

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 511 844**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2008 E 08864416 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2234600**

54 Título: **Formulación de anticuerpo**

30 Prioridad:

21.12.2007 EP 07150335

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

23.10.2014

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**ADLER, MICHAEL;
MAHLER, HANNS-CHRISTIAN y
WURTH, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 511 844 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

Formulación de anticuerpo

5 La presente invención se refiere a una formulación de anticuerpo monoclonal anti-CD20, a un proceso para fabricar dicha formulación y a los usos de la formulación.

Antecedentes de la invención

10 La molécula CD20 (también llamada antígeno de diferenciación restringida del linfocito B humano o Bp35) es una proteína transmembrana hidrófoba de un peso molecular aproximadamente de 35 kD ubicada en linfocitos pre-B y B maduros (Valentine y col., J. Biol. Chem. 264(19), 11282-11287, 1989; y Einfield, D.A. y col., EMBO J. 7(3), 711-717, 1988). La CD20 se halla en la superficie de más del 90% de células B de la sangre periférica u órganos linfoides, se expresa durante el desarrollo temprano de las células pre-B y se conserva hasta la diferenciación celular plasmática. La CD20 está presente tanto en las células B normales como en las células B malignas. En particular, la CD20 se expresa en más del 90% de los linfomas no de Hodgkin (NHL) de células B (Anderson y col., Blood 63(6), 1424-1433, 1984) pero no se halla en células germinales hematopoyéticas, células pro-B, células plasmáticas normales u otros tejidos normales (Tedder y col., J. Immunol. 135(2), 973- 979, 1985).

20 La región carboxil-terminal de 85 aminoácidos de la proteína CD20 está situada dentro del citoplasma. La longitud de esta región contrasta con la de otras estructuras de superficie específica de células B, como son las cadenas largas de IgM, IgD e IgG o las cadenas de la clase I1 a o β de los antígenos de histocompatibilidad, que tienen regiones intracitoplasmáticas relativamente cortas de 3, 3, 28, 15 y 16 aminoácidos, respectivamente (Komaromy y col., NAR 11, 6775-6785, 1983). De los últimos 61 aminoácidos del extremo carboxilo, 21 son restos ácidos, mientras que solo 2 son básicos, lo cual indica que esta región tiene una fuerte carga negativa. El número de registro del GenBank es NP-690605. Se ha pensado que la CD20 podría intervenir en la regulación de uno o varios pasos tempranos del proceso de activación y diferenciación de las células B (Tedder y col., Eur. J. Immunol. 25 vol. 16, 881-887, 1986) y podría funcionar como canal de iones calcio (Tedder y col., J. Cell. Biochem. 14D, 195, 1990).

30 Existen dos tipos diferentes de anticuerpos anti-CD20 que difieren significativamente en su modo de fijarse sobre la CD20 y en sus actividades biológicas (Cragg, M.S. y col., Blood 103, 2738-2743, 2004; y Cragg, M.S. y col., Blood 101, 1045-1052, 2003). Los anticuerpos de tipo I, como el rituximab, son potentes en citotoxicidad mediada de complemento, mientras que los anticuerpos de tipo II, como el tositumomab (Bexxar[®], B1), 11B8 y AT80, inician eficazmente la muerte de las células diana a través de la apoptosis independiente de caspasa con exposición concomitante a la fosfatidilserina.

35 Los rasgos comunes que comparten los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y de tipo II se resumen en la Tabla 1.

anticuerpos anti-CD20 de tipo I	anticuerpos anti-CD20 de tipo II
epítotope CD20 de tipo I	epítotope CD20 de tipo II
localizan la CD20 en balsas lípidas	no localizan la CD20 en balsas lípidas
mayor CDC (si es isotipo IgG1)	menor CDC (si es isotipo IgG1)
actividad de ADCC (si es isotipo IgG1)	actividad de ADCC (si es isotipo IgG1)
plena capacidad de fijación	capacidad reducida de fijación
agregación homotípica	agregación homotípica más fuerte
inducción de apoptosis después de reticulación	fuerte inducción de muerte celular sin reticulación

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

Descripción detallada de la invención

El término "anticuerpo" abarca las diversas formas de anticuerpos que incluyen, pero no se limitan a: los anticuerpos enteros, los anticuerpos humanos, los anticuerpos humanizados y los anticuerpos obtenidos por ingeniería genética, por ejemplo los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos quiméricos o los anticuerpos recombinantes así como los fragmentos de dichos anticuerpos en el supuesto de que conserven las propiedades características según la invención.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, en general por lo menos la porción de fijación al antígeno o la región variable de la misma. Los ejemplos de fragmento de anticuerpos incluyen a los "diacuerpos" (diabodies), moléculas de anticuerpo de cadena simple, inmunotoxinas y anticuerpos multiespecíficos formados con fragmentos de anticuerpos. Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden a los polipéptidos de cadena simple que tienen las características de una cadena VH, a saber, que son capaces de ensamblarse con una cadena VL o de una cadena VL que se fija sobre el antígeno CD20, a saber, que es capaz de ensamblarse con una cadena VH para formar una bolsa funcional de fijación sobre el antígeno.

Los "fragmentos de anticuerpo" abarcan también a los fragmentos que de por sí no son capaces de aportar funciones efectoras (ADCC/CDC), pero que proporcionan esta función de una manera según la invención después de haberse combinado con dominio(s) constante(s) de anticuerpos apropiados.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se emplean aquí indican una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición única de aminoácidos. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" indica anticuerpos que presentan una especificidad de fijación única, que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una forma de ejecución, los anticuerpos monoclonales humanos se producen en un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, p.ej. un ratón transgénico, que tiene un genoma que contiene un transgén de cadena larga humano y un transgén de cadena corta humano fusionados en una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo quimérico" indica un anticuerpo monoclonal que contiene una región variable, es decir, una región de fijación, de una fuente o especie y por lo menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, que se obtiene habitualmente por técnicas de DNA recombinante. Son especialmente preferidos los anticuerpos quiméricos que tienen una región variable murina y una región constante humana. Tales anticuerpos quiméricos murino/humanos son el producto de genes de inmunoglobulina expresada que contienen segmentos de DNA que codifican a las regiones variables de inmunoglobulina murina y segmentos de DNA que codifican a las regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de "anticuerpos quiméricos" abarcados por la presente invención son aquellas, en las que la clase o subclase se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original. Tales anticuerpos "quiméricos" se denominan también "anticuerpos de clase modificada". Los métodos para la obtención de anticuerpos quiméricos incluyen las técnicas convencionales de DNA recombinante y las técnicas de transfección genética, ahora ya bien conocidas en la técnica, véase, p.ej. Morrison, S.L. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855, 1984; US-5,202,238 y US-5,204,244.

El término "anticuerpo humanizado" indica anticuerpos en los que la estructura o las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) se han modificado para incluir a las CDR de una inmunoglobulina de diferentes especificidad si se compara con la de la inmunoglobulina original. En una forma preferida de ejecución se injerta una CDR murina en una región estructural de un anticuerpo humano para obtener el "anticuerpo humanizado", véase, p.ej., Riechmann, L. y col., Nature 332, 323-327, 1988; y Neuberger, M.S. y col., Nature 314, 268-270, 1985. Las CDR especialmente preferidas corresponden a las que representan secuencias que reconocen a los antígenos mencionados anteriormente para los anticuerpos quiméricos y bifuncionales.

El término "anticuerpo humano", tal como se emplea aquí incluye a los anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. in Chemical Biology 5, 368-374, 2001). En base a esta tecnología se pueden producir anticuerpos humanos contra una gran variedad de dianas. Se describen ejemplos de anticuerpos humanos por ejemplo en Kellermann, S.A. y col., Curr. Opin. Biotechnol. 13, 593-597, 2002.

El término "anticuerpo recombinante humano", tal como se emplea aquí incluye a todos los anticuerpos humanos que se han preparado, expresado, creado o aislado por métodos recombinantes, por ejemplo los anticuerpos aislados a partir de una célula hospedante, como pueda ser una célula NSO o CHO o a partir de un animal (p.ej. un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado a una célula hospedante. Tales anticuerpos recombinantes humanos tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana en una forma reordenada. Los anticuerpos recombinantes humanos según la invención se han sometido a una hipermutación somática "in vivo". Por consiguiente, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, a pesar de derivarse de y estar relacionadas con las secuencias VH

y VL de línea germinal humana, no pueden existir de modo natural dentro del repertorio de líneas germinales humanas "in vivo".

5 Tal como se emplean aquí, "fijación específica" o "se fija específicamente a" indican un anticuerpo que se fija específicamente sobre un antígeno CD20. La afinidad de fijación tiene con preferencia un valor KD de 10^{-9} moles/l o menos (p.ej. 10^{-10} moles/l), con mayor preferencia con un valor KD de 10^{-10} moles/l o menos (p.ej. 10^{-12} moles/l). La afinidad de fijación se determina con un ensayo estándar de fijación, por ejemplo la técnica de resonancia de plasmón de superficie (Biacore®).

10 El término "molécula de ácido nucleico", tal como se emplea aquí, incluye a las moléculas de DNA y de RNA. Una molécula de ácido nucleico puede tener una hebra simple o una doble hebra, pero con preferencia será un DNA de doble hebra.

15 Los "dominios constantes" no intervienen directamente en la fijación del anticuerpo sobre un antígeno, pero intervienen en las funciones del efector (ADCC, fijación de complemento y CDC).

20 La "región variable" (región variable de una cadena corta (VL), región variable de una cadena larga (VH)) tal como se emplea aquí indica cualquier par de cadenas corta y larga que intervienen directamente en la fijación del anticuerpo sobre el antígeno. Los dominios de cadenas cortas y largas humanas variables tienen la misma estructura general y cada dominio contiene cuatro regiones estructurales (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones estructurales adoptan una conformación de hoja b y las CDR pueden formar bucles que conectan con la estructura de hoja b. Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por regiones estructurales y, junto con las CDR de la otra cadena, forman un sitio de fijación de antígeno. Las regiones de cadena larga y corta CDR3 del anticuerpo desempeñan un papel especialmente importante en la especificidad de fijación/ afinidad de los anticuerpos según la invención y por ello constituyen otro objeto de la invención.

30 Los términos "región hipervariable" o "porción de un anticuerpo que se fija sobre el antígeno" se emplean aquí para indicar los restos de aminoácido de un anticuerpo que son los que producen la fijación sobre el antígeno. La región hipervariable consta de restos aminoácido de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones de "estructura" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable distintas de los restos de región hipervariable ya definidas antes. Por consiguiente, las cadenas cortas y largas de un anticuerpo contienen, entre los extremos N y C, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. En especial, la CDR3 de la cadena larga es la región que más contribuye a la fijación sobre el antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y/o los restos de un "bucle hipervariable".

40 Los términos "CD20" y "antígeno CD20" se emplean indistintamente e incluyen todas las variantes, isoformas y especies homólogas y de la CD20 humana, que se expresan de modo natural por parte las células o se expresan en células transfectadas con el gen CD20. La fijación de un anticuerpo de la invención sobre el antígeno CD20 media en la muerte de las células que expresan al CD20 (p.ej., una célula tumoral), ya que inactivan al CD20. La muerte de las células que expresan al CD20 puede ocurrir por uno o más de los mecanismos siguientes.

45 Los sinónimos de CD20, ya reconocidos en la técnica, incluyen al antígeno CD20 de linfocito B, antígeno B1 de superficie de linfocito B, Leu-16, Bp35, BM5 y LF5.

El término "anticuerpo anti-CD20" según la invención es un anticuerpo que se fija específicamente sobre el antígeno CD20. En función de las propiedades de fijación y de las actividades biológicas de los anticuerpos anti-CD20 con respecto al antígeno CD20, cabe distinguir dos tipos de anticuerpos anti-CD20 (anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II) Cragg, M.S. y col., Blood 103, 2738-2743, 2004; y Cragg, M.S. y col., Blood 101, 1045-1052, 2003, ver tabla 2.

anticuerpos anti-CD20 de tipo I	anticuerpos anti-CD20 de tipo II
epítotope CD20 de tipo I	epítotope CD20 de tipo II
localizan la CD20 en balsas lípidas	no localizan la CD20 en balsas lípidas
mayor CDC (si es isotipo IgG1)	menor CDC (si es isotipo IgG1)
actividad de ADCC (si es isotipo IgG1)	actividad de ADCC (si es isotipo IgG1)

plena capacidad de fijación	capacidad reducida de fijación
agregación homotípica	agregación homotípica más fuerte
inducción de apoptosis después de reticulación	fuerte inducción de muerte celular sin reticulación

Tabla 2: Propiedades de los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II

Una propiedad esencial de los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y de tipo II es su modo de fijación. Por consiguiente, los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y de tipo II pueden clasificarse por la proporción de sus capacidad de fijación sobre la CD20 en células Raji (ATCC nº CCL-86) de dichos anticuerpos anti-CD20 comparadas con las del rituximab.

Tal como se emplea aquí, "anticuerpo anti-CD20" puede ser un anticuerpo de tipo I o de tipo II. Es con preferencia un anticuerpo de tipo II.

Los anticuerpos anti-CD20 de tipo II tienen una proporción de capacidades de fijación sobre la CD20 en células Raji (ATCC nº CCL-86) de dicho anti-CD20 anticuerpo comparado con el rituximab de 0,8 a 1,2, con preferencia de 0,9 a 1,1. Los ejemplos de tales anticuerpos anti-CD20 de tipo I incluyen p.ej. al rituximab, (WO 94/11026), 1F5 IgG2a (ECACC, hibridoma; Press y col., Blood 69/2, 584-591, 1987), HI47 IgG3 (ECACC, hibridoma), 2C6 IgG1 (publicado en WO 2005/103081), 2F2 IgG1 (publicado en WO 2004/035607 y WO 2005/103081) y 2H7 IgG1 (publicado en WO 2004/056312). Con preferencia anticuerpo anti-CD20 de tipo I es un anticuerpo monoclonal que se fija sobre el mismo epítotope que el rituximab. Los anticuerpos anti-CD20 de tipo II tienen una proporción de capacidades de fijación sobre el CD20 en células Raji (ATCC-No. CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 comparado con el rituximab de 0,3 a 0,6, con preferencia de 0,35 a 0,55, con mayor preferencia de 0,4 a 0,5. Los ejemplos de tales anticuerpos anti-CD20 de tipo II incluyen p.ej. al tositumomab (B1 IgG2a), al anticuerpo IgG1 de B-Ly1 humanizado (un anticuerpo IgG1 quimérico humanizado, descrito en WO 2005/044859), 11B8 IgG1 (descrito en WO 2004/035607) y AT80 IgG1. Con preferencia, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo monoclonal que se fija sobre el mismo epítotope que el anticuerpo B-Ly1 humanizado (descrito en WO 2005/044859).

La "proporción de las capacidades de fijación sobre la CD20 en células Raji (ATCC nº CCL-86) de anticuerpos anti-CD20 comparada con el rituximab" se determina por medición directa de la inmunofluorescencia (se mide la intensidad media de fluorescencia (MFI)) empleando dicho anticuerpo anti-CD20 conjugado con Cy5 y el rituximab conjugado con Cy5 en un FACSArray (Becton Dickinson) con células Raji (ATCC nº CCL-86), del modo descrito en el ejemplo nº 2 y se calcula del modo siguiente:

proporción de capacidades de fijación al CD20 en células Raji (ATCC nº CCL-86) =

$$\frac{\text{MFI (Cy5-anticuerpo anti-CD20)}}{\text{MFI (Cy5-rituximab)}} \times \frac{\text{Cy5-proporción marcado (Cy5-rituximab)}}{\text{Cy5-proporción marcado (Cy5-anticuerpo anti-CD20)}}$$

La MFI es la intensidad de fluorescencia media. La "Cy5-proporción de marcado" tal como se emplea aquí indica el número de moléculas de marcador Cy5 por molécula de anticuerpo.

De modo típico, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I tiene una proporción de capacidades de fijación sobre la CD20 en células Raji (ATCC nº CCL-86) de dicho primer anticuerpo anti-CD20 comparado con el rituximab de 0,8 a 1,2, con preferencia de 0,9 a 1,1.

De modo típico, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II tiene una proporción de capacidades de fijación sobre la CD20 en células Raji (ATCC nº CCL-86) de dicho segundo anticuerpo anti-CD20 comparado con el rituximab de 0,3 a 0,6, con preferencia de 0,35 a 0,55, con mayor preferencia de 0,4 a 0,5.

En una forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II, con preferencia un anticuerpo B-Ly1 humanizado, tiene una mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

Se entiende por "anticuerpo que tiene una mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)" aquel anticuerpo, término ya definido antes, que tiene una mayor ADCC determinada por cualquier método idóneo conocido por los expertos en la materia. Un ensayo "in vitro" aceptado de la ADCC es el siguiente:

1) en el ensayo se utilizan células diana de las que se sabe que expresan el antígeno diana reconocido por la región del anticuerpo que se fija sobre el antígeno;

2) en el ensayo se utilizan como células efectoras las células mononucleadas de sangre periférica humana (PBMC), aisladas de la sangre de un donante sano elegido al azar;

3) el ensayo se realiza con arreglo al método siguiente:

i) se aíslan las PBMC aplicando procedimientos estándar de centrifugación por densidad y se suspenden a 5×10^6 células/ml en un medio de cultivo celular RPMI;

ii) se cultivan las células diana por métodos estándar de cultivo de tejidos, se recolectan de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad superior al 90%, se lavan en un medio de cultivo celular RPMI, se marcan con 100 micro-Curies de Cr^{51} , se lavan dos veces con medio de cultivo celular y se suspenden de nuevo en medio de cultivo celular en una densidad de 10^5 células/ml;

iii) se trasvasan 100 microlitros de la anterior suspensión final de células diana a cada hoyo de una placa de microvaloración de 96 hoyos;

iv) se somete el anticuerpo a una serie de diluciones de 4000 ng/ml a 0,04 ng/ml en medio de cultivo celular y se añaden 50 microlitros de las soluciones de anticuerpo resultantes a las células diana en la placa de microvaloración de 96 hoyos, se ensayan por triplicado varias concentraciones de anticuerpo que abarcan la totalidad del anterior intervalo de concentraciones;

v) para los controles de liberación máxima (MR), 3 hoyos adicionales de la placa, que contienen las células diana marcadas, reciben 50 microlitros de una solución acuosa al 2% (VN) de un detergente no iónico (Nonidet, Sigma, St. Louis), en lugar de la solución de anticuerpo (ver el anterior apartado iv);

vi) para los controles de liberación espontánea (SR), 3 hoyos adicionales de la placa, que contienen a las células diana marcadas, reciben 50 microlitros de medio RPMI de cultivo celular en lugar de la solución de anticuerpo (ver anterior apartado iv);

vii) después se centrifuga la placa de microvaloración de 96 hoyos a $50 \times g$ durante 1 minuto y se incuba a $4^{\circ}C$ durante 1 hora;

viii) se añaden 50 microlitros de la suspensión PBMC (ver anterior apartado i) a cada hoyo, obteniéndose una proporción de efector:células diana de 25:1 y se introducen las placas en un incubador en una atmósfera con un 5% de CO_2 a $37^{\circ}C$ durante 4 horas;

ix) se recoge el líquido sobrenadante sin células de cada hoyo y se cuantifica experimentalmente la radiactividad liberada (ER) empleando un contador gamma;

x) se calcula el porcentaje de lisis específica de cada concentración de anticuerpos según la fórmula $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, en la que ER es la radiactividad media cuantificada (ver anterior apartado ix) de dicha concentración de anticuerpo, MR es la radiactividad media cuantificada (ver anterior apartado ix) para los controles MR (ver anterior apartado v) y SR es la radiactividad media cuantificada (ver anterior apartado ix) para los controles SR (ver anterior apartado vi);

4) "mayor ADCC" se define como un incremento del porcentaje máximo de lisis específica observado en el intervalo de concentraciones de anticuerpo ensayada antes y/o una reducción de la concentración de anticuerpo requerida para lograr la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro de un intervalo de concentraciones de anticuerpo ensayada antes. El aumento de ADCC se refiere a la ADCC medida en el ensayo anterior, mediada por el mismo anticuerpo, producida por el mismo tipo de células hospedantes, aplicando los mismos métodos estándar de producción, purificación, formulación y almacenaje, que los expertos en biología ya conocen, pero que no se producen en las células de ingeniería genética que sobreexpresan al GnTIII.

Dicha "mayor ADCC" puede obtenerse por glucoingeniería de dichos anticuerpos, es decir, ampliando dichas funciones efectoras naturales, mediadas por células, de los anticuerpos monoclonales por ingeniería de su componente oligosacárido, del modo descrito por Umana, P. y col., Nature Biotechnol. 17, 176-180, 1999 y US-6,602,684.

El término "citotoxicidad dependiente de complemento" (CDC) indica la lisis de células tumorales humanas diana por acción del anticuerpo según la invención en presencia de un complemento. La CDC se mide con preferencia por tratamiento de una preparación de células que expresan la CD20 con un anticuerpo anti-CD20 según la invención, en presencia de un complemento. Se encuentra CDC si en una concentración de 100 nM el anticuerpo induce la lisis (muerte celular) del 20% o más de las células tumorales después de 4 horas. El ensayo se lleva a cabo con preferencia con células tumorales marcadas con Cr^{51} o Eu y se mide el Cr^{51} o Eu liberados. Los controles incluyen la incubación de las células tumorales diana con un complemento, pero sin el anticuerpo.

Los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II típicos del isotipo IgG1 poseen propiedades CDC características. Los anticuerpos anti-CD20 de tipo I tienen una mayor CDC (si es el isotipo IgG1) y los anticuerpos anti-CD20 de tipo II tienen una menor CDC (si es el isotipo IgG1) comparados entre sí. Con preferencia, tanto los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y como los de tipo II son anticuerpos del isotipo IgG1.

El anticuerpo "rituximab" es un anticuerpo monoclonal quimérico humano, de ingeniería genética, que contiene el dominio constante murino gamma 1, dirigido contra el antígeno CD20 humano. Este anticuerpo quimérico contiene los dominios constantes gamma 1 humanos y se identifica con el nombre "C2B8" en US-5,736,137 (Anderson y col.). El rituximab ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes que tienen linfoma no de Hodgkin de células B, positivo de CD20, recurrente o refractario, de bajo grado o folicular. Los estudios del mecanismo de acción "in vitro" ponen de manifiesto que el rituximab presenta citotoxicidad dependiente de complemento humano (CDC) (Reff y col., Blood 83(2), 435-445, 1994). Despliega además una actividad significativa en ensayos que miden la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

El término "anticuerpo B-Ly1 humanizado" indica el anticuerpo B-Ly1 humanizado descrito en WO 2005/044859 y WO 2007/031875, que se obtiene a partir del anticuerpo B-Ly1 anti-CD20 monoclonal murino (región variable de la cadena larga murina (VH): SEQ ID NO: 1; región variable de la cadena corta murina (VL): SEQ ID NO: 2, ver Poppema, S. y Visser, L., Biotest Bulletin 3, 131-139, 1987) por quimerización con un dominio constante humano de IgG1 y posterior humanización (véase WO 2005/044859 y WO 2007/031875). Estos "anticuerpos B-Ly1 humanizados" se describen con detalle en WO 2005/044859.

Además, el anticuerpo B-Ly1 humanizado es con preferencia un anticuerpo IgG1. Con preferencia, dichos anticuerpos B-Ly1 humanizados son productos de glucoingeniería (GE) de la región Fc según procedimientos descritos en WO 2005/044859, WO 2004/065540, Umana, P. y col., Nature Biotechnol. 17, 176-180, 1999 y WO 99/154342. Tales anticuerpos B-Ly1 humanizados de glucoingeniería tienen un modelo alterado de glucosilación en la región Fc, tienen con preferencia un nivel reducido de restos fucosa. Con preferencia, por lo menos un 40% o más (en una forma de ejecución entre el 40% y el 60%, en otra forma de ejecución por lo menos el 50%, y en otra forma de ejecución ulterior por lo menos el 70% o más) de los oligosacáridos de la región Fc no están fucosilados. Además, los oligosacáridos de la región Fc están con preferencia bisectados. El "anticuerpo B-Ly1 humanizado" contiene la VH B-HH6 y la VL B-KV1 de WO2005/044859. Tal como se emplea aquí, dicho anticuerpo se denomina también "HuMab<CD20>". En otra forma de ejecución especialmente preferible, dicho anticuerpo tiene un nivel reducido de restos fucosa, ya definidos antes, y/o los oligosacáridos de la región Fc están con preferencia especial bisectados. En otra forma de ejecución especialmente preferida, dicho anticuerpo despliega una mayor ADCC, ya definida antes.

El componente oligosacárido puede afectar de modo significativo las propiedades relevantes para la eficacia de una glucoproteína terapéutica, incluidas la estabilidad física, la resistencia al ataque de las proteasas, las interacciones con el sistema inmune, la farmacocinética y la actividad biológica específica. Dichas propiedades pueden depender no solo de la presencia o ausencia, sino también de las estructuras específicas de los oligosacáridos. Pueden hacerse algunas generalizaciones entre la estructura de oligosacárido y la función de la glucoproteína. Por ejemplo, ciertas estructuras de oligosacárido median en la eliminación rápida de la glucoproteína del torrente sanguíneo gracias a las interacciones con las proteínas que se fijan sobre carbohidratos específicos, mientras que otras pueden fijarse en anticuerpos y desencadenar reacciones inmunes no deseadas (Jenkins y col., Nature Biotechnol. 14, 975-81, 1996).

Las células de mamíferos son los hospedantes preferidos para la producción de glucoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad de glucosilar proteínas de la forma más compatible para la aplicación humana (Cumming y col., Glycobiology 1, 115-30, 1991; Jenkins y col., Nature Biotechnol. 14, 975-81, 1996). Las bacterias muy raramente glucosilan a las proteínas y al igual que otros tipos de hospedantes comunes, por ejemplo levaduras, hongos filamentosos, células de insectos y plantas, dan lugar a modelos de glucosilación asociados con la eliminación rápida del torrente sanguíneo, interacciones inmunes no deseables y, en algunos casos concretos, una actividad biológica reducida. Entre las células de mamíferos, las que más se han utilizado durante las dos últimas décadas son las células de ovarios de hámster chino (CHO). Además, dando modelos de glucosilación idóneos, estas células permiten la generación consistente de líneas celulares clónicas muy productivas, genéticamente estables. Pueden cultivarse hasta densidades muy elevadas en biorreactores simples empleando medios sin suero y permite el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales empleadas habitualmente son las células de riñón de hámster infantil (BHK), células de mieloma de ratón NSO y SP2/0. En fechas más recientes se ha probado también la producción a partir de animales transgénicos (Jenkins y col., Nature Biotechnol. 14, 975-81, 1996).

Todos los anticuerpos contienen estructuras de hidrato de carbono en posiciones conservadas de las regiones constantes de cadena larga, cada isotipo posee un ordenamiento distinto de estructuras de hidrato de carbono unidas a N, lo cual afecta de modo variable el ensamblamiento, la secreción o la actividad funcional de la proteína (Wright, A. y Morrison, S.L., Trends Biotech. 15, 26-32, 1997). La estructura del hidrato de carbono unido sobre N varía de modo considerable en función del grado de procesado y puede incluir oligosacáridos complejos de alto contenido en manosa, de ramificaciones múltiples y también biantenarios (Wright, A. y Morrison, S.L., Trends Biotech. 15, 26-32, 1997). De modo típico existe un procesado heterogéneo de estructuras de núcleo oligosacárido

unidas a un sitio particular de glucosilación, de modo que incluso los anticuerpos monoclonales existen en glucoformas múltiples. De igual manera se ha demostrado que ocurren diferencias importantes en la glucosilación de anticuerpos entre líneas celulares e incluso se han observado diferencias menores en una línea celular determinada que se haya cultivado en condiciones diferentes (Lifely, M.R. y col., *Glycobiology* 5(8), 813-22, 1995).

Una manera de obtener incrementos grandes de potencia, manteniendo un proceso de producción sencillo y evitando potencialmente efectos secundarios indeseables, consiste en ampliar las funciones efectoras naturales, mediadas por células, de los anticuerpos monoclonales por ingeniería de su componente oligosacárido, tal como se describe en Umana, P. y col., *Nature Biotechnol.* 17, 176-180, 1999 y US-6,602,684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos más utilizados en la inmunoterapia contra el cáncer, son glucoproteínas que tienen un sitio de glucosilación unido a N conservado, en el Asn297 de cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos a Asn297 están enterrados entre dos dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipéptido y su presencia es esencial para que el anticuerpo pueda medir en funciones efectoras, como son la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Lifely, M.R. y col., *Glycobiology* 5, 813-822, 1995; Jefferis, R. y col., *Immunol. Rev.* 163, 59-76, 1998; Wright, A. y Morrison, S.L., *Trends Biotechnol.* 15, 26-32, 1997).

Se ha demostrado previamente que la sobreexpresión de la $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I11 ("GnTII17y"), una glucosiltransferasa, que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados, en células de ovario de hámster chino (CHO) aumenta significativamente la actividad ADCC "in vitro" de un anticuerpo monoclonal quimérico antineuroblastoma (chCE7) producido por células CHO de ingeniería genética (ver Umana, P. y col., *Nature Biotechnol.* 17, 176-180, 1999; y WO 99/154342, cuyos contenidos se incorporan a la presente en su totalidad como referencias). El anticuerpo chCE7 pertenece a un grupo grande de anticuerpos monoclonales no conjugados que tienen una gran afinidad y especificidad tumorales, pero tienen una potencia insuficiente para ser útiles en sentido clínico cuando se produce en líneas celulares industriales estándar que carecen de la enzima GnTIII (Umana, P. y col., *Nature Biotechnol.* 17, 176-180, 1999). Este estudio fue el primero en demostrar que se podrían obtener grandes incrementos de la actividad ADCC por ingeniería de las células que produce al anticuerpo, para que expresen a la GnTIII, lo cual a su vez conduce a un incremento de la proporción de oligosacáridos bisectados asociados a la región constante (Fc), incluidos los oligosacáridos no fusosilados bisectados, por encima de los niveles encontrados en los anticuerpos de origen natural.

El término "expresión del antígeno CD20" indica un nivel significativo de expresión del antígeno CD20 en una célula, con preferencia en la superficie de una célula T o B, con mayor preferencia una célula B, de un tumor y de un cáncer, respectivamente, con preferencia un tumor no sólido. Los pacientes que tienen un "cáncer que expresa al CD20" pueden determinarse por ensayos estándar ya conocidos de la técnica. La "expresión del antígeno CD20" indica también con preferencia un nivel significativo del antígeno CD20 en una célula, con preferencia en la superficie de una célula T o B, con mayor preferencia de una célula B, en una enfermedad autoinmune. La expresión del antígeno CD20 se mide p.ej. aplicando una detección inmunohistoquímica (IHC), FACS o una detección basada en la PCR del mRNA correspondiente.

El término "cáncer que expresa al CD20" tal como se emplea aquí indica con preferencia los linfomas (con preferencia linfoma no de Hodgkin de células B (NHL) y leucemias linfocíticas. Tales linfomas y leucemias linfocíticas incluyen p.ej. a) los linfomas foliculares, b) linfomas de células pequeñas no divididas/linfoma de Burkitt (incluyendo el linfoma endémico de Burkitt, el linfoma esporádico de Burkitt y los linfomas no de Burkitt) c) los linfomas de zonas marginales (incluido el linfoma de extranodal de zona marginal de células B (linfomas de tejido linfático asociado a mucosa, MALT), el linfoma nodal de zona marginal de células B y el linfoma esplénico de zona marginal) d) linfoma de células de manto (MCL), e) linfoma de células grandes (incluido el linfoma difuso de células B grandes (DLCL), el linfoma difuso de células grandes, el linfoma inmunoblástico, el linfoma primario mediastinal de células B, el linfoma angiocéntrico-linfoma pulmonar de células B), f) el linfoma de células vellosas, g), el linfoma linfocítico, la macroglobulinemia de Waldenstrom, h), la leucemia linfocítica aguda (ALL), la leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítico pequeño (SLL), la leucemia prolinfocítica de células B, i) los neoplasmas de células plasmáticas, el mieloma de células plasmática, el mieloma múltiple, el plasmacitoma, j), la enfermedad de Hodgkin.

Con preferencia, el cáncer que expresa la CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL). En especial, el cáncer que expresa la CD20 es un linfoma de células de manto (MCL), una leucemia linfocítica aguda (ALL), una leucemia linfocítica crónica (CLL), un linfoma difuso de células B grandes (DLCL), un linfoma de Burkitt, un linfoma de células vellosas, un linfoma folicular, un mieloma múltiple, un linfoma de zona marginal, un trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD), un linfoma asociado al VIH, una macroglobulinemia de Waldenstrom o un linfoma primario del SNC.

Tal como se emplea aquí, "enfermedad autoinmune" indica una enfermedad o trastorno que surge de o está dirigido contra los tejidos propios del individuo. Los ejemplos de enfermedades y trastornos autoinmunes incluyen, pero no se limitan a: la artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriática), la psoriasis, la dermatitis, la polimiositis/dermatomiositis, la necrólisis epidérmica tóxica, el escleroderma sistémico y la esclerosis, las respuestas asociadas con la enfermedad del intestino inflamatorio, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el síndrome del distrés respiratorio, el síndrome del distrés respiratorio del adulto (ARDS), la meningitis, la encefalitis, la uveítis, la colitis, la glomerulonefritis, los estados patológicos alérgicos, el eccema, el asma, los estados

patológicos que implican la infiltración de células T y las respuestas inflamatorias crónicas, la aterosclerosis, la miocarditis autoinmune, la deficiencia de adhesión de leucocitos, el lupus eritematoso sistémico (SLE), la diabetes de inicio juvenil, la esclerosis múltiple, la encefalomielititis alérgica, las respuestas inmunes asociadas a una hipersensibilidad aguda o retardada mediadas por citoquinas y linfocitos T, la tuberculosis, la sarcoidosis, la granulomatosis, incluida la granulomatosis de Wegener, la agranulocitosis, la vasculitis (incluida la ANCA), la anemia aplásica, la anemia de Diamond Blackfan, la anemia hemolítica inmune, incluida la anemia hemolítica autoinmune (AIHA), la anemia perniciosa, la aplasia de glóbulos rojos pura (PRCA), la deficiencia del factor VIII, la hemofilia A, la neutropenia autoinmune, la pancitopenia, la leucopenia, las enfermedades que implican diapédesis de leucocitos, los trastornos inflamatorios del sistema nervioso central (SNC), el síndrome de lesiones orgánicas múltiples, la miastenia grave, las enfermedades mediadas por complejos de antígeno-anticuerpo, las enfermedades de membrana de base antiglomerular, el síndrome de anticuerpo anti-fosfolípido, la neuritis alérgica, la enfermedad de Bechet, el síndrome de Castleman, el síndrome de Goodpasture, el síndrome miasténico de Lambert-Eaton, el síndrome de Reynaud, el síndrome de Sjorgen, el síndrome de Stevens Johnson, el penfigoide vesicular, el pénfigo, las poliendocrinopatías autoinmunes, las nefropatías, las polineuropatías de IgM o la neuropatía mediada por la IgM, la púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), la trombocitopenia autoinmune, la enfermedad autoinmune de testículos y ovarios, incluidas la orquitis y la ooforitis autoinmunes, el hipotiroidismo primario, las enfermedades endocrinas autoinmunes, incluido la tiroiditis autoinmune, la tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), la tiroiditis subaguda, el hipotiroidismo idiopático, la enfermedad de Addison, la enfermedad de Grave, los síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes de endocrinopatía poliglandular I), la diabetes de tipo I, también llamada diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM), el síndrome de Sheehan, la hepatitis autoinmune, la neumonitis intersticial linfoide (VIH), la bronquiolitis obliterans (no trasplante) frente al NSIP, el síndrome de Guillain-Barre, la vasculitis de vasos grandes (incluida la polimialgia reumática y la arteritis de células gigantes (arteritis de Takayasu), la vasculitis de vasos medios (incluida la enfermedad de Kawasaki y la poliarteritis nodosa), la espondilitis anquilosante, la enfermedad de Berger (nefropatía de IgA), la glomerulonefritis progresiva rápida, la cirrosis biliar primaria, la esprue celíaca (enteropatía del gluten), la crioglobulinemia, la esclerosis lateral amitrófica (ALS), la enfermedad de la arteria coronaria, etc.

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos empleados con arreglo a la presente invención se fabrican para el almacenaje mezclando un anticuerpo que tenga el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales, farmacéuticamente aceptables (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. (coordinador) 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas.

El término "tensioactivo" se emplea aquí para indicar un agente tensioactivo farmacéuticamente aceptable. En la formulación de la invención, la cantidad de tensioactivo se describe como porcentaje expresado en peso/volumen. La unidad empleada con mayor frecuencia de peso/volumen es el mg/ml. Los tensioactivos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a los tensioactivos no iónicos, por ejemplo el TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Se incluyen además, aunque no se limitan a ellos, los ésteres polietileno-sorbita-ácidos grasos, los polietileno-polipropileno-glicoles, los poli(óxido de etileno)-estearatos y los dodecilsulfato sódicos. Los ésteres de polietileno-sorbita preferidos son los ésteres de polietileno(20)-sorbita (sinónimo de polisorbatos 20, suministrados con la marca comercial Tween™ 20) y el monooleato de polioxietileno(20)-sorbita (sinónimo de polisorbato 80, comercializado con el nombre comercial de Tween™ 80). Los polietileno-polipropileno-glicoles preferidos son los suministrados con los nombres de Pluronic® F68 o Poloxamer 188™. Es más preferido el Ploxamer™ 188. Los polioxietileno-estearatos preferidos son los suministrados con el nombre comercial de Myrij™. Los monolauriléteres de polioxietileno son los comercializados con el nombre de Brij™. Cuando se emplean ésteres de polietileno-sorbita-polietileno(20)-sorbita (Tween™ 20) y monooleato de polioxietileno(20)sorbita (Tween™ 80), por lo general se emplean en una cantidad del 0,001 al 1%, con preferencia del 0,005 al 0,1% y con mayor preferencia del 0,01% al 0,04% p/v.

El término "tampón" se emplea aquí para indicar un tampón farmacéuticamente aceptable. Los tampones farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se limitan a: tampones de histidina, tampones citrato, tampones succinato, tampones acetato y tampones fosfato. Los tampones preferidos contienen L-histidina o mezclas de L-histidina con clorhidrato de L-histidina con agentes isotónicos y potencialmente se ajusta el pH con un ácido o una base, ya conocidos en la técnica. La más preferida es la L-histidina. Los tampones de histidina recién mencionados se emplean por lo general en una cantidad comprendida entre 1 mM y 100 mM, con preferencia entre 5 mM y 50 mM y con mayor preferencia todavía de 20 mM. Con independencia del tampón empleado, el pH tendrá que ajustarse a un valor comprendido entre 4,5 y 7,0, con preferencia entre 5,5 y 6,5 y con mayor preferencia en torno a 6,0 mediante la adición de un ácido o de una base, ya conocidos en la técnica o empleando mezclas adecuadas de componentes tampón o ambos.

El término "agentes isotónicos" se emplea aquí para indicar agentes isotónicos farmacéuticamente aceptables. Los agentes isotónicos se emplean para obtener una formulación isotónica. Una formulación isotónica es un líquido o un líquido reconstituido a partir de una forma sólida, p.ej. una forma liofilizada e indica una solución que tiene la misma tonicidad que otra solución con la que se compara, por ejemplo una solución salina fisiológica y el suero sanguíneo.

Los agentes isotónicos idóneos incluyen, pero no se limitan a: sales, incluidos pero sin limitarse a ellos: el cloruro sódico (NaCl) o el cloruro potásico, los azúcares, incluidos pero sin limitarse a ellos: la glucosa, la sucrosa, la trehalosa o la glicerina y cualquier componente del grupo de los aminoácidos, azúcares, sales y combinaciones de los mismos. Los agentes isotónicos se emplean por lo general en una cantidad comprendida entre 5 mM y 350 mM.

5 El término "líquido" empleado aquí en relación con la formulación según la invención indica una formulación que es líquida a una temperatura de por lo menos 2 - 8 °C.

10 El término "liofilizado" empleado aquí en relación con la formulación según la invención indica una formulación que se ha secado por congelación y posterior sublimación del hielo del contenido congelado por cualquier método de liofilización ya conocido en la técnica, por ejemplo con las máquinas de liofilización disponibles en el mercado.

15 El término "sales" se emplea aquí para indicar una sal entre 1 mM y 500 mM. Los ejemplos no limitantes de sales incluyen sales de cualquier combinación de cationes sodio, potasio, calcio o magnesio con aniones cloruro, fosfato, citrato, succinato, sulfato o mezclados de los mismos.

20 El término "aminoácido" se emplea aquí para indicar un aminoácido en una cantidad de 1 a 100 mg/ml, que comprende pero no se limita a: arginina, glicina, ornitina, glutamina, asparagina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, isoleucina, leucina, alanina, fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, serina, prolina.

25 El término "azúcar" se emplea aquí para indicar un azúcar farmacéuticamente aceptable, empleado en una cantidad entre 25 mM y 500 mM. Con preferencia entre 100 y 300 mM. Con mayor preferencia entre 220 y 260 mM. Con preferencia especial de 240 mM. Los azúcares idóneos comprenden, pero no se limitan a: monosacáridos y disacáridos. Los ejemplos no limitantes de azúcares según la invención incluyen a la trehalosa, sucrosa, manita, sorbita, lactosa, glucosa, manosa, maltosa, galactosa, fructosa, sorbosa, rafinosa, glucosamina, N-metilglucosamina (también llamada "meglumina"), galactosamina, ácido neuramínico y combinaciones de los mismos. La más preferida es la trehalosa.

30 El término "estabilizante" indica estabilizantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo pero sin limitarse a ellos: aminoácidos y azúcares descritos en las secciones anteriores así como los dextransos de todo tipo y peso molecular ya conocidos en la técnica, que son productos comerciales.

35 El término "antioxidante" indica un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Este puede incluir excipientes del tipo metionina, alcohol bencílico o cualquier otro excipiente empleado para minimizar la oxidación.

40 El término "un método de tratamiento" o sus equivalentes cuando se aplican, por ejemplo, al cáncer indican un procedimiento o modo de acción diseñado para reducir o eliminar el número de células cancerosas de un paciente o para aliviar los síntomas de un cáncer. "Un método de tratamiento" del cáncer o de otro trastorno proliferativo no significa necesariamente que las células cancerosas u otros trastornos se eliminarán realmente, sino que el número de células o el trastorno se reducirán de hecho o que los síntomas del cáncer o de otro trastorno se aliviarán realmente. A menudo, un método de tratamiento del cáncer se efectuará incluso cuando tenga poca probabilidad de éxito, pero que, dado el historial médico del paciente y el período de supervivencia estimado del mismo, se cree que a pesar de todo inducirá un curso de acción beneficioso en su conjunto.

45 La formulación según la invención puede presentarse en forma líquida, en forma liofilizada o en forma líquida reconstituida a partir de una forma liofilizada.

50 En una forma de ejecución, la formulación según la invención es una formulación liofilizada. La formulación liofilizada según la invención tiene la ventaja de una mejor estabilidad con respecto a la formación de aglomerados de partículas de peso molecular más elevado, que normalmente es difícil de conseguir con formulaciones líquidas de la misma concentración del anticuerpo anti-CD20 descrito.

55 La formulación según la invención puede administrarse por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) o por cualquier otra vía parenteral administración ya conocida en la técnica farmacéutica.

60 Además, una formulación según la invención puede contener conservantes (por ejemplo cloruro de octadecildimetilbencil-amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil-paraben del tipo metil- o propil-paraben; catecol; resorcina; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (de menos de 10 restos); proteínas del tipo albúmina del suero, gelatina o inmunoglobulinas; agentes quelantes, como el EDTA; contraiones formadores de sales, por ejemplo el sodio; complejos metálicos (p.ej. complejos de Zn-proteína).

65 Los ingredientes activos pueden estar atrapados dentro de microcápsulas fabricadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización, por ejemplo, de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de presentación farmacológica coloidal (por ejemplo,

liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. (coordinador), 1980.

5 Pueden fabricarse preparaciones de entrega sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones entrega sostenida incluyen las estructuras semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, dichas estructuras se presentan en forma de artículos moldeados, p.ej. láminas o microcápsulas. Los ejemplos de estructuras de entrega sostenida incluyen a los poliésteres, hidrogeles (por ejemplo de poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o polivinilalcohol), las polilactidas (US 3,773,919), los copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-L-glutamato de etilo, copolímeros de etileno/acetato de vinilo no degradables, copolímeros degradables de ácido láctico/ácido glicólico, por ejemplo el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico/ácido glicólico y leuprolida-acetato) y el ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

15 Las formulaciones destinadas a la administración "in vivo" tienen que ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Con preferencia, la formulación de la invención contiene uno o más agentes isotónicos en una cantidad de 5 mM a 350 mM ya definidos antes.

20 Con preferencia, la formulación de la invención contiene un azúcar en una cantidad de 25 mM a 500 mM ya definido antes.

25 Con preferencia también, la formulación de la invención contiene además uno o varios de los ingredientes siguientes: antioxidantes, ácido ascórbico, glutatona, conservantes, p.ej., m-cresol, fenol, alcohol bencílico, metilparaben, propilparaben, clorobutanol, tiomersal, cloruro de benzalconio, polietilenglicoles, p.ej. PEG 3000, 3350, 4000, 6000, albúminas, albúmina de suero humano (HSA), albúmina de suero bovino (BSA), alcoholes polihídricos, glicerina, etanol, manita, sales, sales acetato (p.ej. acetato sódico), cloruro magnésico, cloruro cálcico, trometamina, EDTA, (p.ej. Na-EDTA).

30 Con preferencia además, la formulación de la invención contiene uno o más estabilizantes ya definidos antes e ingredientes también conocidos en la técnica como "lioprotectores", por ejemplo azúcares, alcoholes de azúcar, aminoácidos y dextranos ya conocidos en la técnica.

Se describen las formulaciones siguientes, en forma líquida, liofilizada o líquida a partir de formas liofilizadas: o bien

35 10 mg/ml de HuMab<CD20>, 0,01% de polisorbato 20 p/v, 20 mM de L-histidina y 140 mM de cloruro sódico, de pH 6,0;

40 o bien 15 mg/ml de HuMab<CD20>, Opcionalmente de 0,001 a 1% p/v de un tensioactivo, 20 mM de L-histidina, de pH 6,0;

50 o bien 10 mg/ml de HuMab<CD20>, 0,02% de polisorbato 20 p/v, 20 mM de L-histidina y 240 mM de trehalosa, de pH 6,0;

55 o bien 25 mg/ml de HuMab<CD20>, 0,02% de polisorbato 20 p/v, 20 mM de L-histidina y 240 mM de trehalosa, de pH 6,0;

60 o bien 25 mg/ml de HuMab<CD20>, 0,02% de Poloxamer 188™ p/v, 20 mM de L-histidina y 240 mM de trehalosa, de pH 6,0;

5 o bien
25 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,01% de Poloxamer 188TM p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0;

10 o bien
25 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,1% de Poloxamer 188TM p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0;

15 o bien
25 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,02% de Polisorbato 80 p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0;

20 o bien
25 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,02% de Polisorbato 80 p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0;

25 o bien
25 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,1% de Polisorbato 80 p/v,
20 mM de acetato y
240 mM de trehalosa,
de pH 5,5;

30 o bien
25 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,1% de Polisorbato 80 p/v,
20 mM de acetato y
140 mM de cloruro sódico,
de pH 5,5;

35 o bien
30 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,01% de Poloxamer 188TM p/v,
20 mM de L-histidina y
200 mM de trehalosa,
de pH 6,5.

40 Las formulaciones del invento e describen en las reivindicaciones.
45 En una forma preferida de ejecución de la formulación según la invención, la formulación se presenta en forma liofilizada y después de la reconstitución con la cantidad apropiada de agua para inyección contiene:

50 10 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,02% de polisorbato 20 p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0.

55 Esta formulación tiene una buena estabilidad después de un almacenaje a 2-8°C y 25° con estabilidad adecuada en lo que respecta a temas críticos físicos, como son la agregación y los temas críticos químicos, como es la fragmentación.

60 En una forma preferida de ejecución de la formulación según la invención, la formulación es de forma líquida y contiene:

65 25 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,02% de Poloxamer 188TM p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0.

En una forma preferida de ejecución, la formulación es útil para prevenir o reducir las metástasis o demás diseminaciones en dicho paciente que sufra un cáncer que expresa la CD20. La formulación es útil para aumentar la duración de la supervivencia de tal paciente, aumentar la progresión de supervivencia libre de tal paciente, aumentar la duración de la respuesta, que se traduce en una mejor estadística y clínicamente significativa del paciente tratado, medida en forma de duración de supervivencia, progreso de supervivencia libre, grado de respuesta o duración de respuesta. En una forma preferida de ejecución, la formulación es útil para aumentar el grado de respuesta en un grupo de pacientes.

En el contexto de esta invención pueden utilizarse otros agentes adicionales, citotóxicos, quimioterapéuticos o anticancerosos, o compuestos que aumentan los efectos de tales agentes, en el tratamiento de combinación con la formulación de anticuerpo anti-CD20 según la invención.

Tales agentes incluyen, por ejemplo: agentes alquilantes o agentes de acción alquilante, por ejemplo la ciclofosfamida (CTX; p.ej. Cytoxan[®]), clorambucilo (CHL; p.ej. Leukeran[®]), cisplatino (CisP; p.ej. Platinol[®]), busulfan (p.ej. Myleran[®]), melfalan, carmustina (BCNU), estreptozotocina, trietilenomelamina (TEM), mitomicina C y similares; anti-metabolitos, por ejemplo el metotrexato (MTX), etoposido (VP16; p.ej. Vepesid[®]), 6-mercaptopurina (6MP), 6-tioguanina (6TG), citarabina (Ara-C), 5-fluoruracilo (5-FU), capecitabina (p.ej. Xeloda[®]), dacarbazina (DTIC) y similares; los antibióticos, por ejemplo la actinomicina D, doxorubicina (DXR; p.ej. Adriamycin[®]), daunorubicina (daunomicina), bleomicina, mitramicina y similares; los alcaloides, por ejemplo los alcaloides de la vinca, por ejemplo la vincristina (VCR), vinblastina y similares; y otros agentes antitumorales, por ejemplo el paclitaxel (p.ej. Taxol[®]) y derivados de paclitaxel, los agentes citostáticos, los glucocorticoides, por ejemplo la dexametasona (DEX; p.ej. Decadron[®]) y los corticosteroides, por ejemplo la prednisona, los inhibidores nucleósidos de enzimas, por ejemplo la hidroxiaurea, las enzimas reductoras de aminoácidos, por ejemplo la asparaginasa, leucovorina y otros derivados de ácido fólico y agentes antitumorales diversos similares. Los siguientes agentes pueden utilizarse como agentes adicionales: arnifostina (p.ej. Etyol[®]), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), doxorubicina lipo (p.ej. Doxil[®]), gemcitabina (p.ej. Gemzar[®]), daunorubicina lipo (p.ej. Daunoxome[®]), procarbazona, mitomicina, docetaxel (p.ej. Taxotere[®]), aldesleucina, carboplatino, oxaliplatino, cladribina, camptotecina, CPT 11 (irinotecan), 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, ifosfamida, idarubicina, mesna, interferón beta, interferón alfa, mitoxantrona, topotecan, leuprolida, megestrol, melfalan, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobroman, plicamicina, tamoxifeno, teniposido, testolactona, tioguanina, tiotepa, uracilo mostaza, vinorelbina, clorambucilo. Con preferencia, el tratamiento de combinación de anticuerpos anti-CD20 se aplica sin tales agentes adicionales.

El uso de agentes citotóxicos y anticancerosos recién descritos así como fármacos anticancerosos específicos de dianas antiproliferantes, como son los inhibidores de proteína-quinasas, en regímenes quimioterapéuticos está bien caracterizado en general en las técnicas terapéuticas anticancerosas y su uso aquí se sitúa en las mismas consideraciones para el seguimiento de la tolerancia y de la eficacia y para el control de las vías de administración y de las dosis, con algunos ajustes. Por ejemplo, las dosis actuales de agentes citotóxicos pueden variar en función de la respuesta del paciente a las células de cultivos, determinada empleando métodos de histocultivo. En general, la dosis se reducirá si se compara con la cantidad empleada en ausencia de otros agentes adicionales.

Las dosis típicas de agente citotóxico eficaz pueden situarse dentro de los intervalos recomendados por el fabricante y, cuando sea indicado por las respuestas "in vitro" o las respuestas en modelos animales, podrán reducirse en torno a un orden de magnitud de la concentración o cantidad. Por consiguiente, la dosis actual dependerá del criterio del facultativo, del estado general de salud del paciente y de la eficacia del método terapéutico en base a la respuesta "in vitro" de las células malignas cultivadas primarias o de la muestra de tejido histocultivado o de las respuestas observadas en modelos animales apropiados.

En el contexto de esta invención, una cantidad eficaz de radiación ionizante puede aplicarse y/o un compuesto radiofarmacéutico puede utilizarse en adición a la formulación de anticuerpo anti-CD20 según la invención. El foco de radiación puede ser externo o interno al paciente tratado. Si el foco es externo al paciente, la terapia se conoce como terapia de radiación de rayos externos (EBRT). Cuando el foco de radiación es interno al paciente, el tratamiento se denomina braquiterapia (BT). Los átomos radiactivos que pueden emplearse en el contexto de esta invención pueden elegirse dentro del grupo que incluye, pero no se limita a: radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yodo-123, yodo-131 e indio-111. También es posible marcar el anticuerpo con estos isótopos radiactivos. Se emplea con preferencia la formulación de anticuerpo anti-CD20 sin tal radiación ionizante.

La terapia de radiación es un tratamiento estándar para controlar los tumores no resectables o inoperables y/o las metástasis tumorales. Se han observado resultados mejorados cuando la terapia de radiación se combina con la quimioterapia. La terapia de radiación se basa en el principio de que la dosis elevada de radiación aplicada a una zona diana se traducirán en la muerte de las células reproductivas tanto de tejidos tumorales como normales. El régimen de dosis de radiación se define en general en términos de dosis de radiación absorbida (Gy), tiempo y

fraccionamiento y el oncólogo tendrá que definirlo con gran cuidado. La cantidad de radiación que recibe un paciente dependerá de varias consideraciones, pero las dos más importantes son la ubicación del tumor en relación a otras estructuras u órganos críticos del cuerpo y la extensión que ha tomado el tumor en su propagación. Un método típico de tratamiento de un paciente sometido a terapia de radiación será un programa de tratamiento de 1 a 6 semanas de duración, con una dosis total de 10 a 80 Gy, administrada al paciente en una sola fracción diaria de 1,8 a 2,0 Gy, durante 5 días por la semana. En una forma preferida de ejecución de esta invención existe sinergismo cuando los tumores de pacientes humanos se tratan con el tratamiento de combinación de la invención y la radiación. En otras palabras, la inhibición del crecimiento tumoral mediante los agentes contenidos en la combinación de la invención resulta potenciada cuando se combina con la radiación, opcionalmente con otros agentes quimioterapéuticos o anticancerosos adicionales. Los parámetros de las terapias de radiación adyuvante se describen, por ejemplo, en WO 99/60023.

La formulación de anticuerpo se administra al paciente según métodos conocidos, por inyección intravenosa en forma de bolo o por infusión continua a lo largo de un período de tiempo, por inyección intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasnoval o intratecal. Es preferida la administración intravenosa o subcutánea de los anticuerpos.

La invención se refiere además a un kit caracterizado porque comprende un contenedor o recipiente, una composición dentro del contenedor que consta de dicha formulación de anticuerpo anti-CD20 y un prospecto que instruye al usuario acerca de la composición para administrar la formulación de anticuerpo anti-CD20 a un paciente que sufre cáncer que expresa la CD20.

El término "prospecto" indica las instrucciones que habitualmente se incluyen en envases comerciales de productos terapéuticos, que puede incluir información acerca de las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y/o avisos relativos al uso de tales productos terapéuticos.

En una forma preferida de ejecución, el artículo de los contenedores de fabricación puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable. El artículo de fabricación puede incluir además un diluyente estéril, que se almacena con preferencia en un contenedor adicional separado.

Tal como se emplea aquí, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material compatible con la administración farmacéutica, a saber disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción y otros materiales y compuestos compatibles con la administración farmacéutica. Excepto el caso de que un medio o agente convencional se incompatible con el compuesto activo, en los demás supuestos se contempla el uso del mismo en las composiciones de la invención. Pueden incorporarse también a las composiciones otros compuestos activos suplementarios.

En otra forma de ejecución de la invención, la formulación según la invención contiene un anticuerpo anti-CD20 de tipo I, que se co-administra con un anticuerpo anti-CD20 de tipo II según la invención. Las formulaciones según la invención pueden ser dos formulaciones separadas para cada uno de los anticuerpos anti-CD20. Como alternativa, la formulación presente puede contener los dos anticuerpos en una formulación.

En otra forma de ejecución de la invención, la formulación según la invención contiene un anticuerpo anti-CD20, dicho anticuerpo anti-CD20 se co-administra con un agente activo anti-Bcl-2. El término "Bcl-2" se emplea aquí para indicar proteínas Bcl-2 (Swiss Prot ID No. P10415), miembros de la familia de proteínas Bcl-2. El término "agente activo anti-Bcl-2" incluye a los "nucleótidos antisentido anti-Bcl-2" y a los "inhibidores de Bcl-2". Los "nucleótidos antisentido anti-Bcl-2" regulan reduciendo los niveles de mRNA de la Bcl-2 y reduciendo la expresión de la proteína Bcl-2. Los ejemplos de tales nucleótidos antisentido anti-Bcl-2 incluyen al Oblimersen y SPC-2996. Tal como se emplea aquí, el ABT-737 significa la N-[4-[4-(4'-clorobifenil-2-ilmetil)piperazin-1-il]benzoil]-3-[3-(dimetilamino)-1(R)-(fenilsulfanilmetil)propilamino]-4-nitrobenzenosulfonamida; 4-[4-(4'-clorobifenil-2-ilmetil)piperazin-1-il]-N-[3-[3-(dimetilamino)-1(R)-(fenilsulfanilmetil)propilamino]-4-nitrofenilsulfonil]benzamida, un inhibidor de la Bcl-2 que se ha descrito en el documento WO 2006/099667 o Corey, S. y col., Cancer Cell 5-6, 2005. Tal como se emplea aquí, el BT-263 significa un inhibidor de la Bcl-2 que se describe en el documento US 2007-027135. Con preferencia, el agente activo anti-Bcl-2 se elige entre el Oblimersen, SPC-2996, TA-402, Gossypol, AT-101, Obatoclax mesilato, A-371191, A-385358, A-438744, ABT-737, AT-101, BL-11, BL-193, GX-15-003, 2-metoxiantimicina A₃, HA-14-1, KF-67544, purpurogalina, TP-TW-37, YC-137 y Z-24. El agente activo anti-Bcl-2 es con preferencia un inhibidor de la fijación de la proteína Bcl-2 que tiene una IC₅₀ de su actividad inhibidora anti-Bcl-2 de 5 μM o menos. Dicho inhibidor de la fijación de la proteína Bcl-2 se elige con preferencia entre el Gossypol, AT-101, Obatoclax mesilato, ABT-263 y ABT-737, con mayor preferencia entre el ABT-263 y el ABT-737.

En otra forma adicional de ejecución de la invención, la formulación según la invención contiene un anticuerpo anti-CD20, dicho anticuerpo anti-CD20 se co-administra con un inhibidor de proteasoma. El término "inhibidor de proteasoma" tal como se emplea aquí indica agentes que inhiben la actividad del proteasoma 26S. Tales inhibidores de proteasoma incluyen entre otros p.ej. los derivados peptídicos, tales como los aldehídos peptídicos (p.ej. MG132, MG115, CEP-1615, PSI, o el inhibidor específico de inmunoproteasoma IPSI-001 (Cbz-LnL-CHO = N-carbobenciloxileucil-norleucinal, véase US 2006/0241056), los boronatos peptídicos (p.ej. bortezomib (PS-341) o DFLB), las

epoxicetonas peptídicas (p.ej. epoxomicina, dihidroeponemicina o el derivado de epoxomicina carfilzomib (PR-171)), o vinilsulfonas peptídicas (p.ej. NLVS) y los derivados no peptídicos, por ejemplo la salinosporamida A (NPI-0052), los derivados de la salinosporamida A, la lactacistina o los derivados de lactacistina (p.ej. clasto-lactacistina-L-lactona (omuralida) o PS-519). Los diferentes tipos y estructuras de dichos inhibidores de proteasoma se han descrito p.ej. en Kisselev, A.L. y col., *Chem. Biol.*, vol. **8** (8), 739-758, 2001; WO 2004/004749 y Joazeiro, C. y col., *Cancer Res.* **66**(16), 7840-7842, 2006; Kanagasabapathy y col., *Curr. Opin. Investig. Drugs* **8**, 447-51, 2007; Adams, J., *Nat. Rev. Cancer* **4**, 349-360, 2004; y US 2006/0241056.

Tal inhibidor de proteasoma se elige con preferencia entre los aldehídos peptídicos (con preferencia el N-carbobenciloxi-leucil-norleucinal (IPSI-001)), los boronatos peptídicos (con preferencia bortezomib (PS-341)), las epoxicetonas peptídicas (con preferencia el derivado de epoxomicina carfilzomib (PR-171)), o la salinosporamida A (NPI-0052). Con mayor preferencia, tal inhibidor de proteasoma se elige entre el bortezomib (PS-341), el carfilzomib (PR-171), la salinosporamida A (NPI-0052) y el N-carbobenciloxi-leucil-norleucinal (IPSI-001).

En una forma preferida de ejecución, el inhibidor de proteasoma es un derivado peptídico elegido entre los aldehídos peptídicos (con preferencia el N-carbobenciloxi-leucil-norleucinal (IPSI-001)), los boronatos peptídicos (con preferencia el bortezomib (PS-341)) o las epoxicetonas peptídicas. En otra forma de ejecución, el inhibidor de proteasoma es un boronato peptídico (con preferencia el bortezomib (PS-341); véase, p.ej., Adams, *Cur. Opin. Chem. Biol.* **6**, 493-500, 2002 y US 5,780,454).

El inhibidor de proteasoma tiene con preferencia una IC50 de actividad inhibidora anti-proteasoma de 5 μ M o menos, con mayor preferencia de 1 μ M o menos. Un ensayo de base celular para identificar tales inhibidores de proteasoma y para determinar la IC50 de actividad inhibidora anti-proteasoma (mediante series de diluciones y cálculos empleando un ajuste de curvas no lineal (programa informático XLfit (ID Business Solution Ltd., Guilford, Surrey, GB)) se ha descrito en Moravec y col., *Cell Notes* **15**, 4-7, 2006, utilizando el reactivo Proteasoma-Glo™ Cell-Based Assay Reagent de Promega con células U266 (mieloma de plasma humano). Este ensayo de tipo “añadir-mezclar-medir” permite medir la actividad de proteasa tipo quimotripsina asociada al proteasoma de células cultivadas.

Además del IPSI-001 (Cbz-LnL-CHO = N-carbobenciloxi-leucil-norleucinal) son también inhibidores de proteasoma preferidos los siguientes derivados peptídicos de US 2006/ 0241056: N-carbobenciloxi-homofenilalanil-fenilalanil, N-carbobenciloxi-leucil-fenilalanil, N-carbobenciloxi-alanil-fenilalanil, N-carbobenciloxi-glicil-prolil-alanil-fenilalanil, N-carbobenciloxi-glicil-prolil-fenilalanil-fenilalanil, N-carbobenciloxi-glicil-fenilalanil-fenilalanil, N-carbobenciloxi-leucil-norleucina-ácido borónico, N-carbobenciloxi-fenilalanil-fenilalanina-ácido borónico, N-carbobenciloxi-homofenilalanil-fenilalanina-ácido borónico, N-carbobenciloxi-leucil-fenilalanina-ácido borónico, N-carbobenciloxi-glicil-prolil-alanil-fenilalanina-ácido borónico, N-carbobenciloxi-glicil-prolil-fenilalanil-fenilalanina-ácido borónico, N-carbobenciloxi-leucil-leucil-fenilalanina-ácido borónico, N-carbobenciloxi-glicil-fenilalanil-fenilalanina-ácido borónico, N-carbobenciloxi-leucil-norleucina/metil-vinil-sulfona, N-carbobenciloxi-fenilalanil-fenilalanina/metil-vinil-sulfona, N-carbobenciloxi-homofenilalanil-fenilalanina/metil-vinil-sulfona, N-carbobenciloxi-leucil-fenilalanina/metil-vinil-sulfona, N-carbobenciloxi-alanil-fenilalanina/metil-vinil-sulfona, N-carbobenciloxi-glicil-prolil-alanil-fenilalanina/metil-vinil-sulfona, N-carbobenciloxi-glicil-prolil-fenilalanil-fenilalanina/metil-vinil-sulfona, N-carbobenciloxi-leucil-leucil-fenilalanina/metil-vinil-sulfona, N-carbobenciloxi-glicil-fenilalanil-fenilalanina/metil-vinil-sulfona, N-carbobenciloxi-leucil-norleucina/epoxi-cetona, N-carbobenciloxi-fenilalanil-fenilalanina/epoxi-cetona, N-carbobenciloxi-homofenilalanil-fenilalanina/epoxi-cetona, N-carbobenciloxi-leucil-fenilalanina/epoxi-cetona, N-carbobenciloxi-alanil-fenilalanina/epoxi-cetona, N-carbobenciloxi-glicil-prolil-alanil-fenilalanina/epoxi-cetona, N-carbobenciloxi-glicil-prolil-fenilalanil-fenilalanina/epoxi-cetona, N-carbobenciloxi-leucil-leucil-fenilalanina/epoxi-cetona y N-carbobenciloxi-glicil-fenilalanil-fenilalanina/epoxi-cetona.

Los siguientes ejemplos y figuras se aportan para facilitar la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se define en las reivindicaciones anexas. Se da por supuesto que se pueden introducir modificaciones en los procedimientos descritos sin apartarse del espíritu de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se preparan las formulaciones siguientes, ya sean líquidas, liofilizadas o líquidas reconstituidas a partir de formas líquidas:

15 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,01% de polisorbato 20 p/v,
20 mM de L-histidina y
140 mM de cloruro sódico,
de pH 6,0;

10 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,01% de polisorbato 20 p/v,
20 mM de L-histidina y
140 mM de cloruro sódico,

de pH 6,0;

5 15 mg/ml de HuMab<CD20>,
20 mM de L-histidina,
de pH 6,0;

10 10 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,02% de polisorbato 20 p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0;

15 25 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,02% de polisorbato 20 p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0.

20 Se prepara también una forma liofilizada, que, después de la reconstitución con la cantidad apropiada de agua para inyección, contiene:

25 10 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,02% de polisorbato 20 p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0.

30 Esta formulación tiene una buena estabilidad después de un almacenaje a 2-8°C y 25° con estabilidad adecuada en lo que respecta a temas críticos físicos, como es la agregación y los temas críticos químicos, como es la fragmentación.

Las formulaciones de producto farmacéutico líquidas o liofilizadas para la administración parenteral según la invención se preparan del modo siguiente.

35 Preparación de formulaciones líquidas

Se preparan las formulaciones de HuMab<CD20> por homogeneización de soluciones de HuMab<CD20> en el tampón de producción (p.ej. 20 mM de tampón de histidina de pH aprox. 6,0 o 20 mM de tampón de histidina de pH aprox. 6,0 que contiene 140 mM de cloruro sódico y 0,01% (p/v) de polisorbato 20). Pueden prepararse también las formulaciones de HuMab<CD20> ajustando la concentración proteínica al valor deseado por dilución con el tampón. Los excipientes para estabilizar la proteína y para el ajuste isotónico se añadirán si fuera necesario y normalmente se añadirán en forma disuelta o, como alternativa, en forma sólida. Se añade un tensioactivo a las formulaciones en forma de solución patrón, si fuera necesario. Todas las formulaciones se filtran en condiciones estériles a través de filtros de 0,22 µm y se dividen en ambiente aséptico en viales de vidrio estériles que se cierran con tapones de caucho o con tapones del tipo alucrimp. Estas formulaciones se almacenan a diferentes temperaturas durante intervalos diferentes de tiempo y se sacan para análisis en los tiempos indicados en los párrafos individuales. Las formulaciones se analizan: 1) por espectrofotometría UV, 2) por cromatografía de exclusión de tamaños (SEC), 3) para determinar las partículas visibles y subvisibles, 4) por cromatografía de intercambio iónico (IEC) y 5) para determinar la turbidez en solución.

50 Preparación de formulaciones liofilizadas

Las soluciones de HuMab<CD20> se preparan del modo antes descrito para las formulaciones líquidas o se fabrican por homogeneización de soluciones de HuMab<CD20> en 20 mM de tampón de histidina a pH aprox. 6,0, que contiene un azúcar y un tensioactivo. Todas las formulaciones se filtran en condiciones estériles a través de filtros de 0,22 µm y se dividen en partes alícuotas en viales de vidrio estériles. Los viales se cierran parcialmente con tapones de caucho idóneos para el uso en los procesos de liofilización y se colocan en la cámara de secado del liofilizador. Dentro del alcance de la invención se contempla cualquier método de liofilización conocido. Por ejemplo, el proceso de liofilización aplicado en este estudio incluye el enfriamiento de la formulación de la formulación de temperatura ambiente a aprox. 5°C (enfriamiento previo) y posterior congelación a -40°C (congelación I) con una velocidad gradual de enfriamiento de 1°C/min a 5°C/min. El primer paso de secado puede tener lugar con una velocidad gradual de 0,3 a 0,5°C/min desde -40°C a -30°C y después se mantiene en -30°C por lo menos durante 50 horas con una presión de cámara de aprox. 75-80 mTorr. El segundo paso de secado puede realizarse con una velocidad gradual de 0,1 a 0,3°C/min desde -30°C a 25°C, mantiene en 25°C durante por lo menos 5 horas con una presión de cámara de 50 a 80 mTorr (el régimen de secado aplicado se recoge en la tabla 1). Se observa que las formulaciones de HuMab<CD20> que se secan aplicando los procesos descritos de liofilización tienen períodos de

ES 2 511 844 T3

reconstitución adecuadamente rápidos: de unos 2-3 minutos. Todas las tortas liofilizadas en este estudio tienen un contenido residual de agua de aproximadamente 0,1-1,0 %, que se determina por el método de Karl-Fischer. Se almacenan los viales liofilizados a diferentes temperaturas durante diferentes intervalos de tiempo. Se reconstituyen las formulaciones liofilizadas con el volumen correspondiente de agua para inyección (WFI) antes de: 1) realizar el análisis por espectrofotometría UV, 2) determinación del tiempo de reconstitución, 3) análisis por cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) 4) por cromatografía de intercambio iónico (IEC), 5) determinación de partículas visibles y subvisibles y 6) por determinación de la turbidez de la solución.

Se efectúa la cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) para detectar los materiales solubles de peso molecular elevado (agregados) y los productos de hidrólisis de peso molecular bajo dentro de las formulaciones. El método recurre a un instrumento HPLC idóneo, equipado con un detector UV (longitud de onda para la detección: 280 nm) y una columna Zorbax GF-250 (9,4 x 250 mm, Agilent); en el método se emplea como fase móvil fosfato sódico 200 mM de pH 7,0.

Se efectúa la cromatografía de intercambio iónico (IEC) para detectar los productos de degradación química que alteran la carga neta de HuMab<CD20> en las formulaciones. En este método se emplea un instrumento HPLC apropiado, equipado con un detector UV (longitud de onda de detección: 220 y 280 nm) y una columna Dionax ProPac WCX-10 (4 mm x 250 mm). Como fases móviles A y B se emplean tampón fosfato sódico 10 mM de pH 6,0 en H₂O y tampón fosfato sódico 10 mM de pH 6,0 + NaCl 0,75 M, respectivamente, con un caudal de 1,0 ml/min.

Se efectúa la espectroscopía UV para la determinación de la concentración de proteína en un espectrofotómetro de tipo Varian Cary Bio UV a una longitud de onda de 280 nm.

Para la determinación de la turbidez se mide la opalescencia en FTU (unidades de turbidez) empleando un turbidímetro de tipo HACH 2100AN a temperatura ambiente.

Se analizan las muestras para determinar las partículas subvisibles empleando un aparato HIAC Royco PharmaSpec (HRLD-150) y para determinar las partículas visibles empleando un instrumento de inspección visual de tipo Seidenader V90-T.

Tabla 1. Ciclo de liofilización

Paso	temperatura envase (°C)	velocidad (°C/min)	duración (min)	vacío (mTorr)
enfriamiento previo	5°C	0,0	60	-
congelación I	-40°C	1,0	120	-
secado primario	-30°C	0,5	3720	80
secado secundario	+25°C	0,2	300	80

Datos de estabilidad de las formulaciones líquidas de producto farmacéutico HuMab<CD20> según esta invención
Formulación de 15 mg/ml HuMab<CD20>, 20 mM de L-histidina, de pH 6,0 xxx

Condiciones de almacenaje	Tiempo (meses)	Proteína (mg/ml)	% de SEC monómero	% de SEC HMW	turbidez	Cambios significantes CII	Partículas visibles	Partículas subvisibles
Inicial		14,5	98,4	1,6	5,9	No	Paso	Paso
2-8°C	1	14,7	98,1	1,8	5,9	No	Paso	Paso
	3	15,5	97,9	2,0	6,1	No	Paso	Paso
	6	14,2	97,7	2,1	5,7	No	Paso	Paso
25°C	1	14,8	98,0	1,7	5,7	No	Paso	Paso
	3	15,0	97,8	1,8	5,8	No	Paso	Paso
	6	14,6	97,3	1,9	6,1	si	Fallo	Paso
40°C	1	14,8	97,6	1,6	5,8	No	Paso	Paso
	3	15,1	96,1	1,9	6,2	si	Paso	Paso
	1	14,8	98,4	1,6	6,3	n/d	Fallo	Paso

ES 2 511 844 T3

-20°C	3	15,1	98,1	1,8	6,2	No	Fallo	Paso
	6	14,3	97,7	2,3	6,1	No	Fallo	Paso
-80°C	3	15,0	98,2	1,6	5,8	No	Fallo	Paso
	6	14,9	98,4	1,6	5,7	No	Fallo	Paso

n/d: no determinado

Paso: de exento a esencialmente exento de partículas visibles, max 6000 partículas $\geq 10\mu\text{m}$ /contenedor, max 600 partículas $\geq 25\mu\text{m}$ /contenedor

5 Formulación de 10 mg/ml de HuMab<CD20>, 20 mM de L-histidina, 240 mM de trehalosa, 0,02% p/v de Polisorbato 20, de pH 6,0

Condiciones de almacenaje	Tiempo (meses)	Proteína (mg/ml)	% de SEC monómero	% de SEC HMW	turbidez	Cambios significantes CII	Partículas visibles	Partículas sub-visibles
Inicial		11,0	98,4	1,6	3,9	No	Paso	Paso
2-8°C	1	11,1	98,3	1,6	4,0	No	Fallo	Paso
	3	11,3	98,2	1,7	6,6	No	Fallo	Paso
	6	10,8	98,1	1,7	8,3	No	Fallo	Paso
25°C	1	11,0	98,3	1,4	6,4	No	Fallo	Paso
	3	11,3	98,2	1,5	6,7	No	Fallo	Paso
	6	11,2	98,8	1,4	6,7	si	Fallo	Paso
40°C	1	11,1	98,0	1,3	7,5	No	Fallo	Paso
	3	11,2	96,7	1,5	4,9	si	Fallo	Paso
-20°C	1	11,0	98,5	1,5	3,4	No	Paso	Paso
	3	11,2	98,3	1,6	4,0	No	Paso	Paso
	6	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
-80°C	3	11,2	98,3	1,6	3,7	No	Paso	Paso
	6	11,0	98,5	1,5	3,8	No	Paso	Paso

n/d: no determinado

10 Paso: de exento a esencialmente exento de partículas visibles, max 6000 partículas $\geq 10\mu\text{m}$ /contenedor, max 600 partículas $\geq 25\mu\text{m}$ /contenedor

Datos de estabilidad de las formulaciones liofilizadas de producto farmacéutico HuMab<CD20> según esta invención

15 Formulación de 10 mg/ml de HuMab<CD20>, 20 mM de L-histidina, 240 mM de trehalosa, 0,02% p/v de Polisorbato 20, de pH 6,0

Condiciones de almacenaje	Tiempo (meses)	Proteína (mg/ml)	% de SEC monómero	% de SEC HMW	turbidez	Pico principal % CII	Partículas visibles	Partículas sub-visibles
---------------------------	----------------	------------------	-------------------	--------------	----------	----------------------	---------------------	-------------------------

ES 2 511 844 T3

Inicial		10,4	98,9	1,1	2,9	54,8	Paso	Paso
2-8°C	1	10,5	98,9	1,1	2,9	n/d	Paso	Paso
	3	10,4	98,9	1,1	2,9	n/d	Paso	Paso
	6	10,4	98,9	1,1	3,4	53,1	Paso	Paso
	12	10,4	98,9	1,1	3,1	56,6	Paso	Paso
	24	10,3	98,9	1,1	3,1	55,6	Paso	Paso
25°C	1	10,2	98,9	1,1	2,9	n/d	Paso	Paso
	3	10,5	98,9	1,1	2,9	n/d	Paso	Paso
	6	10,4	98,9	1,1	3,3	52,9	Paso	Paso
	12	10,4	98,9	1,1	3,1	56,9	Paso	Paso
40°C	1	10,5	98,9	1,1	3,0	n/d	Paso	Paso
	3	10,4	98,9	1,1	3,0	n/d	Paso	Paso
	6	10,5	98,9	1,1	3,4	50,9	Paso	Paso

n/d: no determinado

Paso: de exento a esencialmente exento de partículas visibles, max 6000 partículas $\geq 10\mu\text{m}$ /contenedor, max 600 partículas $\geq 25\mu\text{m}$ /contenedor

5 Ejemplo 2

Se preparan las formulaciones siguientes, ya sean líquidas, liofilizadas o líquidas reconstituidas a partir de formas liofilizadas.

10 25 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,02% de Poloxamer 188TM p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0;

15 o bien
25 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,01% de Poloxamer 188TM p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
20 de pH 6,0;

25 o bien
25 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,1% de Poloxamer 188TM p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0;

30 o bien
25 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,02% de Polisorbato 80 p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0;

35 o bien
25 mg/ml de HuMab<CD20>,

0,1% de Polisorbato 80 p/v,
20 mM de acetato y
240 mM de trehalosa,
de pH 5,5;

5

o bien
25 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,1% de Polisorbato 80 p/v,
20 mM de acetato y
140 mM de cloruro sódico,
de pH 5,5;

10

o bien
30 mg/ml de HuMab<CD20>,
0,01% de Poloxamer 188TM p/v,
20 mM de L-histidina y
200 mM de trehalosa,
de pH 6,5;

15

20 Se preparan del modo siguiente las formulaciones líquidas o liofilizadas de producto farmacológico para la administración parenteral.

Preparación de formulaciones líquidas

25 Se preparan las formulaciones de HuMab<CD20> por homogeneización de soluciones de HuMab<CD20> en el tampón de producción (p.ej. 20 mM de tampón de histidina de pH aprox. 6,0 o 20 mM de tampón de histidina de pH aprox. 6,0 que contiene 240 mM de trehalosa y un 0,02 % (p/v) de Poloxamer 188TM. Pueden prepararse también las formulaciones de HuMab<CD20> por diafiltración de soluciones de aprox. 10-40 mg/ml de HuMab<CD20> en
30 tampón de producción (p.ej. 20 mM de tampón de histidina de pH aprox. 6,0) con filtración de flujo tangencial (TFF) para aumentar la concentración de proteína por encima de la concentración de proteína deseada y para cambiar el tampón. Pueden prepararse también las formulaciones de HuMab<CD20> ajustando la concentración proteína al valor deseado por dilución con el tampón. Los excipientes para estabilizar la proteína y para el ajuste isotónico se añadirán si fuera necesario y normalmente se añadirán en forma disuelta o, como alternativa, en forma sólida. Se añade un tensioactivo a las formulaciones en forma de solución patrón, si fuera necesario. Todas las formulaciones
35 se filtran en condiciones estériles a través de filtros de 0,22 µm y se dividen en ambiente aséptico en viales de vidrio estériles que se cierran con tapones de caucho o con tapones del tipo alucrimp. Estas formulaciones se almacenan a diferentes temperaturas durante intervalos diferentes de tiempo y se sacan para análisis en los tiempos indicados en los párrafos individuales. Las formulaciones se analizan: 1) por espectrofotometría UV, 2) por cromatografía de exclusión de tamaños (SEC), 3) para determinar las partículas visibles y subvisibles, 4) por cromatografía de intercambio iónico (IEC) y 5) para determinar la turbidez en solución.

40

Preparación de formulaciones liofilizadas

45 Las soluciones de HuMab<CD20> se preparan del modo antes descrito para las formulaciones líquidas. Todas las formulaciones se filtran en condiciones estériles a través de filtros de 0,22 µm y se dividen en partes alícuotas en viales de vidrio estériles. Los viales se cierran parcialmente con tapones de caucho idóneos para el uso en los procesos de liofilización y se colocan en la cámara de secado del liofilizador. Dentro del alcance de la invención se contempla cualquier método de liofilización conocido. Por ejemplo, el proceso de liofilización aplicado en este estudio incluye el enfriamiento de la formulación de temperatura ambiente a aprox. 5°C (enfriamiento previo) y posterior congelación a -40°C (congelación I) con una velocidad gradual de enfriamiento de 1°C/min a 5°C/min. El primer paso de secado puede tener lugar con una velocidad gradual de 0,3 a 0,5°C/min desde -40°C a -30°C y después se mantiene en -30°C por lo menos durante 50 horas con una presión de cámara de aprox. 75-80 mTorr. El segundo paso de secado puede realizarse con una velocidad gradual de 0,1 a 0,3°C/min desde -30°C a 25°C, mantiene en 25°C durante por lo menos 5 horas con una presión de cámara de 50 a 80 mTorr (el régimen de secado
55 aplicado se recoge en la tabla 1). Se observa que las formulaciones de HuMab<CD20> que se secan aplicando los procesos descritos de liofilización tienen períodos de reconstitución adecuadamente rápidos: de unos 2-3 minutos. Todas las tortas liofilizadas en este estudio tienen un contenido residual de agua de aproximadamente 0,1-1,0 %, que se determina por el método de Karl-Fischer. Se almacenan los viales liofilizados a diferentes temperaturas durante diferentes intervalos de tiempo. Se reconstituyen las formulaciones liofilizadas con el volumen correspondiente de agua para inyección (WFI) antes de: 1) realizar el análisis por espectrofotometría UV, 2) determi-
60 nación del tiempo de reconstitución, 3) análisis por cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) 4) por cromatografía de intercambio iónico (IEC), 5) determinación de partículas visibles y subvisibles y 6) por determinación de la turbidez de la solución.

60

65 Se efectúa la cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) para detectar los materiales solubles de peso molecular elevado (agregados) y los productos de hidrólisis de peso molecular bajo dentro de las formulaciones. El método

ES 2 511 844 T3

recurre a un instrumento HPLC idóneo, equipado con un detector UV (longitud de onda para la detección: 280 nm) y una columna Zorbax GF-250 (9,4 x 250 mm, Agilent); en el método se emplea como fase móvil fosfato sódico 200 mM de pH 7,0 ó cloruro potásico 250 mM en fosfato potásico 200 mM, de pH 7,0.

5 Se efectúa la cromatografía de intercambio iónico (IEC) para detectar los productos de degradación química que alteran la carga neta de HuMab<CD20> en las formulaciones. En este método se emplea un instrumento HPLC apropiado, equipado con un detector UV (longitud de onda de detección: 220 y 280 nm) y una columna Dionax ProPac WCX-10 (4 mm x 250 mm). Como fases móviles A y B se emplean tampón fosfato sódico 10 mM de pH 6,0 en H₂O y tampón fosfato sódico 10 mM de pH 6,0 + NaCl 0,75 M, respectivamente, con un caudal de 1,0 ml/min.

10 Se efectúa la espectroscopía UV para la determinación de la concentración de proteína en un espectrofotómetro de tipo Varian Cary Bio UV a una longitud de onda de 280 nm.

15 Para la determinación de la turbidez se mide la opalescencia en FTU (unidades de turbidez) empleando un turbidímetro de tipo HACH 2100AN a temperatura ambiente.

20 Se analizan las muestras para determinar las partículas subvisibles empleando un aparato HIAC Royco PharmaSpec (HRLD-150) y para determinar las partículas visibles empleando un instrumento de inspección visual de tipo Seidenader V90-T.

Tabla 1. Ciclo de liofilización

Paso	temperatura envase (°C)	velocidad (°C/min)	duración (min)	vacío (mTorr)
enfriamiento previo	5°C	0,0	60	-
congelación I	-40°C	1,0	120	-
secado primario	-30°C	0,5	3720	80
secado secundario	+25°C	0,2	300	80

Datos de estabilidad de las formulaciones líquidas de producto farmacéutico HuMab<CD20>

25 Formulación de 25 mg/ml HuMab<CD20>, 20 mM de L-histidina, 240 mM de trehalosa, 0,02 % p/v de Poloxamer 188™, de pH 6,0

Condiciones de almacenaje	Tiempo (meses)	Proteína (mg/ml)	% de SEC monómero	% de SEC HMW	turbidez	Pico principal % CII	Partículas visibles	Partículas sub-visibles
Inicial		25,7	98,7	1,3	6,4	61,6	Paso	Paso
2-8°C	1	25,6	98,7	1,3	6,0	62,0	Paso	Paso
	3	26,1	98,6	1,3	5,9	61,0	Paso	Paso
25°C	1	25,7	98,5	1,4	6,5	62,0	Paso	Paso
	3	26,0	97,9	1,5	5,9	58,5	Paso	Paso
40°C	1	25,7	97,9	1,6	6,6	52,6	Paso	Paso
	3	25,7	91,0	2,4	6,7	33,6	Paso	Paso
-80°C	3	25,6	98,7	1,3	6,2	60,9	Paso	Paso
-20°C	3	25,5	98,7	1,3	6,3	60,8	Paso	Paso

Paso: de exento a esencialmente exento de partículas visibles, max 6000 partículas $\geq 10\mu\text{m}$ /contenedor, max 600 partículas $\geq 25\mu\text{m}$ /contenedor

30 Formulación de 25 mg/ml de HuMab<CD20>, 20 mM de L-histidina, 240 mM de trehalosa, 0,01% p/v de Poloxamer 188™, de pH 6,0

Condiciones de almacenaje	Tiempo (meses)	Proteína (mg/ml)	% de SEC monómero	% de SEC HMW	turbidez	Pico principal % CII	Partículas visibles	Partículas sub-visibles
---------------------------	----------------	------------------	-------------------	--------------	----------	----------------------	---------------------	-------------------------

ES 2 511 844 T3

Inicial		26,4	99,6	0,4	5,5	72,2	Paso	Paso
2-8°C	1	26,4	99,7	0,3	5,7	n/d	Paso	Paso
	2	26,3	99,5	0,5	5,7	72,0	Paso	Paso
	3	26,3	99,5	0,5	6,3	72,6	Paso	Paso
	9	26,2	99,4	0,6	6,0	70,8	Paso	Paso
	12	26,4	99,5	0,5	6,5	70,1	Paso	Paso
25°C	1	n/a	99,6	0,4	5,2	n/a	Paso	Paso
	2	n/a	99,4	0,6	5,7	70,6	Paso	Paso
	3	n/a	99,4	0,6	6,1	66,5	Paso	Paso
	9	26,4	95,7	0,8	5,9	58,2	Paso	Paso
	12	26,5	95,5	0,7	6,1	54,9	Paso	Paso
40°C	1	n/a	98,2	0,3	5,4	58,6	Paso	Paso
	2	n/a	97,4	0,8	5,7	50,4	Paso	Paso
	3	n/a	96,7	1,0	6,3	n/a	Paso	Paso
-80°C	9	25,7	99,5	0,5	5,9	72,3	Paso	Paso

n/a: no analizado

Paso: de exento a esencialmente exento de partículas visibles, max 6000 partículas $\geq 10\mu\text{m}$ /contenedor, max 600 partículas $\geq 25\mu\text{m}$ /contenedor

5

Formulación de 25 mg/ml de HuMab<CD20>, 20 mM L-histidina, 240mM trehalosa, 0,1% p/v Poloxamer 188™, de pH 6,0

Condiciones de almacenaje	Tiempo (meses)	Proteína (mg/ml)	% de SEC monómero	% de SEC HMW	turbidez	Pico principal % CII	Partículas visibles	Partículas sub-visibles
Inicial		26,4	99,6	0,4	5,5	71,5	Paso	Paso
2-8°C	1	26,7	99,7	0,3	6,2	n/a	Paso	Paso
	2	26,5	99,5	0,5	5,4	73,0	Paso	Paso
	3	26,4	99,5	0,5	6,3	70,9	Paso	Paso
	9	26,5	99,4	0,6	6,4	71,8	Paso	Paso
	12	26,6	99,5	0,5	5,8	70,0	Paso	Paso
25°C	1	n/a	99,6	0,4	5,2	n/a	Paso	Paso
	2	n/a	99,4	0,6	5,7	70,7	Paso	Paso
	3	n/a	99,4	0,6	6,2	67,4	Paso	Paso
	9	26,6	95,7	0,8	6,2	58,6	Paso	Paso

ES 2 511 844 T3

	12	26,6	95,4	0,7	6,0	54,9	Paso	Paso
40°C	1	n/a	98,0	0,5	5,3	59,3	Paso	Paso
	2	n/a	97,4	0,8	5,8	51,8	Paso	Paso
	3	n/a	96,6	1,1	7,0	n/a	Paso	Paso
-80°C	9	26,1	99,5	0,5	5,9	71,0	Paso	Paso

n/a: no analizado

Paso: de exento a esencialmente exento de partículas visibles, max 6000 partículas $\geq 10\mu\text{m}$ /contenedor, max 600 partículas $\geq 25\mu\text{m}$ /contenedor

5

Formulación de 25 mg/ml de HuMab<CD20>, 20 mM de acetato, 240 mM de trehalosa, 0,1% p/v de Polisorbato 80, de pH 5,5

Condiciones de almacenaje	Tiempo (meses)	Proteína (mg/ml)	% de SEC monómero	% de SEC HMW	turbidez	Pico principal % CII	Partículas visibles	Partículas sub-visibles
Inicial		24,6	99,6	0,4	8,2	71,9	Paso	Paso
2-8°C	1	24,8	99,7	0,3	4,9	n/a	Paso	Paso
	2	24,5	99,5	0,6	5,2	77,6	Paso	Paso
	3	24,3	99,4	0,6	7,0	66,2	Paso	Paso
25°C	1	n/a	99,6	0,4	6,7	n/a	Paso	Paso
	2	n/a	99,3	0,7	7,0	71,9	Paso	Paso
	3	n/a	99,2	0,8	7,3	65,1	Paso	Paso
40°C	1	n/a	97,5	1,0	26,8	52,9	Paso	Paso
	2	n/a	96,0	2,1	27,8	42,1	Paso	Paso
	3	n/a	94,4	3,2	26,8	n/a	Paso	Paso

n/a: no analizado

10 Paso: de exento a esencialmente exento de partículas visibles, max 6000 partículas $\geq 10\mu\text{m}$ /contenedor, max 600 partículas $\geq 25\mu\text{m}$ /contenedor

Formulación de 25 mg/ml de HuMab<CD20>, 20 mM de acetato, 140 mM de cloruro sódico 0,01% p/v de Polisorbato 80, pH 5,5,

Condiciones de almacenaje	Tiempo (meses)	Proteína (mg/ml)	% de SEC monómero	% de SEC HMW	turbidez	Pico principal % CII	Partículas visibles	Partículas sub-visibles
Inicial		23,7	99,5	0,5	11,4	70,9	Paso	Paso
2-8°C	1	24,4	99,6	0,4	11,4	n/a	Paso	Paso
	2	24,2	99,4	0,6	10,5	71,5	Paso	Paso
	3	24,2	99,3	0,7	12,5	71,3	Paso	Paso
25°C	1	n/a	99,5	0,5	12,0	n/a	Paso	Paso

ES 2 511 844 T3

	2	n/a	99,1	0,9	013,0	68,2	Paso	Paso
	3	n/a	99,1	0,9	13,2	64,6	Paso	Paso
40°C	1	n/a	96,9	1,2	26,8	54,0	Paso	Paso
	2	n/a	95,0	2,9	26,5	46,1	Paso	Paso
	3	n/a	93,1	4,2	26,1	n/a	Paso	Paso

n/a: no analizado

Paso: de exento a esencialmente exento de partículas visibles, max 6000 partículas $\geq 10\mu\text{m}$ /contenedor, max 600 partículas $\geq 25\mu\text{m}$ /contenedor

5 Formulación de 30g/ml de HuMab<CD20>, 20 mM de L-histidina, 200 mM de trehalosa 0,01% p/v de Poloxamer 188™, pH 6,5,

Condiciones de almacenaje	Tiempo (meses)	Proteína (mg/ml)	% de SEC monómero	% de SEC HMW	turbidez	Pico principal % CII	Partículas visibles	Partículas sub-visibles
Inicial		32,0	98,4	1,6	6,4	61,0	Paso	Paso
2-8°C	1	32,2	98,3	1,6	6,6	62,3	Paso	Paso
	3	32,9	98,1	1,7	5,7	60,5	Paso	Paso
25°C	1	32,2	98,1	1,8	6,2	60,9	Paso	Paso
	3	32,1	97,6	2,0	6,2	56,5	Paso	Paso
40°C	1	32,0	97,3	2,1	6,3	50,9	Paso	Paso
	3	32,3	89,9	3,0	7,2	31,1	Paso	Paso
-80°C	3	31,8	98,3	1,6	6,2	61,0	Paso	Paso
-20°C	3	32,1	98,3	1,6	6,6	60,7	Paso	Paso

10 Paso: de exento a esencialmente exento de partículas visibles, max 6000 partículas $\geq 10\mu\text{m}$ /contenedor, max 600 partículas $\geq 25\mu\text{m}$ /contenedor

Datos de estabilidad de formulaciones de producto farmacéutico HuMab<CD20> liofilizado

15 Formulación de 25 mg/ml de HuMab<CD20>, 20 mM de L-histidina, 240 mM de trehalosa, 0,02% p/v de Poloxamer 188™

Condiciones de almacenaje	Tiempo (meses)	Proteína (mg/ml)	% de SEC monómero	% de SEC HMW	turbidez	Pico principal % CII	Partículas visibles	Partículas sub-visibles
Inicial		25,5	98,9	1,0	6,2	61,2	Paso	Paso
2-8°C	1	25,2	99,0	1,0	5,8	63,1	Paso	Paso
	3	25,3	99,0	1,0	6,1	60,4	Paso	Paso
25°C	1	25,4	98,9	1,0	6,0	62,9	Paso	Paso
	3	25,6	96,5	1,1	6,1	60,2	Paso	Paso
40°C	1	25,3	98,9	1,1	6,3	60,6	Paso	Paso

ES 2 511 844 T3

	3	25,9	98,5	1,3	5,9	56,9	Paso	Paso
-80°C	3	25,3	98,9	1,0	6,3	61,2	Paso	Paso
-20°C	3	25,4	98,9	1,0	6,7	60,6	Paso	Paso

Paso: de exento a esencialmente exento de partículas visibles, max 6000 partículas $\geq 10\mu\text{m}$ /contenedor, max 600 partículas $\geq 25\mu\text{m}$ /contenedor

Condiciones de almacenaje	Tiempo (meses)	Proteína (mg/ml)	% de SEC monómero	% de SEC HMW	turbidez	Pico principal % CII	Partículas visibles	Partículas sub-visibles
Inicial		27,2	99,6	0,4	6,0	72,3	Paso	Paso
2-8°C	1	27,1	99,7	0,3	6,1	n/a	Paso	Paso
	2	27,0	99,5	0,5	5,8	74,0	Paso	Paso
	3	27,0	99,5	0,5	6,2	69,8	Paso	Paso
25°C	1	n/a	99,7	0,4	6,2	n/a	Paso	Paso
	2	n/a	99,5	0,5	5,4	66,2	Paso	Paso
	3	n/a	99,5	0,5	5,9	68,6	Paso	Paso
40°C	1	n/a	99,6	0,4	5,4	70,6	Paso	Paso
	2	n/a	99,4	0,6	5,4	70,1	Paso	Paso
	3	n/a	99,3	0,7	6,3	n/a	Paso	Paso

n/a: no analizado

5

Paso: de exento a esencialmente exento de partículas visibles, max 6000 partículas $\geq 10\mu\text{m}$ /contenedor, max 600 partículas $\geq 25\mu\text{m}$ /contenedor

REIVINDICACIONES

1. Una formulación que se encuentra en forma liofilizada y comprende:

5 10 mg/ml del anticuerpo B-Ly 1 humanizado comprendiendo VHB-HH6 y VL B-KV1 de la patente WO2005/044859,
0,02% de polisorbato 20 p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0.

10

2. Una formulación que comprende:

25 mg/ml del anticuerpo B-Ly 1 humanizado comprendiendo VHB-HH6 y VL B-KV1 de la patente WO2005/044859,
0,02% de Poloxamer 188™ p/v,
15 20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0;
o bien

20 25 mg/ml del anticuerpo B-Ly 1 humanizado comprendiendo VHB-HH6 y VL B-KV1 de la patente WO2005/044859,
0,01% de Poloxamer 188™ p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0;
25 o bien

25 mg/ml de del anticuerpo B-Ly 1 humanizado comprendiendo VHB-HH6 y VL B-KV1 de la patente
WO2005/044859,
0,1% de Poloxamer 188™ p/v,
30 20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0;
o bien

35 25 mg/ml del anticuerpo B-Ly 1 humanizado comprendiendo VHB-HH6 y VL B-KV1 de la patente WO2005/044859,
0,02% de Polisorbato 80 p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0;
40 o bien

30 mg/ml del anticuerpo B-Ly 1 humanizado comprendiendo VHB-HH6 y VL B-KV1 de la patente WO2005/044859,
0,01% de Poloxamer 188™ p/v,
45 20 mM de L-histidina y
200 mM de trehalosa,
de pH 6,5.

3. La formulación según la reivindicación 2, que se presenta en forma líquida y contiene:

50 25 mg/ml del anticuerpo B-Ly 1 humanizado comprendiendo VHB-HH6 y VL B-KV1 de la patente WO2005/044859,
0,02% de Poloxamer 188™ p/v,
20 mM de L-histidina y
240 mM de trehalosa,
de pH 6,0.

55

4. Uso de una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3 para la fabricación de un medicamento útil para tratar enfermedades relacionadas con la CD20.

5. El uso según la reivindicación 4, en donde la enfermedad se elige del grupo constituido por linfoma no de Hodgkin
60 de células B (NHL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica
crónica (CLL), linfoma difuso de células B grandes (DLCL), linfoma de Burkitt, leucemia de células vellosas, linfoma
folicular, mieloma múltiple, linfoma de zona marginal, trastorno linfoproliferativo post-transplante (PTLD), linfoma
asociado al VIH, macrolbulinemia de Waldenström y linfoma primario del SNC.

65