadena pesada para evitar un exceso de la cadena pesada libre de tóxicos (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)). La célula huésped también puede transfectarse con un único vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y un polipéptido derivado de la cadena ligera. Las secuencias de codificación para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

El vector o los vectores de expresión pueden transferirse a una célula huésped mediante las técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan luego mediante las técnicas convencionales para producir un anticuerpo. Por lo tanto, se proporcionan las células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o una cadena pesada o ligera de este, operativamente unida a un promotor heterólogo. En determinados casos, para la expresión de los anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como las ligeras pueden coexpresarse en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa.

Los sistemas de expresión en el huésped representan los vehículos mediante los cuales las secuencias de codificación de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan las células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de codificación de nucleótidos apropiadas, expresar un anticuerpo CD20 *in situ*. Estos incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófagos recombinantes, vectores de expresión de ADN cósmido o ADN plasmídico que contienen las secuencias de codificación de anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen las secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen las secuencias de codificación de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BLK, 293, 3T3) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5K del virus vaccinia). Las células bacterianas como *Escherichia coli*, o las células eucariotas, por ejemplo, para la expresión de las moléculas completas de anticuerpo recombinante, se usan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamíferos, como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector como el principal elemento promotor genético temprano intermedio del citomegalovirus humano es un sistema de expresión efectivo para los anticuerpos (Foehking y otros, Gene 45:101 (1986); Cockett y otros, Bio/Technology 8:2 (1990)). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 se produce en una célula huésped que no es una célula CHO.

Una vez que un anticuerpo se ha expresado de forma recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la proteína A, y cromatografía de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 se produce por una línea celular de hibridoma de rata. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD20 se produce en YB2/0 (ATCC CRL-1662)

## Composiciones farmacéuticas

5 Un compuesto de la Fórmula A y los anticuerpos anti-CD20 pueden administrarse en cualquier orden o en cualquier intervalo según lo determine un experto en la técnica. Por ejemplo, un compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 pueden administrarse secuencialmente (en cualquier orden), simultáneamente o mediante cualquier combinación de administraciones secuenciales y simultáneas. Un compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 pueden administrarse en las mismas composiciones farmacéuticas o en composiciones farmacéuticas separadas.

10 La administración de la combinación, ya sea simultánea, secuencial (en cualquier orden) o ambas, puede realizarse de acuerdo con cualquier número de intervalos deseados de minutos (por ejemplo, 0-60 minutos), horas (por ejemplo, 0-24 horas), días (por ejemplo, 0-7 días), y/o semanas (por ejemplo, 0-52 semanas) según puede decidirlo y determinarlo un experto en la técnica. La dosificación también puede variar con el tiempo, por ejemplo, comenzar con una dosis semanal durante un período de tiempo (por ejemplo, durante 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas) seguido de una dosificación cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas o una vez cada seis semanas.

20 El compuesto de la Fórmula A y los anticuerpos anti-CD20 pueden formularse en composiciones farmacéuticas para la administración a mamíferos, incluidos los humanos. Las composiciones farmacéuticas comprenden portadores farmacéuticamente aceptables, que incluyen, por ejemplo, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas como albúmina sérica humana, sustancias amortiguadoras como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos como sulfato de protamina, fosfato de hidrógeno disódico, fosfato de hidrógeno y potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

30 Las composiciones pueden administrarse por cualquier método adecuado, por ejemplo, por vía parenteral, intraventricular, oral, por pulverización por inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. En algunas modalidades, el compuesto de la Fórmula A puede administrarse por vía oral. El término "parenteral", como se usa en la presente descripción, incluye las técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal.

35 Las formulaciones parenterales pueden ser una dosis de bolo única, una infusión o una dosis de bolo de carga seguida de una dosis de mantenimiento. Estas composiciones pueden administrarse a intervalos específicos fijos o variables, por ejemplo, una vez al día, o "según sea necesario". El anticuerpo anti-CD20 puede administrarse por vía intravenosa (IV).

40 Determinadas composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral en una forma de dosificación aceptable que incluye, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. Determinadas composiciones farmacéuticas también pueden administrarse por inhalación o aerosol nasal. Dichas composiciones pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

50 Una dosis específica y un régimen de tratamiento para cualquier paciente en particular dependerán de una variedad de factores, que incluyen los agentes terapéuticos particulares usados, la edad del paciente, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta, y el momento de la administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se está tratando. El juicio de tales factores por parte de los cuidadores médicos está dentro de la habilidad común en la técnica. La cantidad también dependerá del paciente individual a tratar, la vía de administración, el tipo de formulación, las características del compuesto usado, la gravedad de la enfermedad y el efecto deseado. La cantidad usada puede determinarse mediante principios farmacológicos y farmacocinéticos que se conocen bien en la técnica.

55 El anticuerpo anti-CD20 puede administrarse a una dosis menor que 187,5 mg/m<sup>2</sup>, 75 mg/m<sup>2</sup>, 37,5 mg/m<sup>2</sup>, 15 mg/m<sup>2</sup>, 7,5 mg/m<sup>2</sup>, 3,75 mg/m<sup>2</sup>. La dosis administrada puede ser de 187,5 mg/m<sup>2</sup> a 75 mg/m<sup>2</sup>, de 75 mg/m<sup>2</sup> a 37,5 mg/m<sup>2</sup>, de 75 mg/m<sup>2</sup> a 15 mg/m<sup>2</sup>, de 75 mg/m<sup>2</sup> a 7,5 mg/m<sup>2</sup>, o de 75 mg/m<sup>2</sup> a 3,75 mg/m<sup>2</sup>.

60 Un compuesto de la Fórmula A puede administrarse en un intervalo de dosis de 10 a 2500 mg/día, de 10 a 1500 mg/día, de 50 a 1000 mg/día, de 100 a 750 mg/día, de 150 a 500 mg/día. La dosis administrada puede ser de 200 a 400 mg por día. La dosis administrada puede ser de 500, 1000, 1500, 2000 o 2500 mg/día.

65 Los compuestos activos suplementarios también pueden incorporarse en las composiciones. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD20 y un compuesto de la Fórmula A pueden coformularse y/o coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como los agentes anticancerígenos.

IV. Kits

5 La presente invención proporciona los kits que comprenden un compuesto de la Fórmula A, los anticuerpos anti-CD20, y opcionalmente otros agentes y que pueden usarse para realizar los métodos que se describen en la presente descripción, y las combinaciones de estos. De acuerdo con las reivindicaciones, el kit comprende al menos un anticuerpo anti-CD20 y un compuesto de la Fórmula A.

10 Los kits farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de los compuestos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención, que incluyen un compuesto de la Fórmula A y/o uno o más anticuerpos anti-CD20 también se proporcionan en la presente descripción. Dichos kits también pueden incluir, por ejemplo, otros compuestos y/o composiciones, uno o varios dispositivos para administrar los compuestos y/o las composiciones, e instrucciones escritas en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos.

15 Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que los anticuerpos y un compuesto de la Fórmula A que se describen en la presente descripción pueden incorporarse fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que se conocen bien en la técnica.

20 Además se proporcionan los kits que comprenden (a) un compuesto de la Fórmula A, un anticuerpo anti-CD20, o una combinación de estos y (b) un agente anticancerígeno adicional. En determinadas modalidades, el agente anticancerígeno adicional es un agente quimioterapéutico.

25 V. Métodos de uso de las combinaciones de un compuesto de la Fórmula A y los anticuerpos anti-CD20

Las combinaciones de un compuesto de la Fórmula A y los anticuerpos anti-CD20 pueden usarse en los métodos de tratamiento de enfermedades o trastornos en un sujeto. Por lo tanto, de acuerdo con las reivindicaciones, se proporcionan los usos de un compuesto de la Fórmula A en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno asociado con la proliferación excesiva de células B, el cáncer o una enfermedad o un trastorno autoinmunitario, en donde un compuesto de la Fórmula A se va a administrar en combinación (por ejemplo, de forma secuencial o simultánea) con un anticuerpo anti-CD20. Además, también se proporcionan los usos de un anticuerpo anti-CD20 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno asociado con la proliferación excesiva de células B, el cáncer o una enfermedad o un trastorno autoinmunitario, en donde el anticuerpo anti-CD20 se va a administrar en combinación (por ejemplo, de forma secuencial o simultánea) con un compuesto de la Fórmula A. Además, se proporciona una combinación terapéutica que comprende: (i) un compuesto de la Fórmula A, un estereoisómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este; y (ii) un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este, para usar como un medicamento para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la proliferación excesiva de células B, el cáncer o una enfermedad o un trastorno autoinmunitario.

40 También se describe un método para inhibir la isoforma PI3K $\delta$  y/o el CD20 en un paciente mediante la administración a un paciente de una cantidad efectiva de una combinación de la presente invención.

45 También se describe un método para tratar, prevenir y/o inhibir una enfermedad, un trastorno o una afección mediada por PI3K $\delta$  y/o una enfermedad, un trastorno o una afección mediada por CD20 (tal como el cáncer u otra enfermedad o trastorno proliferativo) en un paciente mediante la administración al paciente de una cantidad efectiva de una combinación de la presente invención.

50 También se describe un método para tratar una enfermedad, un trastorno o una afección asociada a la isoforma PI3K $\delta$  y/o el CD20 en un paciente mediante la administración al paciente de una cantidad efectiva de una combinación de la presente invención. En una modalidad, la cantidad del compuesto administrado en una combinación es suficiente para tratar una enfermedad, un trastorno o una afección asociada a la isoforma PI3K $\delta$  y/o el CD20 por inhibición selectiva de PI3K $\delta$  y/o el CD20.

55 También se describe un método para tratar una enfermedad proliferativa mediante la administración a un paciente que necesita dicho tratamiento de una cantidad efectiva de al menos un compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo de la presente invención. En una modalidad, la cantidad del compuesto administrado en combinación es suficiente para tratar la enfermedad proliferativa por inhibición selectiva de PI3K $\delta$  y/o la inhibición de CD20.

60 También se describe un método para tratar una enfermedad proliferativa mediante la administración a un paciente que necesita dicho tratamiento de una cantidad efectiva de una combinación de la presente invención, en combinación adicional (de forma simultánea o secuencial) con al menos otro agente anticancerígeno. La cantidad del compuesto A administrada es suficiente para tratar (o facilitar el tratamiento de) la enfermedad proliferativa por inhibición selectiva de PI3K $\delta$ .

65

Las combinaciones de la presente invención son útiles en el tratamiento de una variedad de cánceres, que incluyen, pero no se limita a, los siguientes:

- 5 • carcinoma, que incluye el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón (incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas), esófago, vesícula biliar, útero, ovario, testículos, laringe, cavidad oral, tracto gastrointestinal (por ejemplo, esófago, estómago, páncreas), cerebro, cuello uterino, tiroides, próstata, sangre y piel (incluido el carcinoma de células escamosas);
- 10 • tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células pilosas y linfoma de Burkett;
- 15 • tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, que incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica;
- tumores de origen mesenquimatoso, que incluyen fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma;
- tumores del sistema nervioso central y periférico, que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; y
- 20 • otros tumores, que incluyen melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xenoderoma pigmentoso, queratoacantoma, cáncer folicular de tiroides y sarcoma de Kaposi.

25 Las combinaciones de la presente invención como moduladores de la apoptosis son útiles en el tratamiento, prevención e inhibición del cáncer (que incluyen, pero no se limitan a, los tipos mencionados anteriormente en la presente descripción).

30 Las combinaciones de la presente invención son útiles en la quimioprevención del cáncer. La quimioprevención implica inhibir el desarrollo del cáncer invasivo al bloquear el evento mutagénico iniciador, bloquear la progresión de las células premalignas que ya han sufrido un daño o inhibir la recaída tumoral. Los compuestos también son útiles para inhibir la angiogénesis y las metástasis tumorales. También se describe un método para inhibir la angiogénesis o las metástasis tumorales en un paciente mediante la administración de una cantidad efectiva de uno o más compuestos de la presente invención.

35 También se describe un método para tratar una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario (por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria), una enfermedad o un trastorno que implica inflamación (por ejemplo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, glomerulonefritis, enfermedades neuroinflamatorias, esclerosis múltiple, uveítis y trastornos del sistema inmunitario), el cáncer u otra enfermedad proliferativa, una enfermedad o un trastorno hepático o una enfermedad o un trastorno renal. El método incluye administrar una cantidad efectiva de una combinación de la presente invención.

40 Los ejemplos de trastornos inmunitarios que pueden tratarse mediante los compuestos de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, psoriasis, artritis reumatoide, vasculitis, enfermedad intestinal inflamatoria, dermatitis, osteoartritis, asma, enfermedad muscular inflamatoria, rinitis alérgica, vaginitis, cistitis intersticial, esclerodermia, osteoporosis, eczema, rechazo de injerto de trasplante alogénico o xenogénico (de órgano, médula ósea, células madre y otras células y tejidos), enfermedad de injerto contra huésped, lupus eritematoso, enfermedad inflamatoria, diabetes tipo I, fibrosis pulmonar, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, tiroiditis (por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto y autoinmunitaria), miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmunitaria, esclerosis múltiple, fibrosis quística, hepatitis crónica recurrente, cirrosis biliar primaria, conjuntivitis alérgica y dermatitis atópica.

45 También se describe un método para tratar la leucemia en un paciente mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una combinación de la presente invención. Por ejemplo, los métodos son efectivos para tratar la leucemia linfocítica crónica (CLL), el linfoma no Hodgkin (NHL), la leucemia mieloide aguda (AML), el mieloma múltiple (MM), el linfoma linfocítico pequeño (SLL) y el linfoma no Hodgkin indolente (I-NHL).

50 En los métodos de tratamiento mencionados anteriormente, pueden administrarse uno o más agentes activos adicionales con las combinaciones que se describen en la presente descripción. Por ejemplo, la combinación de la presente invención es útil para combinar (administrados juntos o secuencialmente) con tratamientos anticancerígenos conocidos tales como la radioterapia o con uno o más agentes citostáticos, citotóxicos o anticancerígenos, tales como, por ejemplo, los agentes interactivos de ADN, como el cisplatino o la doxorubicina; los inhibidores de la topoisomerasa II, tales como el etopósido; los inhibidores de la topoisomerasa I, tales como el CPT-11 o el topotecan; los agentes que interactúan con la tubulina, tales como el paclitaxel, el docetaxel o las epotilonas (por ejemplo, la ixabepilona), de origen natural o sintético; los agentes hormonales, tales como el tamoxifeno; los inhibidores de la timidilato sintasa, tales como el 5-fluorouracilo; y los antimetabolitos, tales como el metotrexato; otros inhibidores de la tirosina quinasa tales como Iressa y OSI-774; los inhibidores de la angiogénesis; los inhibidores de EGF; los inhibidores de VEGF; los inhibidores de CDK; los inhibidores de SRC; los inhibidores de c-Kit; los inhibidores de Her1/2 y los anticuerpos

5 monoclonales dirigidos contra los receptores de factores de crecimiento tales como el erbitux (EGF) y el herceptin (Her2); y otros moduladores de proteínas quinasas. El agente activo adicional también puede ser un inhibidor del proteasoma, Bortezomib (Velcade®), Carfilzomib (PR-171), PR-047, disulfiram, lactacistina, PS-519, eponemicina, epoxomicina, aclacinomicina, CEP-1612, MG-132, CVT-63417, PS-341, inhibidores de tripéptido de vinilsulfona, ritonavir, PI-083, (+/-)-7-metilomuralida, (-)-7-metilomuralida, lenalidomida (Revlimid®), o una combinación de estos.

10 Las combinaciones de la presente invención también son útiles para combinar (administradas juntas o secuencialmente) con uno o más fármacos antiinflamatorios esteroideos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) o derivados antiinflamatorios inmunitarios selectivos (ImSAID).

15 En una modalidad particular, el cáncer es una neoplasia hematológica y/o un tumor sólido. En otra modalidad particular, la neoplasia hematológica es la leucemia o el linfoma.

20 En algunas modalidades, el linfoma es una neoplasia de células B maduras (periférico). En modalidades específicas, la neoplasia de células B maduras se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica de células B/linfoma linfocítico pequeño; leucemia prolinfocítica de células B; linfoma linfoplasmocítico; linfoma de la zona marginal, como el linfoma esplénico de la zona marginal de células B (+/- linfocitos vellosos), el linfoma nodal de la zona marginal (+/- células B monocitoides) y el linfoma extranodal de la zona marginal de células B del tipo tejido linfoide asociado a mucosas (MALT); leucemia de células pilosas; mieloma de células plasmáticas/plasmacitoma; linfoma folicular, centro folicular; linfoma de células del manto; linfoma difuso de células B grandes (que incluyen linfoma mediastínico de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes y linfoma de efusión primaria); y linfoma de Burkitt/leucemia de células de Burkitt.

25 En algunas modalidades, el linfoma se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple (MM) y linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma folicular, macroglobulinemia de Waldenstrom (WM) o linfoma de células B y linfoma difuso de células B grande (DLBCL).

30 En una modalidad particular adicional, la leucemia se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica aguda/leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL). En algunas modalidades, el linfoma no Hodgkin (NHL) es el NHL agresivo o el NHL indolente. Los ejemplos de NHL agresivo incluyen neoplasias de células B, linfoma difuso de células B grandes, neoplasias de células T/NK, linfoma anaplásico de células grandes, linfomas periféricos de células T, leucemia/linfoma linfoblástico precursor de células B, leucemia/linfoma linfoblástico precursor de células T, linfoma de Burkitt, linfoma/leucemia de células T del adulto (HTLV1+), linfoma primario del SNC, linfoma de células del manto, trastorno linfoproliferativo postrasplante polimórfico (PTLD), linfoma relacionado con el SIDA, linfoma histiocítico verdadero y linfoma blástico de células NK. El tipo más común de NHL agresivo es el linfoma difuso de células B grandes. Los ejemplos no limitantes de NHL indolente incluyen el linfoma folicular, el linfoma linfocítico pequeño, el linfoma de la zona marginal (tal como el linfoma extranodal de la zona marginal (también llamado linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)), el linfoma nodal de la zona marginal de células B (linfoma monocitoide de células B), linfoma esplénico de la zona marginal) y linfoma linfoplasmocítico (macroglobulinemia de Waldenstrom). En algunas modalidades, un sujeto tiene NHL agresivo o NHL indolente.

40 En algunas modalidades, un paciente tiene una afección que se selecciona del grupo que consiste en linfoma de células del manto (MCL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular (FL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL), mieloma múltiple (MM) y linfoma de la zona marginal.

45 En algunas modalidades, un paciente tiene una afección recidivante o resistente. En una modalidad particular, el sujeto es resistente al tratamiento de la quimioterapia, o sufre una recaída después del tratamiento con la quimioterapia.

50 En algunas modalidades, el cáncer es resistente al tratamiento con el rituximab. En algunas modalidades, el cáncer muestra una respuesta reducida al tratamiento con el rituximab. En algunas modalidades, el sujeto se ha tratado previamente con el rituximab.

55 En una modalidad particular, los métodos comprenden reducir el nivel de actividad de NF-kappa-B, reducir la expresión de SNAIL, aumentar la actividad de RKIP, aumentar la actividad de PTEN, aumentar la sensibilidad del tumor a la apoptosis por TRAIL, reducir el nivel de actividad de PI3K $\alpha$  o una combinación de estas en un paciente.

60 En una modalidad particular, la combinación del compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 reduce las células B de la sangre total humana. En algunas modalidades, la combinación del compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 reduce las células B de la sangre total humana en mayor medida que el compuesto de la Fórmula A o el anticuerpo anti-CD20 reducen solos las células B de la sangre total humana. En algunas modalidades, la combinación del compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 reduce las células B de la sangre total humana en mayor medida que la suma de la reducción por el compuesto de la Fórmula A y la reducción por el anticuerpo anti-CD20.

65

En algunas modalidades, un compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 son para usar en un método de tratamiento de una enfermedad o un trastorno asociado con la proliferación excesiva de células B, en donde el método comprende la administración de un compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 a un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, un compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 se usan en un método para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la actividad excesiva de células B, en donde el método comprende la administración de un compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 a un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, un compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 se usan en un método para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con un número excesivo de células B, en donde el método comprende la administración de un compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20 a un sujeto que lo necesita.

Puede prepararse un compuesto de la Fórmula A mediante el uso de los métodos de síntesis generales que se describen en la publicación de la solicitud de patente internacional núm. WO 2011/055215 A2 y la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2011/0118257 A1, y la preparación de un compuesto específico es como se describe en la solicitud de patente provisional de la India núm. 2693/CHE/2012, presentada el 4 de julio de 2012, la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos, número de serie 61/691,586, presentada el 21 de agosto de 2012, el documento PCT/US2013/055434, presentado el 2 de julio de 2013 y el documento de los Estados Unidos núm. de serie 13/933,856, presentado el 2 de julio de 2013.

### Ejemplos

#### Síntesis del compuesto de la Fórmula A

A menos que se indique de cualquier otra manera, la purificación implica la cromatografía en columna mediante el uso de gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de éter de petróleo (hirviendo a 60-80 °C) y acetato de etilo o diclorometano y metanol de polaridad adecuada como las fases móviles. El término "TA" se refiere a temperatura ambiente (25-28 °C).

#### Producto intermedio 1: 2-(1-bromoetil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona

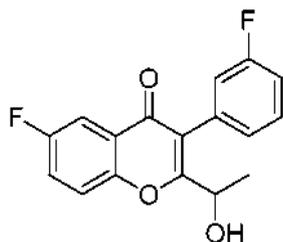
**Etapas-1** [1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)-2-(3-fluorofenil)etanona]: se disolvió ácido 3-fluorofenilacético (7,33 g, 47,56 mmol) en 25 ml de diclorometano. A esta mezcla, se añadieron cloruro de oxalilo (7,54 g, 59,46 mmol) y DMF (3 gotas) a 0 °C y se agitó durante 30 minutos. El disolvente se evaporó y se disolvió en 25 ml de diclorometano. A esta mezcla, se añadió 4-fluoroanisol (5,00 g, 39,64 mmol) y se enfrió hasta 0 °C. A 0 °C, se añadió AlCl<sub>3</sub> (7,95 g, 59,46 mmol) y la mezcla de reacción se calentó hasta TA y se agitó durante 12 horas. La mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de HCl 2 N, se extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un sólido incoloro (4,5 g, 45 % de rendimiento). <sup>1</sup>H-NMR (δ ppm, DMSO-D<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 11,34 (s, 1H), 7,75 (dd, J=9,4, 3,1 Hz, 1H), 7,42 (m, 2H), 7,12 (m, 3H), 7,05 (dd, J=9,0, 4,5 Hz, 1H), 4,47 (s, 2H).

**Etapas-2** [2-etil-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona]: la 1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)-2-(3-fluorofenil)etanona obtenida en la Etapa-1 (3,00 g, 12,08 mmol) se colocó en un matraz de fondo redondo y a esto se añadieron trietilamina (25 ml) y anhídrido propiónico (4,92 g, 37,82 mmol), y la mezcla se calentó a reflujo durante 24 horas. Después de enfriar hasta TA, la mezcla de reacción se acidificó mediante la adición de una solución de HCl 1N, se extrajo con acetato de etilo, se lavó con una solución de bicarbonato de sodio, se secó con sulfato de sodio y se concentró. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo (1,80 g, 52 % de rendimiento). <sup>1</sup>H-NMR (δ ppm, DMSO-D<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 7,80 (m, 1H), 7,76 (m, 2H), 7,51 (dd, J=8,0, 6,4 Hz), 7,22 (m, 1H), 7,18 (m, 2H), 2,56 (q, J=7,6 Hz, 2H), 1,20 (t, J=7,6 Hz, 3H).

**Etapas-3:** A una solución de 2-etil-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona obtenida en la Etapa-2 (1,80 g, 6,28 mmol) en tetracloruro de carbono (20 ml), se añadió N-bromosuccinimida (1,11 g, 6,28 mmol) y se calentó hasta 80 °C. Se añadió azobisisobutironitrilo (10 mg) a la mezcla de reacción a 80 °C. Después de 12 horas, la mezcla de reacción se enfrió hasta TA, se diluyó con diclorometano y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título crudo como un sólido amarillo (1,25 g, 55 % de rendimiento). <sup>1</sup>H-NMR (δ ppm, DMSO-D<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 7,91 (dd, J=9,2, 4,3 Hz, 1H), 7,81 (dt, J=8,2, 2,8 Hz, 1H), 7,74 (dd, J=8,3, 3,1 Hz, 1H), 7,57 (m, 1H), 7,32 (dt, J=8,5, 2,4 Hz, 1H), 7,19 (m, 2H), 5,00 (q, J=6,8 Hz, 1H), 1,97 (d, J=6,8 Hz, 3H).

#### Producto intermedio 2: 6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-2-(1-hidroxietil)-4H-cromen-4-ona

5



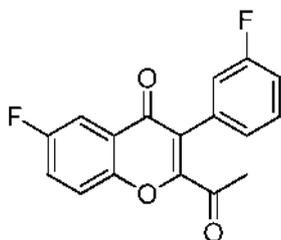
10

A una solución del producto intermedio 1 (15,0 g, 40,84 mmol) en DMSO (150 ml), se añadió n-butanol (7,5 ml) y se calentó hasta 120 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta TA, se inactivó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanquecino (7,90 g, 64 %). <sup>1</sup>H-NMR (δ ppm, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 7,85 (dd, *J* = 8,1, 3 Hz, 1H), 7,54 (dd, *J* = 9,2, 4,2 Hz, 1H), 7,47-7,37 (m, 2H), 7,15-6,98 (m, 3H), 4,74 (quinteto, *J* = 6,8 Hz, 1H), 2,23 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 1,54 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H).

15

20 Producto intermedio 3: 2-acetil-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona

25



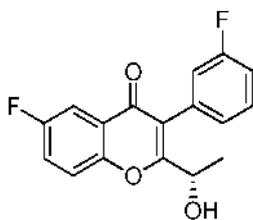
30

Se añadió DMSO (5,60 ml, 79,14 mmol) a diclorometano (40 ml) y se enfrió hasta -78°C, seguido de cloruro de oxalilo (3,40 ml, 39,57 mmol). Después de 10 minutos, se añadió gota a gota el producto intermedio 2 (6,00 g, 19,78 mmol) en diclorometano (54 ml) y se agitó durante 20 minutos. Se añadió trietilamina (12 ml) y se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió con agua y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (4,2 g, 71 %) que se usó como tal en la siguiente etapa.

35

40 Producto intermedio 4: (S)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-2-(1-hidroxietil)-4H-cromen-4-ona

45

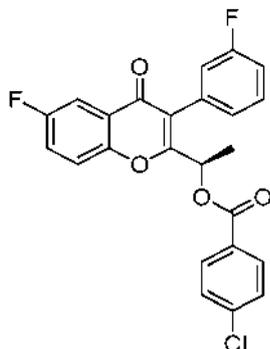


50

Al producto intermedio 3 (2,00 g, 6,66 mmol), se añadió borano R-Alpine (0,5 M en THF, 20 ml) y se calentó hasta 60 °C durante 20 horas. La mezcla de reacción se inactivó con HCl 2 N y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanquecino (1,51 g, 75 %). Exceso enantiomérico: 94,2 %, enriquecido en el isómero de elución rápida (tiempo de retención: 8,78 min) según se determinó por HPLC en una columna Chiralpak AD-H.

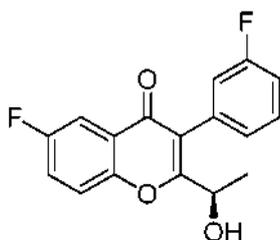
55

Producto intermedio 5: (R)-1-(6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil 4-clorobenzoato



A una solución del producto intermedio 4 (1,45 g, 4,78 mmol) en THF (15 ml), se añadieron ácido 4-clorobenzoico (0,748 g, 4,78 mmol) y trifetilfosfina (1,88 g, 7,17 mmol) y se calentaron hasta 45 °C seguido de diisopropilazodicarboxilato (1,4 ml, 7,17 mmol). Después de 1 hora, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanquecino (1,81 g, 86 %) que se usó sin purificación en la siguiente etapa.

Producto intermedio 6: (R)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-2-(1-hidroxietil)-4H-cromen-4-ona



#### Método A

El producto intermedio 5 (1,75 g, 3,96 mmol) en metanol (17 ml) se enfrió hasta 10 °C, se añadió carbonato de potasio (0,273 g, 1,98 mmol) y se agitó durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentró, se acidificó con una solución de HCl 2 N, se extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (1,05 g, 87 % de rendimiento). Exceso enantiomérico: 93,6 %, enriquecido en el isómero de elución tardía (tiempo de retención: 11,12 min) según se determinó por HPLC en una columna Chiralpak AD-H.

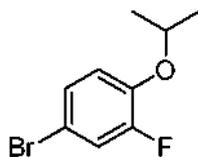
#### Método B

Etapa-1 [(R)-2-(1-(benciloxi)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona]: A 1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)-2-(3-fluorofenil)etanona (11,00 g, 44,31 mmol) en diclorometano, se añadieron HATU (33,7 g, 88,63 mmol) y ácido R-(+)-benciloxipropiónico (9,58 g, 53,17 mmol) y se agitó durante 10 min. Se añadió trietilamina (66,7 ml, 0,47 mol) gota a gota y se agitó a TA durante 24 horas. La mezcla de reacción se inactivó con agua, se extrajo con diclorometano, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (10,5 g, 60 % de rendimiento). <sup>1</sup>H-NMR (δ ppm, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 7,85 (dd, J = 8,1,3 Hz, 1H), 7,58 (dd, J = 9,1, 4,1 Hz, 1H), 7,47-7,39 (m, 1H), 7,39-7,34 (m, 1H), 7,28-7,20 (m, 3H), 7,20-7,14 (m, 2H), 7,16-7,07 (m, 1H), 6,99-6,89 (m, 2H), 4,50-4,31 (m, 3H), 1,56 (d, J = 6,4 Hz, 3H).

Etapa-2: La (R)-2-(1-(benciloxi)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona obtenida en la Etapa-1 (10,5 g, 26,69 mmol) en diclorometano (110 ml) se enfrió hasta 0 °C, se añadió cloruro de aluminio (5,35 g, 40,03 mmol) en porciones y se agitó a TA durante 6 horas. La mezcla de reacción se inactivó con una solución de HCl 2 N, se extrajo con diclorometano, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el producto intermedio 6 como un sólido amarillo (6,1 g, 76 % de rendimiento). Exceso enantiomérico: 97,7 %, enriquecido en el isómero de elución tardía (tiempo de retención: 11,12 min) según se determinó por HPLC en una columna Chiralpak AD-H.

Producto intermedio 7: 4-bromo-2-fluoro-1-isopropoxibenceno

5



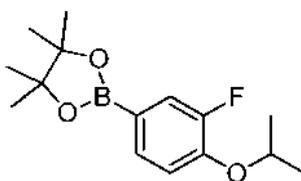
10

A una solución de 4-bromo-3-fluorofenol (10 g, 52,35 mmol) en THF (100 ml), se añadieron alcohol isopropílico (4,8 ml, 62,62 mmol) y trifetilfosfina (20,6 g, 78,52 mmol) y se calentaron hasta 45 °C seguido de diisopropilazodicarboxilato (15,4 ml, 78,52 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 1 hora, se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un líquido incoloro (13,1 g, 99 % de rendimiento), que se usó sin purificación en la siguiente etapa.

15

Producto intermedio 8: 2-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano

20



25

Se añadieron acetato de potasio (10,52 g, 107,2 mmol) y bis(pinacolato)diboron (15 g, 58,96 mmol) a una solución del producto intermedio 7 (10,52 g, 107,2 mmol) en dioxano (125 ml), y la solución se desgasificó durante 30 minutos. El [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloro paladio (II) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4,4 g, 5,36 mmol) se añadió bajo atmósfera de nitrógeno y se calentó hasta 80 °C. Después de 12 horas, la mezcla de reacción se filtró a través de celite y se concentró. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un aceite amarillo (13,9 g, 99 %) que se usó sin purificación en la siguiente etapa.

30

Producto intermedio 9: 3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina

35



40

A una solución de 3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (11,0 g, 42,14 mmol) en DMF (110 ml), etanol (55 ml) y agua (55 ml), se añadieron el producto intermedio 8 (23,4 g, 84,28 mmol) y carbonato de sodio (13,3 g, 126,42 mmol) y se desgasificaron durante 30 minutos. Se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (2,4 g, 2,10 mmol) en atmósfera de nitrógeno y se calentó hasta 80 °C. Después de 12 horas, la mezcla de reacción se filtró a través de celite, se concentró y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. El producto crudo se trituró con éter dietílico, se filtró y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título como un sólido marrón claro (3,2 g, 26 % de rendimiento) que se usa como tal en la siguiente etapa.

45

(RS)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona

50

A una solución del producto intermedio 9 (0,080 g, 0,293 mmol) en DMF (2 ml), se añadió carbonato de potasio (0,081 g, 0,587 mmol) y se agitó a TA durante 10 minutos. A esta mezcla se añadió el producto intermedio 1 (0,215 g, 0,587 mmol) y se agitó durante 12 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con metanol:diclorometano para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0,045 g). PF: 175-177 °C. <sup>1</sup>H-NMR (δ ppm, DMSO-D<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 8,20 (s, 1H), 7,85 (dd, J = 81,3,0 Hz, 1H), 7,48-7,33 (m, 5H), 7,14 (t, J = 8,3 Hz, 1H), 7,02 (m, 2H), 6,90 (m, 1H), 6,10 (q, J = 7,1 Hz, 1H), 5,42 (s, 2H), 4,64 (quinteto, J = 6,0 Hz, 1H), 1,99 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 1,42 (d, J = 6,1 Hz, 6H).

55

60

(S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona ("isómero S")

65

A una solución del producto intermedio 9 (0,134 g, 0,494 mmol) en THF (2,0 ml), se añadieron el producto intermedio 6 (0,150 g, 0,494 mmol) y trifetilfosfina (0,194 g, 0,741 mmol) y se agitó a TA durante 5 min. Se añadió diisopropilazodicarboxilato (0,15 ml, 0,749 mmol) y se calentó hasta 45 °C. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se inactivó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo

para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanquecino (0,049 g, 20 % de rendimiento). PF: 139-142 °C. Masa: 571,7 (M<sup>+</sup>). Exceso enantiomérico: 89,8 % según se determinó por HPLC en una columna Chiralpak AD-H, enriquecido en el isómero de elución rápida (tiempo de retención = 10,64 min).

5 **(R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona**

10 A una solución del producto intermedio 8 (0,284 g, 0,989 mmol) en THF (5,0 ml), se añadieron el producto intermedio 4 (0,250 g, 0,824 mmol) y tris(4-metoxi)fenilfosfina (0,435 g, 1,23 mmol) y se agitó a TA durante 5 min. Se añadió diisopropilazodicarboxilato (0,25 ml, 1,23 mmol) y se agitó a TA. Después de 12 horas, la mezcla de reacción se inactivó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanquecino (0,105 g, 22 % de rendimiento). PF: 145-148 °C. Masa: 571,7 (M<sup>+</sup>). Exceso enantiomérico: 95,4 % según se determinó por HPLC en una columna Chiralpak AD-H, enriquecido en el isómero de elución tardía (tiempo de retención = 14,83 min).

Evaluación biológica

20 Combinación de un compuesto de la Fórmula A y el anticuerpo anti-CD20

Ejemplo 1: Las combinaciones del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el ublituximab reducen las células B de la sangre total

25 Se usó un ensayo de citometría de flujo para comparar la capacidad del isómero S del compuesto de la Fórmula A, el ublituximab (Ubx), y las combinaciones de estos para reducir las células B de la sangre total humana (HWB). En este ensayo, se trataron 50 µl de la muestra de HWB con cualquiera del isómero S de un compuesto de la Fórmula A (1000 nM), el UBX (100 µg/ml a 0,1 µg/ml), o el UBX en combinación con el isómero S de un compuesto de la Fórmula A a 1000 nM y se incubó durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se tomaron 20 µl de la muestra tratada en un tubo de centrifuga de 1,5 ml y se marcaron con anticuerpo CD45 FITC y CD19 PE o CD20 FITC y se incubaron en la oscuridad durante 1 hora a TA. Se añadió 1 ml de la solución de lisis de glóbulos rojos (RBC) y los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se aspiró y se añadió 250 µl de PBS al sedimento. Los tubos se sometieron a vórtice y se adquirieron 5000 eventos en un citómetro de flujo Guava® easyCyte™ y se analizaron con el programa informático Incyte.

35 La población cerrada de células CD45 positivas se analizó adicionalmente para CD19. Se calculó el número de células que fueron positivas para CD45 y CD19, y los datos se expresaron como el porcentaje de células CD19 positivas en la población. Las poblaciones CD20 positivas se cerraron con fluorescencia positiva menos las células no marcadas, y los datos se expresaron como el porcentaje de células CD20 positivas en la población. La pérdida de la población CD19/CD20 del control se calculó y se expresó como el % de reducción con respecto al control.

40 Los resultados se muestran en la Figura 1. El isómero S de un compuesto de la Fórmula A no es citotóxico para las células B en concentraciones de hasta 10 µM. Por lo tanto, no se observó una reducción en las células B de HWB CD19 positivas o CD20 positivas con 1 µM del isómero S de un compuesto de la Fórmula A. El anticuerpo anti-CD20 UBX dio como resultado una reducción solo del 20-30 % de las células B en dosis de 1 a 100 000 ng/ml, pero causó una reducción dependiente de la dosis en las células B CD20+. La combinación de 1000 nM del isómero S de un compuesto de la Fórmula A con 10 ng/ml del UBX dio como resultado la potenciación de la reducción de las células CD19+, y la combinación de 1000 nM del isómero S de un compuesto de la Fórmula A con concentraciones de 0,1-10 ng/ml del UBX dio como resultado un modesto efecto aditivo sobre la reducción de las células CD20+. Estos resultados demuestran que la combinación del isómero S de un compuesto de la Fórmula A (1000 nM) con el UBX (10 ng/ml) mostró la potenciación de la reducción de las células CD19 positivas y un efecto modesto sobre la reducción de las células CD20 positivas.

Ejemplo 2: Las combinaciones del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el UBX efectúan la proliferación de células B inducida por LPS

55 La citometría de flujo se usó para estudiar el efecto del isómero S de un compuesto de la Fórmula A, el Ubx y las combinaciones de estos en la proliferación inducida por LPS de las células CD19 y CD20 en HWB. En estos experimentos, se trataron 250 µl de la muestra de HWB diluida (1:3,5 con medio RPMI-HG) con cualquiera del isómero S de un compuesto de la Fórmula A (10 µM a 0,1 µM), el UBX (100 µg/ml a 0,1 µg/ml) o el UBX con el isómero S de un compuesto de la Fórmula A a 1000 nM durante 15 minutos seguido de la inducción con 20 µg/ml de LPS y se incubó durante 72 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se tomaron 20 µl de la muestra tratada en un tubo de centrifuga de 1,5 ml y se marcó con anticuerpo CD20 FITC y CD19 PE y se incubó en la oscuridad durante 1 hora a TA. Se añadió 1 ml de la solución de lisis de RBC y los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se aspiró y se añadieron 250 µl de PBS al sedimento. Los tubos se sometieron a vórtice y se adquirieron 5000 eventos en un citómetro de flujo Guava® easyCyte™ y se analizaron con el programa informático Incyte.

La población cerrada de las células linfocitos positivas se analizó adicionalmente para CD19 y CD20. Se calcularon las células positivas para CD19 y/o CD20, y los datos se expresaron como el porcentaje de células positivas en la población. La pérdida de la población positiva del control con la inducción de LPS se calculó y expresó como el % de inhibición con respecto al control.

5 Los resultados se muestran en las Figuras 2 y 3. El isómero S de un compuesto de la Fórmula A (1 µM) provocó una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células B CD19+ inducida por LPS mediante el uso de HWB (-60 %). La adición de 1 µM del isómero S de un compuesto de la Fórmula A a diferentes concentraciones del UBX no aumentó la respuesta más allá del -60 % como resultado del efecto mínimo del UBX sobre las células CD19+. Sin embargo, se observó un efecto aditivo de la combinación sobre la proliferación celular CD19+ a la concentración de 100 ng/ml del UBX.

15 En contraste con su efecto sobre la proliferación de células CD19+, el isómero S de un compuesto de la Fórmula A mostró una inhibición de -40 % de las células CD20+ a 1 µM. Fue evidente un efecto aditivo de la combinación de 1 µM del isómero S de un compuesto de la Fórmula A con el UBX, especialmente para la dosis de 0,1 ng/ml.

Ejemplo 3: Las combinaciones del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el UBX aumentan la apoptosis en las células cancerosas

20 Para determinar el efecto del isómero S de un compuesto de la Fórmula A, el UBX y las combinaciones de estos sobre la apoptosis en las células cancerosas, se usó un kit de caspasa-3 *in situ* (Millipore). Las células se colocaron en una placa de 6 pocillos a una concentración de  $0,5 \times 10^6$  células/ml, se trataron con el isómero S de un compuesto de la Fórmula A (1000 nM), el UBX (100 µg/ml a 0,1 µg/ml), o el UBX con el isómero S de un compuesto de la Fórmula A a 1000 nM, y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego, las células se transfirieron a tubos de microcentrifuga para recibir 10 µl del reactivo FLICA™ recién preparado y se incubaron durante 1 hora a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> lejos de la luz. Después de lavados exhaustivos con el amortiguador de lavado, las muestras de prueba se ajustaron para igualar el número de células en PBS. Se transfirieron 100 µl de cada suspensión celular a placas negras de 96 pocillos por duplicado, y la fluorescencia se leyó a una longitud de onda de excitación de 490 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm en un lector de placa. Se restó la intensidad de la fluorescencia para un control de DMSO de la de los compuestos de prueba. Los datos se expresaron como un porcentaje de la respuesta máxima (100 %) y se graficaron por consiguiente.

35 Los resultados se muestran en la Figura 4. El UBX mostró una capacidad limitada para inducir la actividad de la caspasa-3 en las líneas celulares analizadas. La actividad de la caspasa-3 aumentó en un 40-75 % mediante la incubación de las líneas celulares con 1 µM del isómero S de un compuesto de la Fórmula A. Se observó un efecto sinérgico de la combinación a una concentración del UBX de 100 ng/ml en las células Daudi, mientras que se observó un efecto aditivo en las líneas celulares RPMI-8226, Raji y U226B1 a concentraciones más altas (10 y 100 ng/ml) del UBX.

40 Ejemplo 4: La combinación del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el UBX provoca la detención del ciclo celular

45 Se usó un reactivo del ensayo de ciclo celular (Millipore) para determinar el efecto del isómero S de un compuesto de la Fórmula A, el UBX y las combinaciones de estos sobre el ciclo celular en las células cancerosas. En estos experimentos, las células se colocaron en una placa de 6 pocillos a una concentración de  $0,5 \times 10^6$  células/ml, se trataron con cualquiera de isómero S de un compuesto de la Fórmula A (10 µM a 0,1 µM), el UBX (100 µg/ml a 0,1 µg/ml), o el UBX con el isómero S de un compuesto de la Fórmula A a 1000 nM, y se incubaron durante 72 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células se transfirieron a tubos de microcentrifuga para recibir 50 µl del reactivo del ciclo celular y se incubaron durante 30 minutos a TA lejos de la luz. Las células se diluyeron luego con 300-400 µl de PBS, y se adquirieron un mínimo de 10 000 eventos en un citómetro de flujo Guava® easyCyte™. Los datos se analizaron con el programa informático Express Pro y se presentó en histogramas el porcentaje de la población celular en diferentes etapas del ciclo celular con respecto al control.

55 Las Figuras 5-10 muestran los resultados obtenidos con las células U266B1 y Raji. Además, las Tablas 1-12 a continuación proporcionan los resultados cuantitativos obtenidos mediante el uso de las células U266B1, DB, Raji y Daudi.

Tabla 1: Células U266B1 - Incubación de 72 h con un compuesto de la Fórmula A

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>Control</b>	60,22	4,29	31,72	3,01
<b>10 000 nM</b>	2,00	0,94	64,31	28,88
<b>1000 nM</b>	47,80	4,69	47,13	0,88
<b>100 nM</b>	48,69	5,49	45,76	0,75

ES 2 813 343 T3

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>10 nM</b>	55,33	5,38	39,28	0,76
<b>1 nM</b>	57,73	4,87	36,19	0,94
<b>0,1 nM</b>	59,26	6,55	30,71	2,75

Tabla 2: Células U266B1 - Incubación de 72 h con el anticuerpo anti-CD20 UBX

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>Control</b>	60,22	4,29	31,72	3,01
<b>100 ng/ml</b>	52,95	7,91	39,65	1,95
<b>10 ng/ml</b>	56,85	6,34	37,86	0,78
<b>1 ng/ml</b>	58,81	7,07	36,07	0,51
<b>0,1 ng/ml</b>	57,53	7,63	35,64	1,35
<b>0,01 ng/ml</b>	59,32	6,57	35,48	0,74
<b>0,001 ng/ml</b>	60,79	6,00	30,49	1,34

Tabla 3: Células U266B1 – Incubación de 72 h con el UBX + un compuesto de la Fórmula A (1000 nM)

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>Control</b>	60,22	4,29	31,72	3,01
<b>100 ng/ml + Comp. A</b>	1,25	0,68	84,46	12,76
<b>10 ng/ml + Comp. A</b>	1,68	1,20	84,97	11,70
<b>1 ng/ml + Comp. A</b>	47,97	3,81	46,37	0,63
<b>0,1 ng/ml + Comp. A</b>	47,31	4,28	46,47	0,50
<b>0,01 ng/ml + Comp. A</b>	47,48	3,84	46,51	0,56
<b>0,001 ng/ml + Comp. A</b>	47,09	3,97	47,05	0,59

Tabla 4: Células DB - Incubación de 72 h con un compuesto de la Fórmula A

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>Control</b>	54,30	8,00	36,38	0,48
<b>10 000 nM</b>	1,40	0,89	94,87	2,06
<b>1000 nM</b>	0,75	0,42	92,79	5,36
<b>100 nM</b>	41,21	6,96	50,22	0,43
<b>10 nM</b>	47,22	4,98	46,85	0,55
<b>1 nM</b>	50,61	6,53	41,44	0,54
<b>0,1 nM</b>	54,37	4,84	39,41	0,84

Tabla 5: Células DB – Incubación de 72 h con el anticuerpo anti-CD20 UBX

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>Control</b>	54,30	8,00	36,38	0,48
<b>100 ng/ml</b>	45,98	7,66	46,55	0,67
<b>10 ng/ml</b>	49,52	10,07	40,56	0,56
<b>1 ng/ml</b>	51,36	6,46	40,07	0,52
<b>0,1 ng/ml</b>	56,34	12,34	38,40	1,10
<b>0,01 ng/ml</b>	54,99	7,73	34,79	0,73
<b>0,001 ng/ml</b>	54,38	9,45	34,02	0,59

Tabla 6: Células DB - Incubación de 72 h con el UBX + un Compuesto de la Fórmula A (continuado)

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>Control</b>	54,30	8,00	36,38	0,48
<b>100 ng/ml + Comp. A</b>	0,48	0,32	93,78	5,91
<b>10 ng/ml + Comp. A</b>	0,70	0,99	93,34	4,79
<b>1 ng/ml + Comp. A</b>	0,31	0,74	92,65	6,00
<b>0,1 ng/ml + Comp. A</b>	0,44	0,63	92,84	5,83
<b>0,01 ng/ml + Comp. A</b>	0,09	0,84	93,97	4,30
<b>0,001 ng/ml + Comp. A</b>	0,06	0,17	94,48	5,31

Tabla 7: Células Raji - Incubación de 72 h con un compuesto de la Fórmula A

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>Control</b>	54,10	9,08	33,54	2,14
<b>10 000 nM</b>	10,12	23,17	58,09	4,90
<b>1000 nM</b>	52,04	3,92	41,21	1,29
<b>100 nM</b>	52,81	6,72	37,80	1,04
<b>10 nM</b>	55,96	5,80	34,81	1,06
<b>1 nM</b>	56,93	5,51	34,13	1,89
<b>0,1 nM</b>	56,54	8,38	33,63	1,32

Tabla 8: Células Raji - Incubación de 72 h con el anticuerpo anti-CD20 UBX

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>Control</b>	54,10	9,08	33,54	2,14
<b>100 ng/ml</b>	22,19	11,05	33,74	34,78
<b>10 ng/ml</b>	45,01	8,15	12,90	31,86
<b>1 ng/ml</b>	39,72	14,82	15,35	27,32
<b>0,1 ng/ml</b>	41,11	8,93	22,00	23,73
<b>0,01 ng/ml</b>	54,54	12,65	25,08	5,51
<b>0,001 ng/ml</b>	50,52	10,61	33,66	4,35

Tabla 9: Células Raji - Incubación de 72 h con el UBX + un compuesto de la Fórmula A (1000 nM)

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>Control</b>	54,10	9,08	33,54	2,14
<b>100 ng/ml + Comp. A</b>	44,19	3,20	0,21	51,17
<b>10 ng/ml + Comp. A</b>	46,93	5,98	3,20	42,80
<b>1 ng/ml + Comp. A</b>	46,35	6,75	5,98	40,10
<b>0,1 ng/ml + Comp. A</b>	44,85	9,72	13,00	30,88
<b>0,01 ng/ml + Comp. A</b>	50,11	12,22	24,04	13,51
<b>0,001 ng/ml + Comp. A</b>	49,23	5,16	38,21	4,73

Tabla 10: Células Daudi - Incubación de 72 h con un compuesto de la Fórmula A

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>Control</b>	50,91	11,10	28,51	10,81
<b>10 000 nM</b>	2,53	21,92	65,03	5,01
<b>1000 nM</b>	48,27	7,91	40,10	2,22
<b>100 nM</b>	47,39	11,33	38,05	1,30
<b>10 nM</b>	46,84	12,55	37,79	1,68
<b>1 nM</b>	48,11	13,27	36,75	0,74
Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>0,1 nM</b>	49,56	14,13	33,23	0,34

Tabla 11: Células Daudi - Incubación de 72 h con el anticuerpo anti-CD20 UBX

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>Control</b>	50,91	11,10	28,51	10,81
<b>100 ng/ml</b>	43,66	9,28	28,55	19,55
<b>10 ng/ml</b>	40,92	13,23	28,08	17,77
<b>1 ng/ml</b>	40,52	17,54	26,99	14,95
<b>0,1 ng/ml</b>	37,40	17,06	32,42	13,42
<b>0,01 ng/ml</b>	36,24	19,15	37,83	6,77
<b>0,001 ng/ml</b>	38,12	17,90	41,95	2,03

Tabla 12: Células Daudi - Incubación de 72 h con el UBX + un compuesto de la Fórmula A (1000 nM)

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>Control</b>	50,91	11,10	28,51	10,81
<b>100 ng/ml + Comp. A</b>	38,37	8,43	12,95	40,24
<b>10 ng/ml + Comp. A</b>	49,56	8,47	9,80	32,17
<b>1 ng/ml + Comp. A</b>	51,73	8,75	11,81	26,26

## ES 2 813 343 T3

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
<b>0,1 ng/ml + Comp. A</b>	56,23	7,25	11,60	24,80
<b>0,01 ng/ml + Comp. A</b>	55,87	6,17	17,00	22,02
<b>0,001 ng/ml + Comp. A</b>	36,58	17,03	35,74	10,64

Estos resultados demuestran que las células en contacto con el isómero S de un compuesto de la Fórmula A, dieron como resultado una detención de G2/M dependiente de la dosis. Además, el tratamiento con el UBX durante 72 horas provocó una modesta detención de G2/M en el linfoma difuso de células B grandes (DB) y las células U266B 1, mientras que aumentó el número de células Sub G0 en las células Raji y Daudi. La combinación con 1  $\mu$ M del isómero S de un compuesto de la Fórmula A acentuó la respuesta del UBX a través de las líneas celulares analizadas.

Ejemplo 5: Las combinaciones del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el UBX aumentan sinérgicamente la apoptosis en las células cancerosas

Para determinar el efecto del isómero S de un compuesto de la Fórmula A, el UBX y las combinaciones de estos sobre la apoptosis en las células cancerosas, se usó un kit de caspasa-3 *in situ* (Millipore). Las células se colocaron en una placa de 6 pocillos a una concentración de  $0,5 \times 10^6$  células/ml, se trataron con el isómero S de un compuesto de la Fórmula A (200-5000 nM), el UBX (10 000 ng/ml a 10 ng/ml), o el UBX con el isómero S de un compuesto de la Fórmula A (como se indicó), y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego, las células se transfirieron a tubos de microcentrífuga para recibir 10  $\mu$ l del reactivo FLICA™ recién preparado y se incubaron durante 1 hora a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> lejos de la luz. Después de lavados exhaustivos con el amortiguador de lavado, las muestras de prueba se ajustaron para igualar el número de células en PBS. Se transfirieron 100  $\mu$ l de cada suspensión celular a placas negras de 96 pocillos por duplicado, y la fluorescencia se leyó a una longitud de onda de excitación de 490 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm en un lector de placa. Se restó la intensidad de la fluorescencia para un control de DMSO de la de los compuestos de prueba. Los datos se expresaron como la actividad de la caspasa-3, se calculó el índice de combinación (C.I.). Los C.I. menores de uno indican sinergismo, uno indica efectos aditivos y mayores de uno indican antagonismo.

Los resultados se muestran en la Figura 11 y las Tablas 13-15 para la línea celular LY1 en DBCL. El UBX indujo la actividad de la caspasa-3 en LY1. La actividad de la caspasa-3 aumentó sinérgicamente en presencia del UBX (todas las concentraciones) y el isómero S de un compuesto de la Fórmula A (1000 nM).

Los resultados se muestran en la Figura 12 y las Tablas 16-18 para la línea celular Raji de linfoma de Burkitt. El UBX indujo la actividad de la caspasa-3 en Raji LY1. La actividad de la caspasa-3 aumentó sinérgicamente en presencia del UBX (todas las concentraciones) y el isómero S de un compuesto de la Fórmula A (200 nM).

Tabla 13: Células LY1 incubadas con el isómero S

Isómero S	
Concentración (nM)	Actividad de la caspasa 3
200	0,06
1000	0,17
5000	0,61

Tabla 14: Células LY1 incubadas con el UBX

UBX	
Concentración (ng/ml)	Actividad de la caspasa 3
10	0,23
100	0,32
1000	0,53
10 000	0,59

Tabla 15: Células LY1 incubadas con el isómero S y el UBX

COMBINACIÓN			
Isómero S (nM)	UBX (ng/ml)	Actividad de la caspasa 3	C.I.
200	10	0,2715	0,6
200	100	0,3404	1,2
200	1000	0,5902	0,2
200	10 000	0,6317	0,8
1000	10	0,3811	0,5
1000	100	0,5523	0,2
1000	1000	0,743	0,1

(continuación)

COMBINACIÓN			
Isómero S (nM)	UBX (ng/ml)	Actividad de la caspasa 3	C.I.
1000	10 000	0,8181	0,1
5000	10	0,7359	0,5
5000	100	0,8339	0,3
5000	1000	0,999	0,0
5000	10 000	0,999	0,0

Tabla 16: Células Raji incubadas con el isómero S

Isómero S	
Concentración (nM)	Actividad de la caspasa 3
200	0,36
1000	0,56
5000	0,80

Tabla 17: Células Raji incubadas con el UBX

UBX	
Concentración (ng/ml)	Actividad de la caspasa 3
10	0,18
100	0,31
1000	0,51
10 000	0,60

Tabla 18: Células Raji incubadas con el isómero S y el UBX

COMBINACIÓN			
Isómero S (nM)	UBX (ng/ml)	Actividad de la caspasa 3	C.I.
200	10	0,696	0,20
200	100	0,895	0,04
200	1000	0,999	0,00
200	10 000	0,993	0,00
1000	10	0,805	0,49
1000	100	0,939	0,11
1000	1000	0,928	0,13
1000	10 000	0,866	0,30
5000	10	0,901	0,97
5000	100	0,829	2,03
5000	1000	0,861	1,52
5000	10 000	0,844	1,80

Se evaluaron tres líneas celulares adicionales, LY10 (DLBCL), Toledo (DLBCL) y Daudi (linfoma de Burkitt) para determinar los efectos de las combinaciones del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el UBX sobre la actividad de la caspasa 3 como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en las Tablas 19-21. Las combinaciones también demostraron la activación sinérgica de la caspasa 3.

Tabla 19: Células LY10 incubadas con el isómero S y el UBX (DLBCL)

Isómero S (nM)	UBX (ng/ml)	Actividad de la caspasa 3	CI
5000	50	0,999	0,021
1000	10	0,421	0,560
200	2	0,119	0,440

Tabla 20: Células Toledo incubadas con el isómero S y el UBX (DLBCL)

Isómero S (nM)	UBX (ng/ml)	Actividad de la caspasa 3	C.I.
5000	50	0,988	0,336
1000	10	0,685	0,548
200	2	0,136	0,576

Tabla 21: Células Daudi incubadas con el isómero S y el UBX (linfoma de Burkitt)

Isómero S (nM)	UBX (ng/ml)	Actividad de la caspasa 3	C.I.
5000	50	0,999	0,004
1000	10	0,594	0,582
200	2	0,296	0,393

5

10

Se evaluaron tres líneas celulares de linfoma de células del manto (MCL), Jeko, Maver y Rec-1, para determinar los efectos de las combinaciones del isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el UBX sobre la actividad de la caspasa 3 como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en las Tablas 22-24. Las combinaciones también demostraron la activación sinérgica de la caspasa 3, con sinergia optimizada a mayores concentraciones del isómero S y el UBX.

15

Tabla 22: Células Jeko incubadas con el isómero S y el UBX

Isómero S (nM)	UBX (ng/ml)	Actividad de la caspasa 3	C.I.
5000	50	0,999	0,000
1000	10	0,655	0,274
200	2	0,335	0,506

20

25

Tabla 23: Células Maver incubadas con el isómero S y el UBX

Isómero S (nM)	UBX (ng/ml)	Actividad de la caspasa 3	C.I.
5000	50	0,999	0,000
1000	10	0,437	0,603
200	2	0,213	0,648

30

Tabla 24: Células Rec-1 incubadas con el isómero S y el UBX

Isómero S (nM)	UBX (ng/ml)	Actividad de la caspasa 3	C.I.
5000	50	0,999	0,000
1000	10	0,484	0,303
200	2	0,403	0,132

35

40

En general, estos resultados muestran que el isómero S de un compuesto de la Fórmula A y el UBX sinergizan potentemente en la activación de la caspasa 3, un marcador de la apoptosis, en los modelos de linfomas de células B.

Listado de secuencia

45

TG Therapeutics, Inc.  
Rhizen Pharmaceuticals SA  
LFB Biotechnologies

50

<120> COMBINACIÓN DE ANTICUERPO ANTI-CD20 E INHIBIDOR SELECTIVO DE PI3 QUINASA

<130> 43-101wo1

<150> IN 4595/CHE/2012

<151> 2012-11-02

55

<150> US 61/771,812

<151> 2013-03-02

60

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

65

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 813 343 T3

<220>  
<223> fragmento de anticuerpo

5 <400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn  
1 5

10 <210> 2  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> fragmento de anticuerpo

<400> 2

20 Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr  
1 5

25 <210> 3  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> fragmento de anticuerpo

<400> 3

Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

35 <210> 4  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> fragmento de anticuerpo

<400> 4

ES 2 813 343 T3

5 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 10 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 15 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 20 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 25 Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 30 <210> 5  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> fragmento de anticuerpo  
 <400> 5  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

ES 2 813 343 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 5  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 10  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 15  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 20  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 25  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 30  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 35  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 40  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 45  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 50  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 55  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 60  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 65  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 70  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 75  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 80  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 85  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330  
 90  
 <210> 6  
 <211> 5

ES 2 813 343 T3

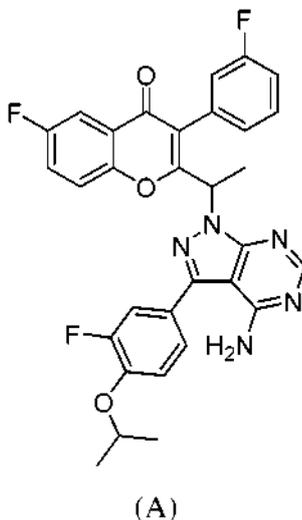
<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> fragmento de anticuerpo  
  
 <400> 6  
  
 Ser Ser Val Ser Tyr  
 10 1 5  
  
 <210> 7  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> fragmento de anticuerpo  
 20 <400> 7  
  
 Ala Thr Ser  
 1  
 25 <210> 8  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> fragmento de anticuerpo  
  
 <400> 8  
 35 Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr  
 1 5  
  
 <210> 9  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> fragmento de anticuerpo  
 45 <400> 9  
  
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly



## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para inhibir la proliferación de una población celular que comprende poner en contacto la población con una combinación que comprende

(i) un compuesto de la fórmula A,



un estereoisómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, y

(ii) un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo anti-CD20 es el ublituximab o se une al mismo epítipo que el ublituximab o es un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo o fragmento comprende la región CDR1, CDR2 y CDR3 de VH de las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y la región CDR1, CDR2 y CDR3 de VL de las secuencias SEQ ID NO: 6, 7 y 8, opcionalmente, en donde el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende el VH de la SEQ ID NO: 4 y el VL de la SEQ ID NO: 9.

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde dicho compuesto de la fórmula A es (RS)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; o (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la población se pone en contacto con una composición que comprende

(i) un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en (RS)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y

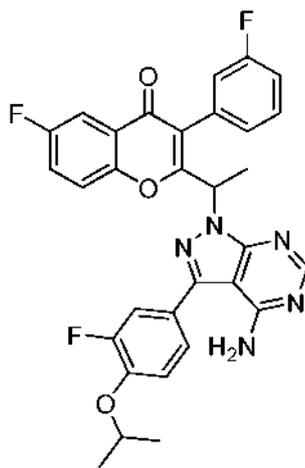
(ii) el anticuerpo anti-CD20.

6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la población se pone en contacto con

(i) una primera composición que comprende un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en (RS)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y

(ii) una segunda composición que comprende el anticuerpo anti-CD20.

7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo anti-CD20 es el ublituximab.
- 5 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el compuesto de la fórmula A es (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona.
9. Una combinación terapéutica que comprende:
- 10 (i) un compuesto de la fórmula A,



(A)

un estereoisómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este;

y

(ii) un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este,

para usar como un medicamento para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la proliferación excesiva de células B, el cáncer o una enfermedad o un trastorno autoinmunitario.

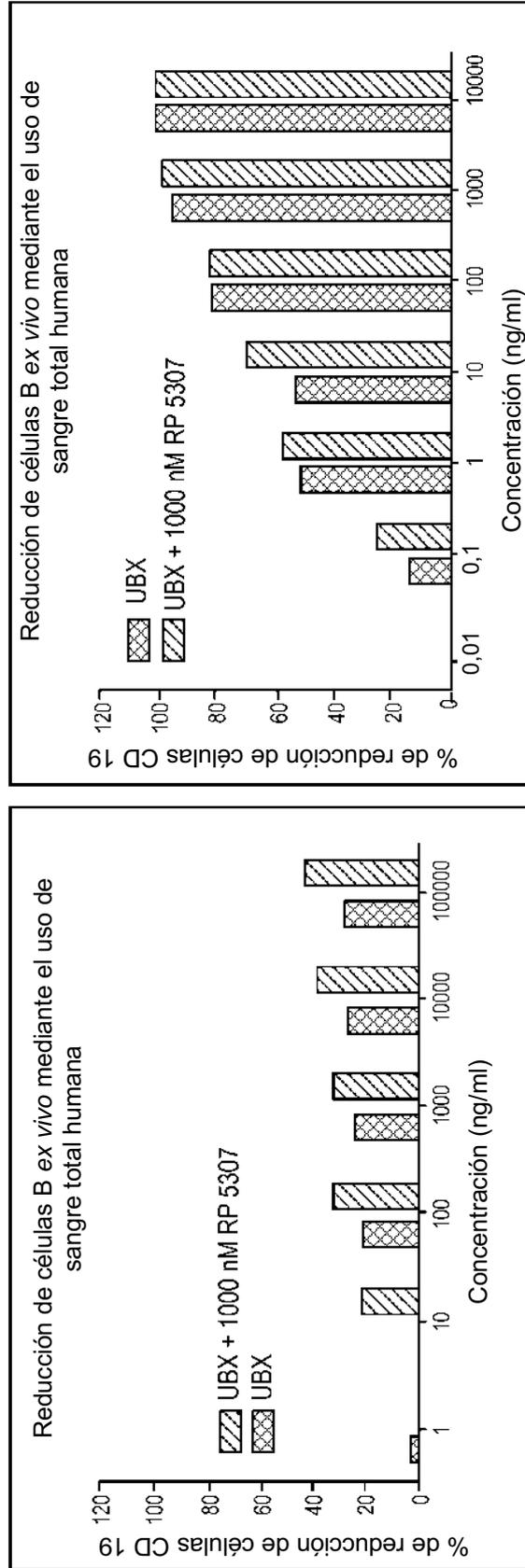
10. Un compuesto de la fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, para usar como un medicamento en un método para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la proliferación excesiva de células B, el cáncer o una enfermedad o un trastorno autoinmunitario, el método que comprende administrar el compuesto en combinación con un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este.
11. Un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este para usar como un medicamento en un método para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la proliferación excesiva de células B, el cáncer o una enfermedad o un trastorno autoinmunitario, el método que comprende administrar el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento en combinación con un compuesto de la fórmula (A) o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este.
12. La combinación terapéutica, el compuesto de la fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, o el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde dicho anticuerpo anti-CD20 es el ublituximab o se une al mismo epítipo que el ublituximab, o es un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo.
13. La combinación terapéutica, el compuesto de la fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, o el anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde dicho anticuerpo anti-CD20 se selecciona del grupo que consiste en rituximab, ofatumumab, ocrelizumab, veltuzumab, GA101, AME-133v, PRO131921, tositumomab, hA20 y PRO70769, o es un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo.

14. La combinación terapéutica, el compuesto de la fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, o el anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-13 en donde el compuesto se selecciona de (RS)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona.
15. La combinación terapéutica, el compuesto de la fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, o el anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-12 o 14, en donde el anticuerpo anti-CD20 es el ublituximab.
16. La combinación terapéutica, el compuesto de la fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, o el anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-15, en donde el compuesto de la fórmula A es (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona.
17. La combinación terapéutica, el compuesto de la fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, o el anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-12 y 14-16, en donde dicho compuesto es una sal de p-toluenosulfonato de (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y dicho anticuerpo anti-CD20 es el ublituximab.
18. La combinación terapéutica, el compuesto de la fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, o el anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-17, en donde el cáncer es una neoplasia hematológica, opcionalmente en donde la neoplasia hematológica es el linfoma o la leucemia, opcionalmente en donde la neoplasia hematológica se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), mieloma múltiple (MM), linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma folicular, macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma de células B y linfoma difuso de células B grandes (DLBCL).
19. La combinación terapéutica, el compuesto de la fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, o el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-18, en donde el cáncer sobreexpresa el CD20 y/o en donde el cáncer es resistente a la quimioterapia.
20. La combinación terapéutica, el compuesto de la fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, o el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-19, en donde el sujeto se ha tratado previamente con la quimioterapia, el rituximab, o una combinación de estos.
21. La combinación terapéutica, el compuesto de la fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, o el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-20, en donde dicho compuesto y dicho anticuerpo anti-CD20 o fragmento se administran al sujeto secuencial o simultáneamente, opcionalmente en donde dicho compuesto de la fórmula A y dicho anticuerpo anti-CD20 o fragmento se incluyen en la misma composición farmacéutica o composiciones farmacéuticas separadas.
22. La combinación terapéutica, el compuesto de la fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, o el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-21, en donde dicho método comprende administrar, o dicha combinación terapéutica comprende, al menos un agente terapéutico adicional, opcionalmente en donde el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de proteasoma, Bortezomib (Velcade®), Carfilzomib (PR-171), PR-047, disulfiram, lactacistina, PS-519, eponemicina, epoxomicina, aclacinomicina, CEP-1612, MG-132, CVT-63417, PS-341, inhibidores de tripéptido de vinilsulfona, ritonavir, PI-083, (+/-)-7-metilomuralida, (-)-7-metilomuralida, lenalidomida y las combinaciones de estos.
23. La combinación terapéutica, el compuesto de la fórmula (A), o un estereoisómero de este, una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, o el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de unión al antígeno de este, para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-22, en donde dicho método comprende administrar, o dicha combinación terapéutica comprende, al menos dos agentes terapéuticos adicionales que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona);  
 b) R-CHOP (rituximab-CHOP);  
 c) hiperCV AD (ciclofosfamida hiperfraccionada, vincristina, doxorubicina, dexametasona, metotrexato, citarabina);  
 5 d) R-hiperCV AD (rituximab-hiperCV AD);  
 e) FCM (fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona);  
 f) R-FCM (rituximab, fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona);  
 g) bortezomib y rituximab;  
 h) temsirolimus y rituximab;  
 10 i) temsirolimus y Velcade.RTM.;  
 j) Yodo-131 tositumomab (Bexxar.RTM.) y CHOP;  
 k) CVP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona);  
 l) R-CVP (rituximab-CVP);  
 15 m) ICE (ifosfamida, carboplatino, etopósido);  
 n) R-ICE (rituximab-ICE);  
 o) FCR (fludarabina, ciclofosfamida, rituximab);  
 p) FR (fludarabina, rituximab); y  
 q) D.T. PACE (Dexametasona, Talidomida, Cisplatino, Adriamicina, Ciclofosfamida, Etopósido).
- 20 24. Un kit que comprende (i) un compuesto de la fórmula A, un estereoisómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato de este, y (ii) un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este.
- 25 25. Un kit de acuerdo con la reivindicación 24, en donde dicho anticuerpo anti-CD20 es el ublituximab o se une al mismo epítipo que el ublituximab, o es un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo.
- 30 26. Un kit de acuerdo con la reivindicación 24, en donde dicho anticuerpo anti-CD20 se selecciona del grupo que consiste en rituximab, ofatumumab, ocrelizumab, veltuzumab, GA101, AME-133v, PRO131921, tositumomab, hA20 y PRO70769, o es un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo.
- 35 27. Un kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-26, en donde el compuesto de la fórmula A se selecciona del grupo que consiste en (RS)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona.
- 40 28. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24, 25 o 27, en donde dicho anticuerpo anti-CD20 es el ublituximab.
- 45 29. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-28, en donde dicho compuesto de la fórmula A es (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona.
- 50 30. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24, 25 o 27-29, en donde dicho compuesto es una sal de p-toluenosulfonato de (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y dicho anticuerpo anti-CD20 es el ublituximab.
- 55 31. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-30, en donde dicho anticuerpo anti-CD20 o fragmento y dicho compuesto se incluyen dentro de la misma composición o están en composiciones separadas.
- 60 32. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-31, que comprende además uno o más agentes activos adicionales.
33. Una composición farmacéutica que comprende
- (i) un compuesto de la fórmula A que se selecciona del grupo que consiste en (RS)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona; y (R)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y
- (ii) un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión al antígeno de este.

34. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 33, en donde dicho anticuerpo anti-CD20 es el ublituximab o se une al mismo epítipo que el ublituximab o es un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo.
- 5 35. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 33 o 34, en donde dicho compuesto de la fórmula A es (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona.
- 10 36. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 33-35, en donde dicho compuesto es una sal de p-toluenosulfonato de (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-fluoro-4-isopropoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y dicho anticuerpo anti-CD20 es el ublituximab.

Resultados



RP 5307 mostró 1,35 % de reducción de células CD20 a 1000 nM

RP 5307 no mostró reducción de células CD 19 a 1000 nM

Figura 1

Resultados

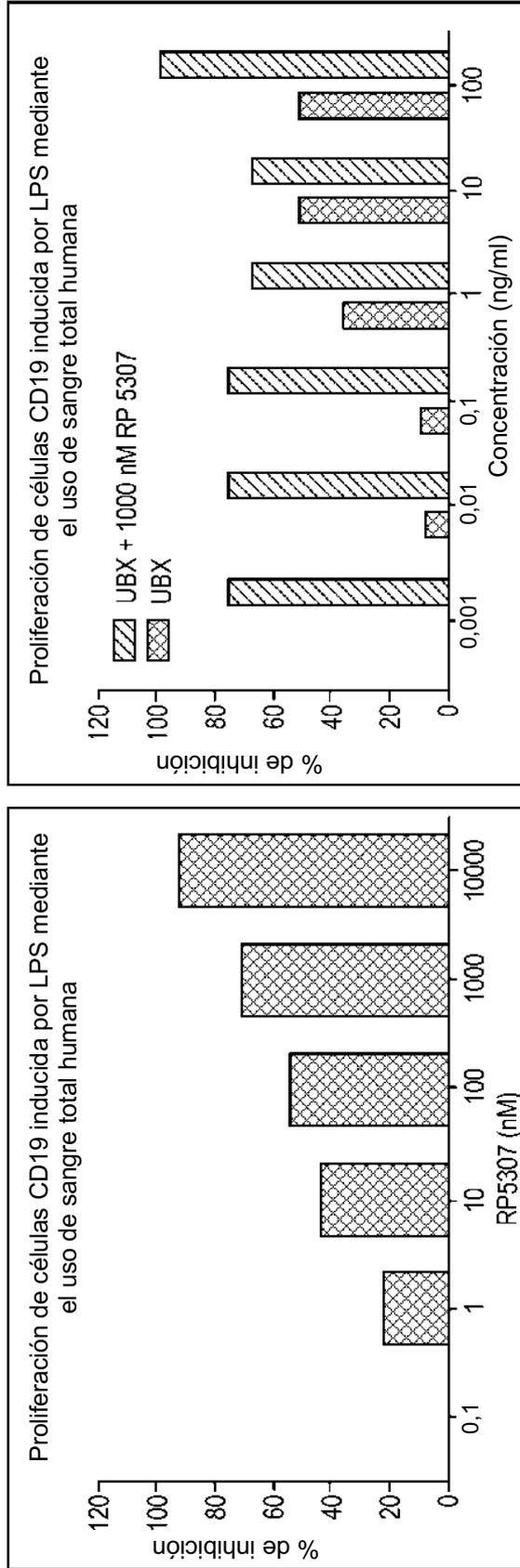


Figura 2

Resultados

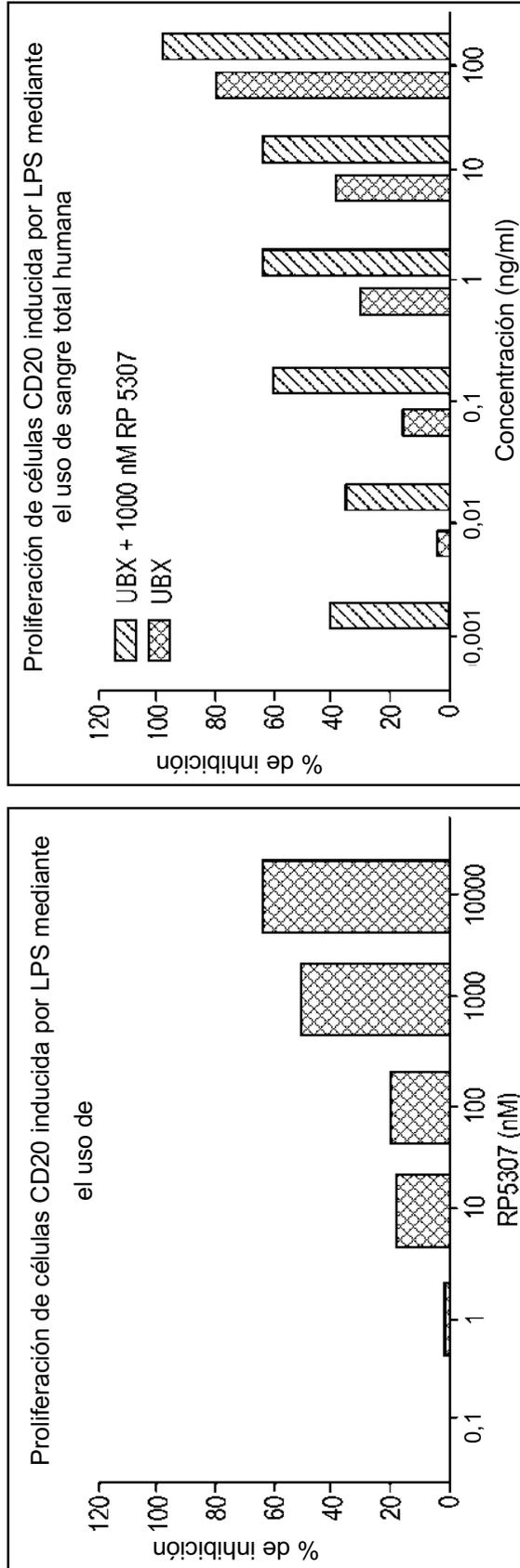


Figura 3

Resultados

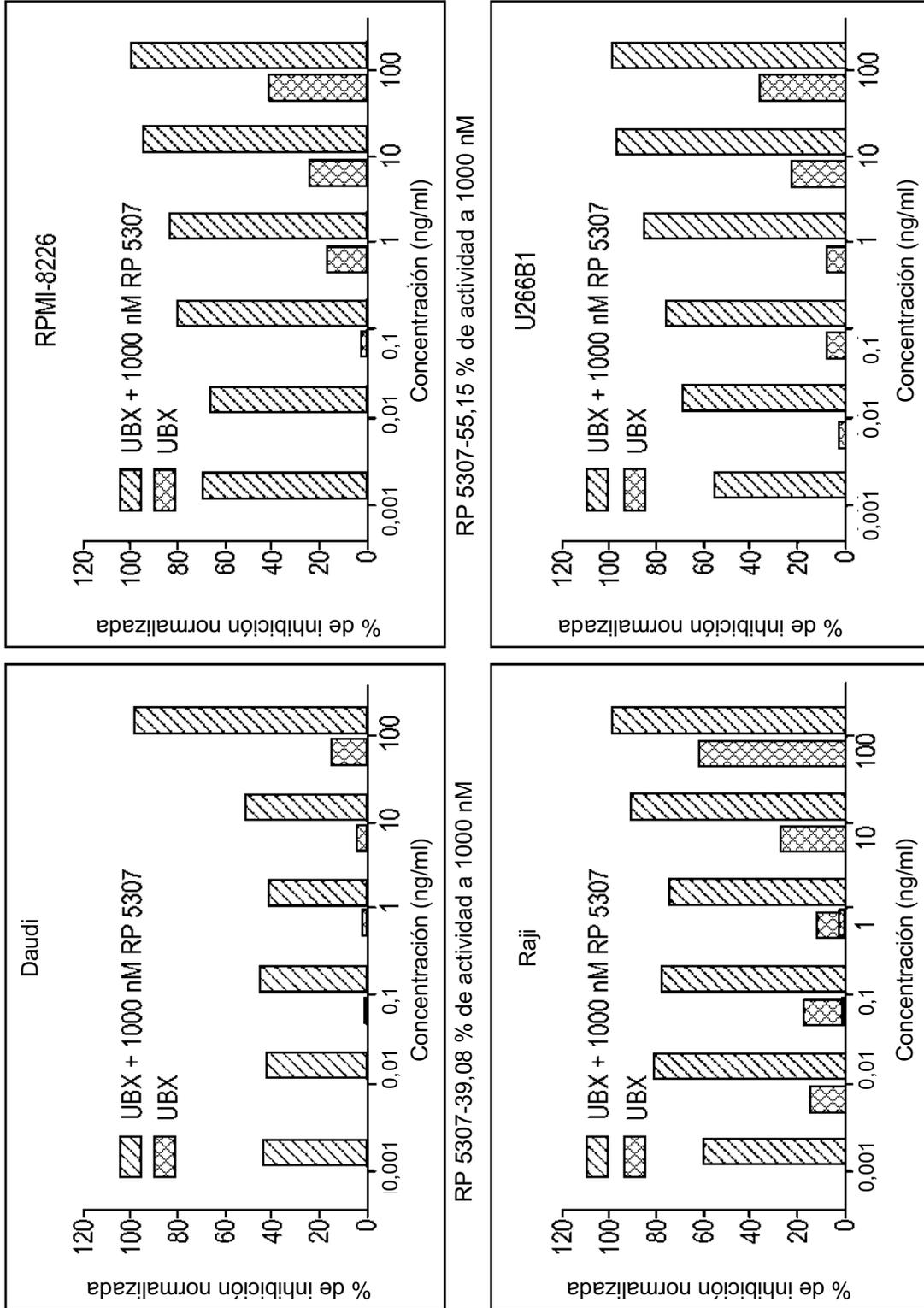


Figura 4

U266B1- Incubación de 72 h-RP 5307

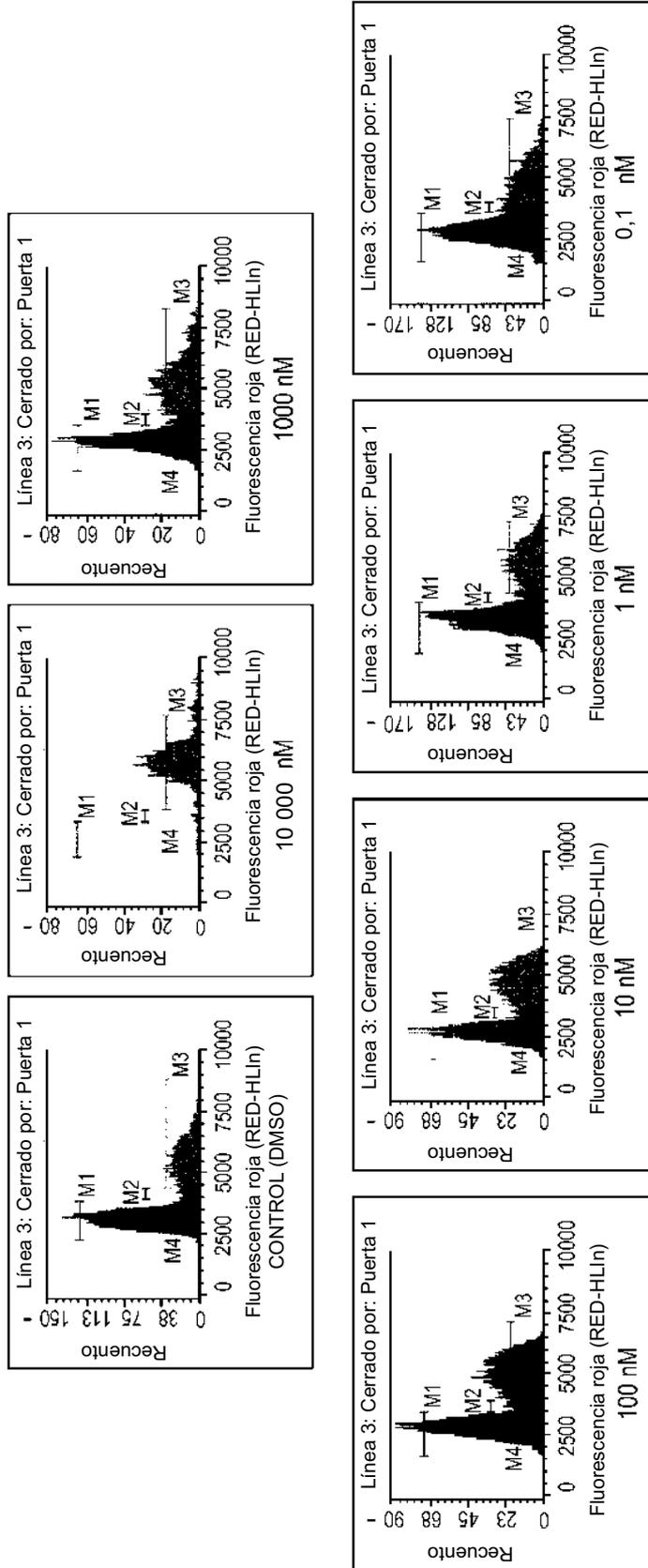


Figura 5

U266B1 - 72 h anticuerpo anti CD20 UBX

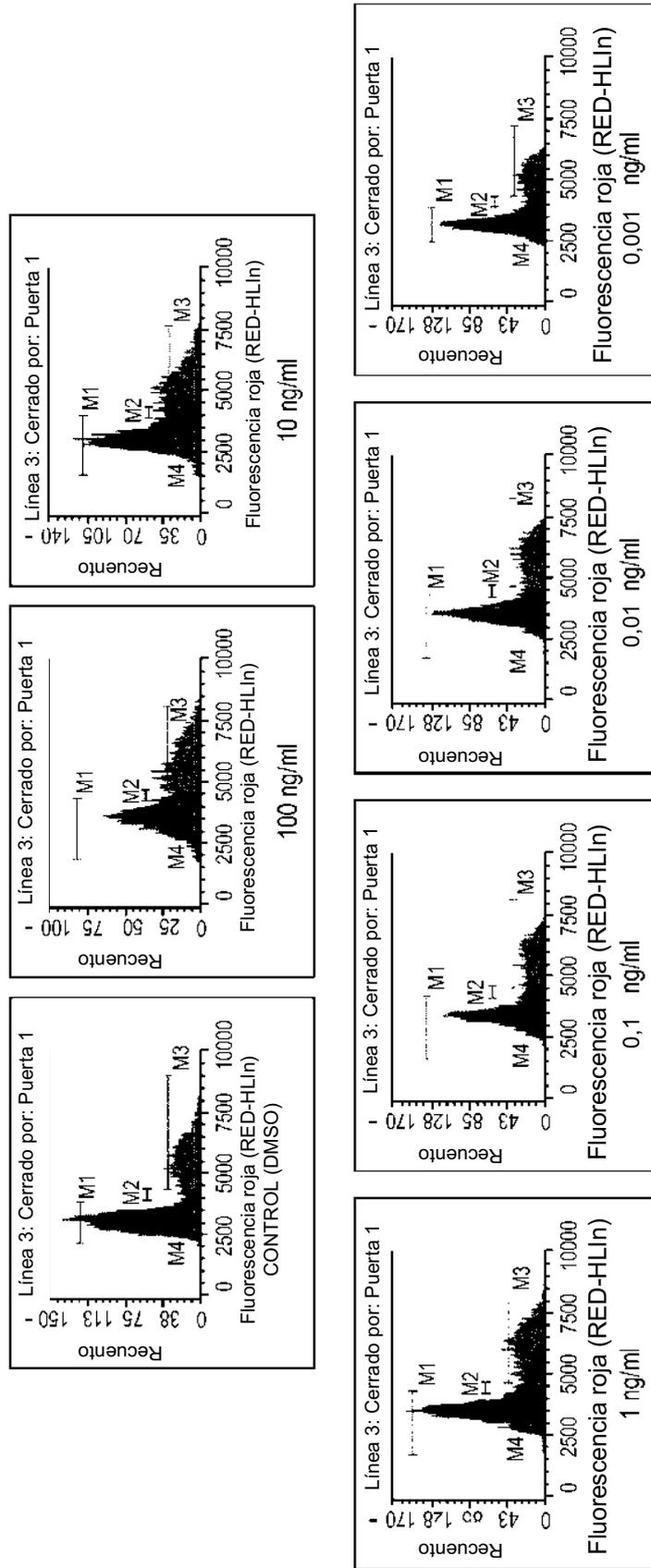


Figura 6

U266B1-72 h UBX + RP 5307 (1000 nM)

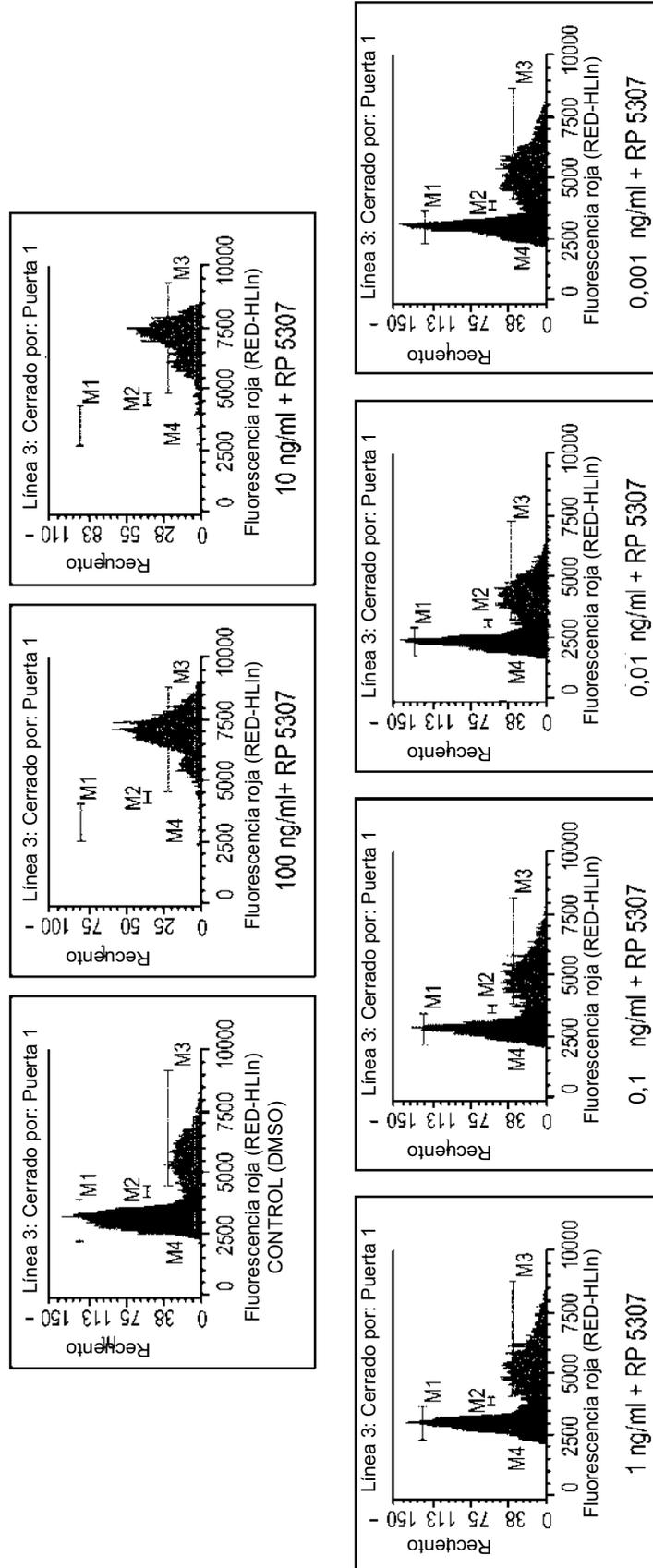


Figura 7

Raji- Incubación de 72 h-RP 5307

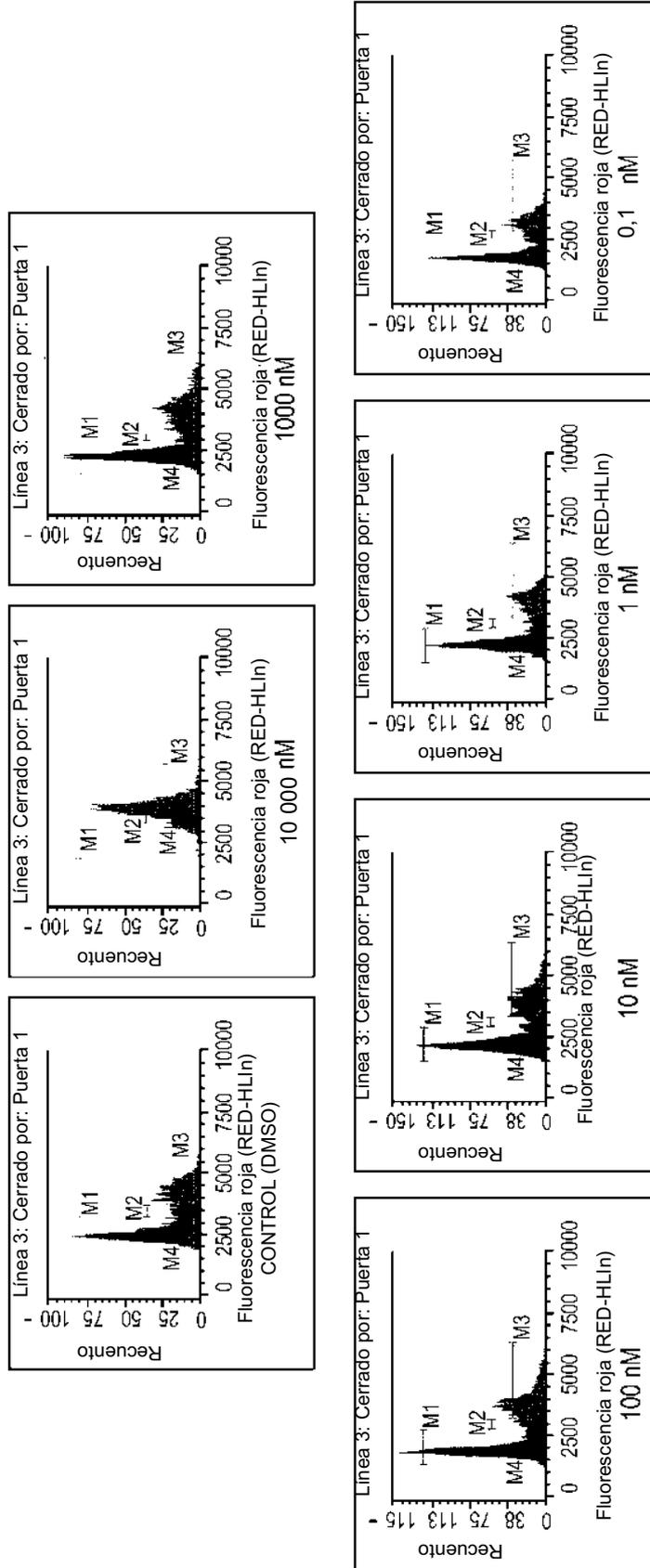


Figura 8

Raji- 72 h Anticuerpo anti-CD20 UBX

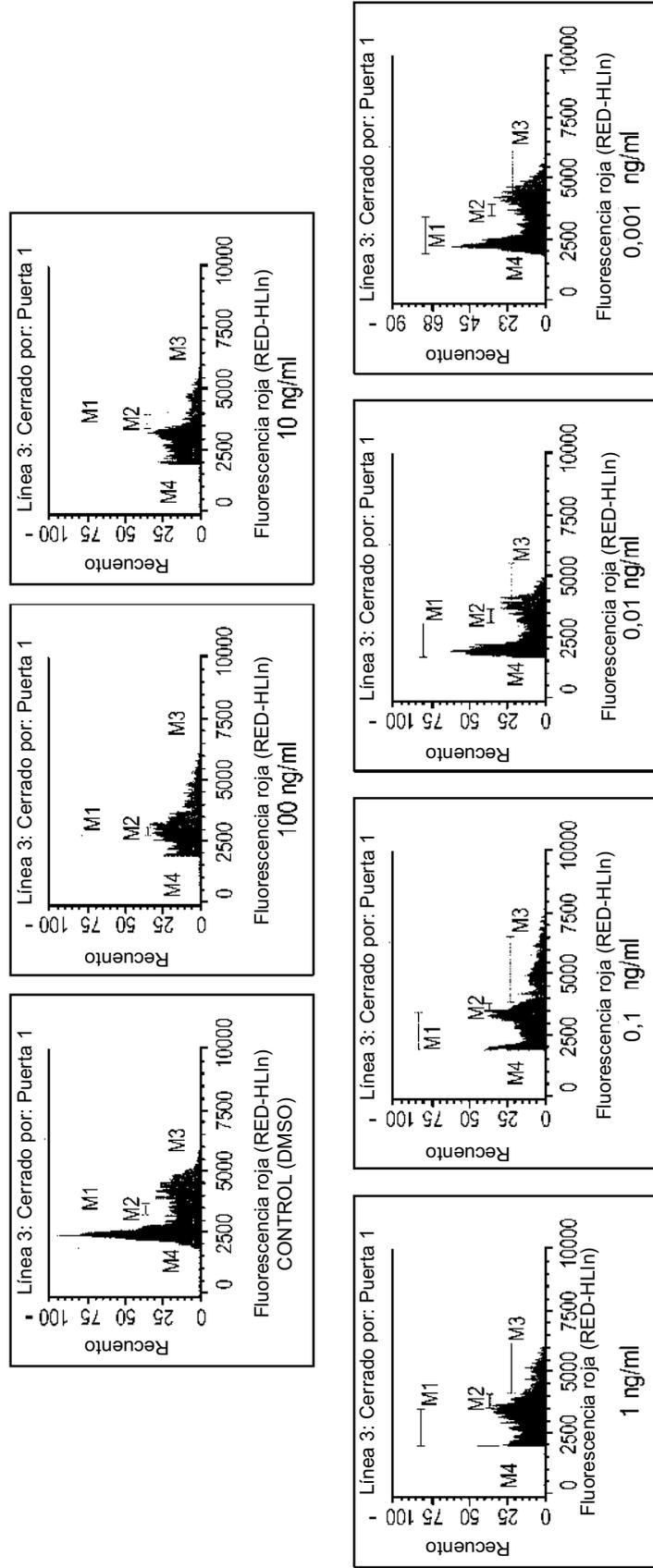


Figura 9

Raji- 72 h UBX + RP 5307 (1000 nM)

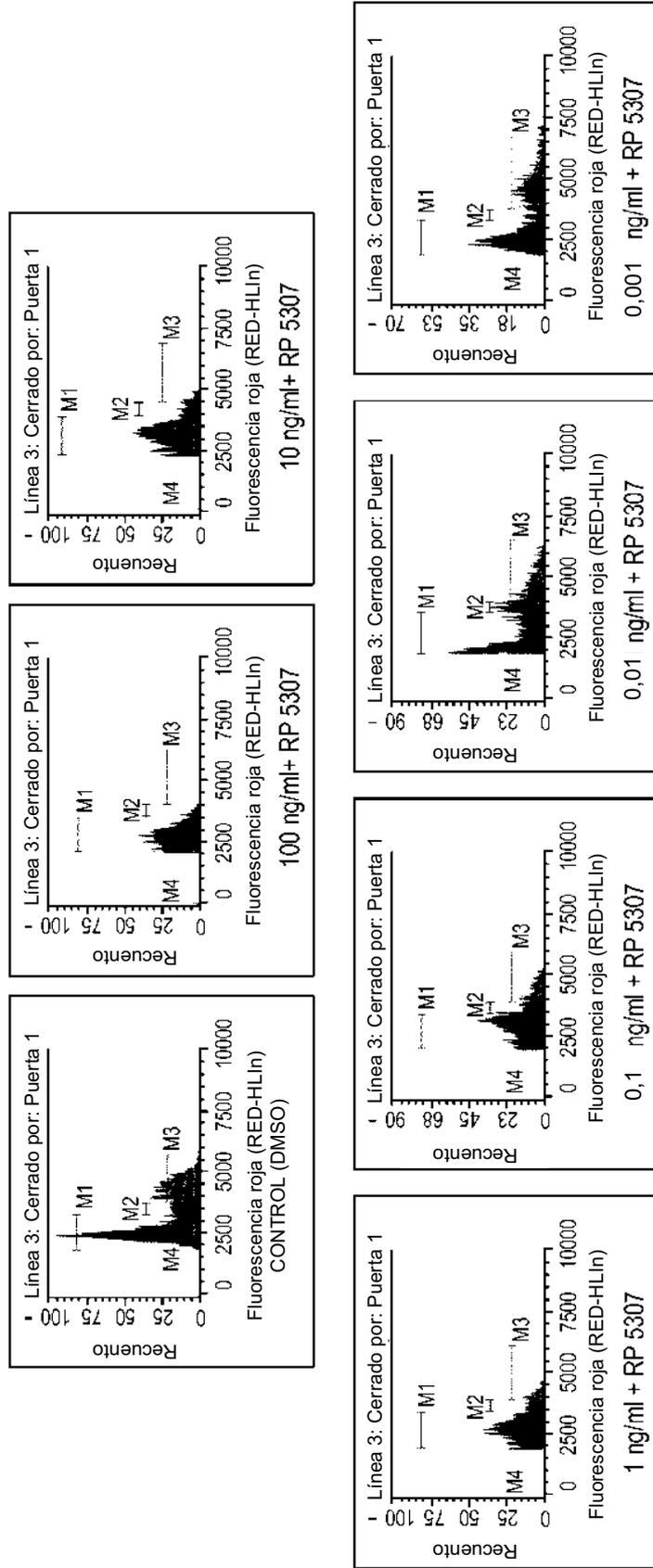


Figura 10

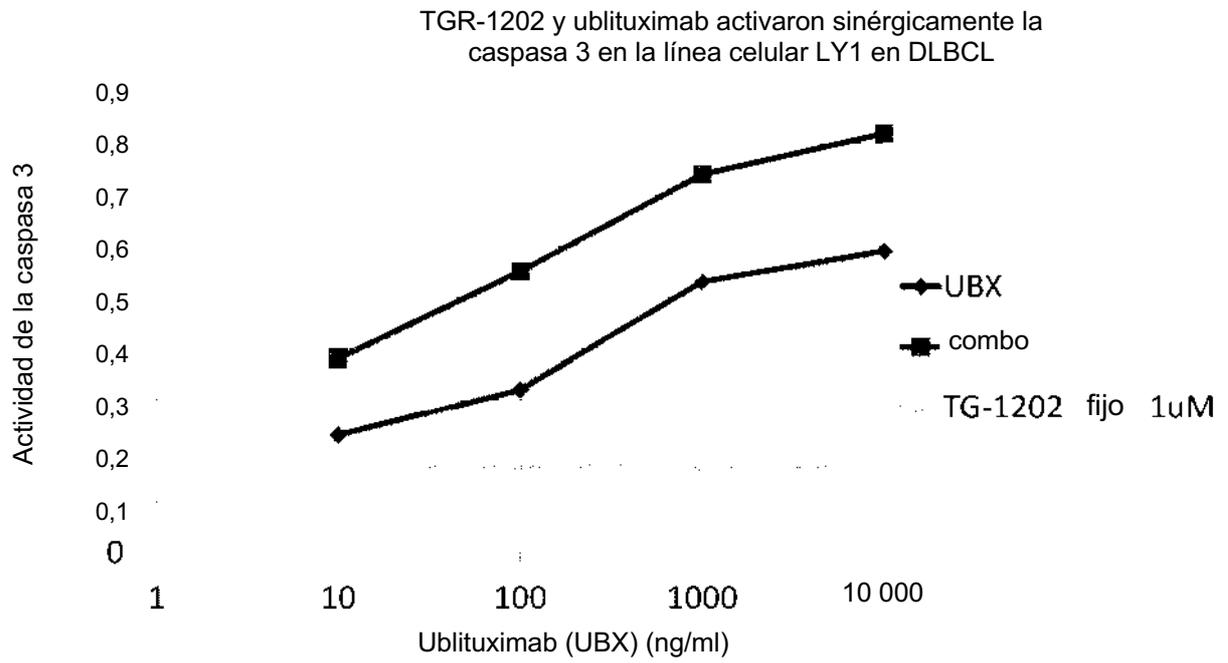


Figura 11

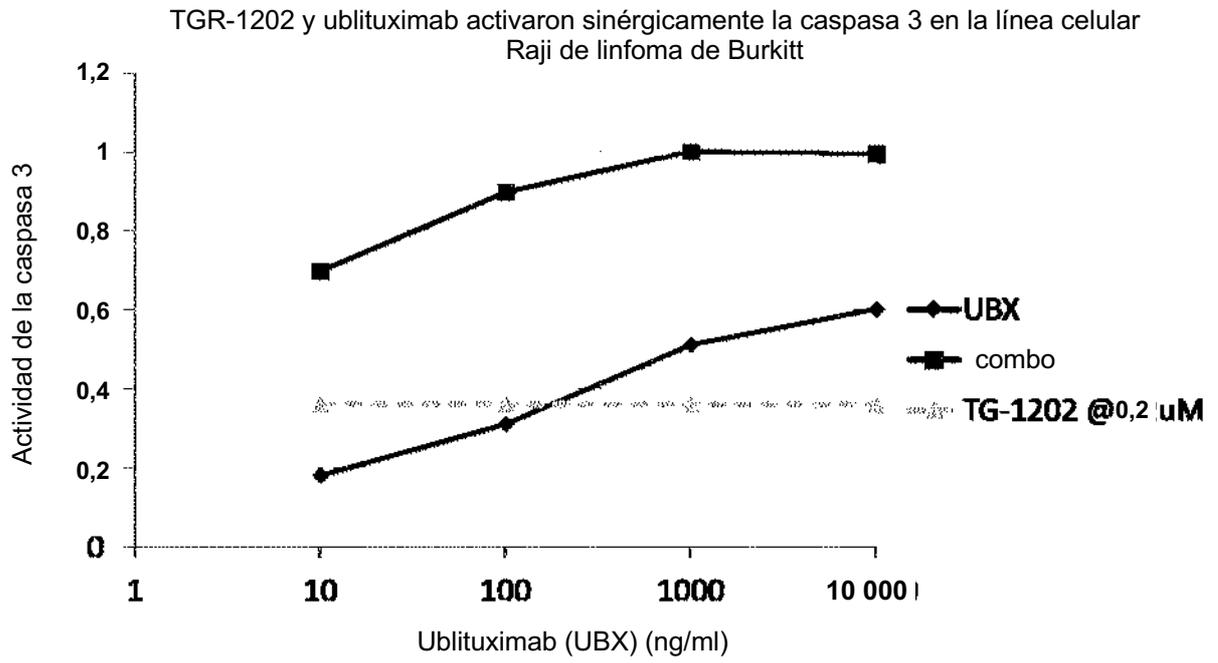


Figura 12