

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 052**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19	(2006.01) A61K 39/00	(2006.01)
A61K 47/10	(2006.01) A61K 9/00	(2006.01)
A61K 47/26	(2006.01)	
A61K 47/18	(2006.01)	
A61K 38/47	(2006.01)	
A61K 39/395	(2006.01)	
A61K 45/06	(2006.01)	
A61K 47/20	(2006.01)	
A61K 47/22	(2006.01)	
C07K 16/28	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2010 E 10751675 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2475353**

54 Título: **Formulaciones farmacéuticas altamente concentradas que comprenden anticuerpo anti-CD20**

30 Prioridad:

11.09.2009 EP 09170110

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

14.06.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ADLER, MICHAEL;
MAHLER, HANNS-CHRISTIAN y
STAUCH, OLIVER BORIS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 574 052 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

Formulaciones farmacéuticas altamente concentradas que comprenden anticuerpo anti-CD20

5 La presente invención, tal como se define por las reivindicaciones, se refiere a formulaciones farmacéuticas estables muy concentradas de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo o una mezcla de dichas moléculas de anticuerpo para inyección subcutánea. Dichas formulaciones, además de cantidades muy altas de anticuerpo anti-CD20 o mezclas del mismo, contienen un agente tamponador, un estabilizante o una mezcla de dos o más agentes estabilizantes, un tensioactivo no iónico y una cantidad eficaz de al menos una enzima hialuronidasa. La invención
10 se refiere también a un proceso para la fabricación de dicha formulación y a los usos de dicha formulación.

Antecedentes de la invención

15 El uso farmacéutico de anticuerpos ha ido en aumento en los últimos años. En muchos casos, dichos anticuerpos se inyectan o se infunden por vía intravenosa (i.v.). Por desgracia, la cantidad de anticuerpo que puede administrarse por vía intravenosa está limitada por las propiedades físico-químicas del anticuerpo, en particular por su solubilidad y estabilidad en una formulación líquida adecuada y por el volumen del fluido de infusión. Las vías alternativas de infusión son la inyección subcutánea o la intramuscular. Estas vías de inyección requieren una concentración alta de proteína en la solución final que va a inyectarse [Shire, S.J., Shahrokh, Z. et al., "Challenges in the development
20 of high protein concentration formulations", J. Pharm. Sci. 93(6), 1390-1402, 2004; Roskos, L.K., Davis C.G. et al., "The clinical pharmacology of therapeutic antibodies", Drug Development Research 61(3), 108-120, 2004]. Con el fin de aumentar el volumen y, de este modo, la dosis terapéutica, que puede administrarse de forma segura y confortable por vía subcutánea, se ha propuesto el uso de la(s) enzimas(s) glucosaminoglucanasa(s) con el fin de aumentar el espacio intersticial en el que puede inyectarse la formulación de anticuerpo [documento WO
25 2006/091871].

El documento W02007/005608 se refiere a proteínas de unión a IL-12p40, en particular a hIL12 o hIL-23.

30 El documento US2007/071675 se refiere a proteínas de unión que comprenden una cadena polipeptídica, en las que dicha cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n (un primer y un segundo dominio variable, un dominio constante, un aminoácido o polipéptido y una región Fc.

El documento WO2009/080541 divulga determinadas formulaciones de anticuerpo anti-CD20 de tipo II.

35 Bookbinder et al. (Journal of Controlled Release, vol. 114, n.º 2, Agosto de 2006, p. 230-241) se refieren a la despolimerización de la matriz intersticial con rHuPH20 y a pruebas de PEG-interferón alfa-2b e infliximab.

Los ejemplos de formulaciones estables de anticuerpos farmacéuticamente activos para uso terapéutico que se hallan actualmente en el mercado son los siguientes:

40 RITUXAN®/MABTHERA® (rituximab) es un anticuerpo quimérico que se une al antígeno CD20 de las células B. La formulación comercial es un concentrado líquido estéril, transparente, incoloro, exento de conservantes, para la administración intravenosa (i.v.). El rituximab se suministra con una concentración de 10 mg/ml (10 ml) en viales desechables de 100 mg o de 500 mg (50 ml). El producto se formula en cloruro sódico 9 mg/ml, citrato sódico dihidratado 7,35 mg/ml, Polisorbato 80 0,7 mg/ml y agua para inyectables. El pH se ajusta a 6,5. Una formulación líquida alternativa del rituximab, idónea para la administración i.v., se ha descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 6.991.790.

50 HERCEPTIN™ (trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor de HER2 (anti-HER2), que se comercializa actualmente en Europa en forma de 150 mg de polvo liofilizado (que contiene el anticuerpo, α , α -trehalosa dihidratada, L-histidina y clorhidrato de L-histidina y polisorbato 20), que tiene que reconstituirse para las infusiones con agua para inyectables, que proporcionará una dosis inyectable de aproximadamente en 21 mg/ml. En Estados Unidos y muchos países más se comercializa un vial de dosificación múltiple que contiene 440 mg del trastuzumab.

55 AVASTIN™ (bevacizumab) es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que se comercializa actualmente en Europa en forma de formulación líquida en dos tipos de viales: a) 100 mg del bevacizumab en 4 ml y b) 400 mg de bevacizumab en 16 ml, respectivamente, proporcionando una concentración final de 25 mg/ml en agua para inyectables que contiene los excipientes siguientes: trehalosa dihidratada, fosfato sódico y polisorbato 20.

60 Las anteriores formulaciones de anticuerpos son indicadas para la administración intravenosa, pero existe el deseo de proporcionar formulaciones farmacéuticas estables muy concentradas de anticuerpos terapéuticamente activos para inyección subcutánea. La ventaja de las inyecciones subcutáneas es que permite al médico practicante realizarlas en el paciente con una intervención bastante corta. Además, se puede enseñar al paciente a realizar la inyección subcutánea por sí solo. Normalmente las inyecciones por vía subcutánea se limitan a aproximadamente 2 ml. Para los

pacientes que necesitan dosis mayores, podrán inyectarse varias formulaciones de dosis unitaria en múltiples sitios de la superficie corporal.

5 Ya se han lanzado al mercado los dos productos de anticuerpos que siguen, destinados a la administración subcutánea.

HUMIRA™ (adalimumab) es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor alfa de necrosis tumoral (TNF alfa), que actualmente se está comercializando en Europa en forma de dosis de 40 mg en un volumen de inyección de 0,8 ml para aplicación subcutánea (concentración: 50 mg de anticuerpo/ml volumen de inyección).

10 La inyección parenteral de fármacos en la hipodermis se limita en general a volúmenes inferiores a 2 ml, debido a su resistencia viscoelástica a la conductancia hidráulica por el tejido subcutáneo (SC) y la presión de retroceso generada después de la inyección [Aukland, K. y Reed, R., "Interstitial-Lymphatic Mechanisms in the control of Extracellular Fluid Volume", en: *Physiology Reviews* 73, 1-78, 1993] así como a la percepción de dolor.

15 La fabricación de formulaciones muy concentradas de proteínas es un gran reto y se requiere adaptar cada formulación a las proteínas concretas que van a utilizarse, debido a que cada proteína tiene un comportamiento de agregación diferente. Se sospecha que los agregados provocan inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas al menos en algunos de los casos. La reacción inmunogénica contra los agregados de proteínas o de anticuerpos puede conducir a la neutralización de los anticuerpos, lo cual los convertiría en proteínas o anticuerpos terapéuticamente ineficaces. Parece que la inmunogenicidad de los agregados proteicos es muy problemática en relación con las inyecciones subcutáneas, en cuyo caso la administración repetida aumenta el riesgo de respuesta inmune.

20 Los anticuerpos tienen una estructura general muy similar, pero dichos anticuerpos difieren en la composición de aminoácidos (en particular en las regiones CDR, que intervienen en la unión con el antígeno) y en los modelos de glucosilación. Además pueden existir también modificaciones posteriores a la traducción, por ejemplo variantes de carga y de glucosilación.

30 Resumen de la invención

La presente invención proporciona una formulación farmacéutica estable, muy concentrada, de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo o una mezcla de dichas moléculas de anticuerpo, preferentemente para inyección subcutánea tal como se define por las reivindicaciones.

35 Más en concreto, la formulación farmacéutica estable muy concentrada de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo es una formulación de la presente invención que contiene:

- 40 - aproximadamente de 20 a 350 mg/ml de anticuerpo anti-CD20;
- aproximadamente de 1 a 100 mM de un agente tamponador que proporcione un pH de $5,5 \pm 2,0$;
- aproximadamente de 1 a 500 mM de un estabilizante o una mezcla de dos o más estabilizantes, en la que opcionalmente la metionina se emplea como estabilizante secundario, preferentemente con una concentración de 5 a 25 mM;
- 45 - del 0,01 al 0,1 % de un tensioactivo no iónico; y
- preferentemente una cantidad eficaz de al menos una enzima hialuronidasa.

50 XOLAIR™ (omalizumab) es un anticuerpo monoclonal dirigido contra la inmunoglobulina E (anti-IgE), que actualmente se está comercializando en forma de 150 mg de polvo liofilizado (que contiene el anticuerpo, sacarosa, histidina y monohidrato de clorhidrato de histidina y polisorbato 20), que tienen que reconstituirse con agua para inyección subcutánea, formándose una dosis inyectable de 125 mg/ml.

55 Actualmente no se dispone en el mercado de formulaciones farmacéuticas de anticuerpos anti-CD20, estables, muy concentradas, que sean apropiadas para la administración subcutánea. Existe, pues, el deseo de proporcionar dichas formulaciones farmacéuticas estables muy concentradas de anticuerpos terapéuticamente activos para inyección subcutánea.

60 Descripción detallada de la invención

El término "anticuerpo" se emplea en el presente documento en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos de longitud completa, anticuerpos modificados por ingeniería genética tales como anticuerpos monoclonales o anticuerpos recombinantes, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos de longitud completa, anticuerpos

quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos y así como fragmentos de dichos anticuerpos, en el supuesto de que posean la actividad biológica deseada.

El término "anticuerpo monoclonal" se emplea en el presente documento para indicar un anticuerpo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que forman parte de la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto las posibles variantes que puedan surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, que por lo general son variantes que están presentes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante al antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque no están contaminados con otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se ha obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se tiene que construir de modo que requiera la producción del anticuerpo por un método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse mediante el método de hibridoma descrito en primer lugar por Köhler et al., *Nature* 256, 495, 1975 o puede obtenerse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse también a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos aplicando las técnicas descritas por Clarkson et al., *Nature* 352, 624-628, 1991 y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597, 1991. Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" se emplean en el presente documento para indicar una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición de aminoácidos. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" indica anticuerpos que poseen una sola especificidad de unión, que tienen regiones variables y constantes, derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen con un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que contiene un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana, fusionados en una célula inmortalizada. La expresión "anticuerpos monoclonales" incluye en el presente documento específicamente a los llamados anticuerpos quiméricos, en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a un grupo o subgrupo concreto de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico a u homólogo a las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otro grupo o subgrupo de anticuerpos, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, en el supuesto de que posean la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851-6855, 1984). Los anticuerpos quiméricos de interés incluyen los anticuerpos "primatizados" que contienen secuencias que se unen al dominio variable del antígeno, derivadas de un primate no humano (por ejemplo, el mono del Viejo Mundo, el simio, etc.) y secuencias de región constante humanas.

Los "fragmentos de anticuerpo" contienen una porción de un anticuerpo de longitud completa, normalmente al menos la porción de unión a antígeno o la región variable de los mismos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena simple, inmunotoxinas y los anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Además, los fragmentos de anticuerpo contienen polipéptidos de cadena simple que tienen las características de la cadena VH, a saber, son capaces de agregarse junto con una cadena VL que se une al antígeno CD20. Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden además a los fragmentos que de por sí no son capaces de proporcionar funciones efectoras (ADCC/CDC) pero que proporcionan esta función de un modo de acuerdo con la invención después de haberse combinado con el o los dominios constantes apropiados de anticuerpo.

Un "anticuerpo de longitud completa" es uno que contiene una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o varias de secuencias de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo de longitud completa tiene una o más funciones efectoras.

Un anticuerpo "variante de secuencia de aminoácidos" es un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una especie principal de anticuerpo. Normalmente, las variantes de secuencias de aminoácidos tendrán al menos aproximadamente una homología del 70% con la especie principal del anticuerpo y preferentemente, tendrán al menos aproximadamente una homología del 80%, más preferentemente al menos aproximadamente una homología del 90% con la especie principal del anticuerpo. Las variantes de las secuencias de aminoácidos presentan sustituciones, eliminaciones y/o adiciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la especie principal del anticuerpo o adyacentes a la misma. Los ejemplos de variantes de secuencias de aminoácidos presentes incluyen la variante ácida (por ejemplo, variantes de anticuerpo desaminado), la variante básica, el anticuerpo con una extensión líder en el extremo amino (por ejemplo, VHS) en una o en las dos cadenas ligeras de la misma, el anticuerpo que tiene un resto lisina en el extremo C de una o de las dos cadenas pesadas del mismo, etc., e incluye las combinaciones de las variaciones de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y/o ligeras. La variante de anticuerpo de interés especial que nos ocupa es el anticuerpo que contiene una extensión líder en el extremo amino de una o de dos cadenas del mismo y opcionalmente contiene además otra secuencia de aminoácidos y/o diferencias de glucosilación con respecto a la especie principal de anticuerpo.

Un anticuerpo “variante de glucosilación” es en el presente documento un anticuerpo que tiene uno o más restos de carbohidrato unidos al mismo, que difieren en uno o más restos de carbohidrato unidos a la especie principal de anticuerpo. Los ejemplos de variantes de glucosilación de la presente invención incluyen al anticuerpo que tiene una estructura de oligosacárido G1 o G2, en lugar de una estructura de oligosacárido G0, unida a la región Fc del mismo, al anticuerpo con uno o dos restos de carbohidrato unidos a una o dos cadenas ligeras del mismo, al anticuerpo que no lleva hidratos de carbono unidos a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, etc. y combinaciones de las alteraciones de glucosilación. El término “variante de glucosilación” incluye también a los anticuerpos de glucoingeniería, por ejemplo los descritos en los documentos WO 1.331.266 y USP 7.517.670.

Las “funciones efectoras” de anticuerpo indican las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B; BCR), etc.

En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos de longitud completa pueden asignarse a diferentes “grupos”. Hay cinco grupos principales de anticuerpos de longitud completa: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varios de ellos pueden dividirse a su vez en “subgrupos” (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a los diferentes grupos de anticuerpos se denominan α [alfa], δ [delta], ϵ [epsilon], γ [gamma] y μ [mu], respectivamente. Se conocen bien las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de los diferentes grupos de inmunoglobulinas.

En el presente documento, la “actividad biológica” de un anticuerpo monoclonal indica la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno, produciendo una respuesta biológica que puede medirse “*in vitro*” e “*in vivo*”. Dicha actividad puede ser antagonista (por ejemplo, cuando el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD20) o agonista.

El término “anticuerpo humanizado” indica los anticuerpos en cuya estructura o “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR) se han modificado para que contengan la CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad, si se compara con la de la inmunoglobulina original. En una realización preferida, una CDR murina se injerta a la región marco conservada de un anticuerpo humano para preparar un “anticuerpo humanizado”. Las CDR especialmente preferidas corresponden a las que representan secuencias que reconocen a los antígenos mencionados anteriormente para los anticuerpos quiméricos y bifuncionales. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor), cuyos restos de la región hipervariable del receptor se han reemplazado por restos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), por ejemplo de ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana se han reemplazado por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden contener restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para seguir refinando las prestaciones del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado contendrá sustancialmente todos los dominios variables, pero al menos uno y típicamente dos, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de la inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado contendrá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por ejemplo la de una inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al., Nature 332, 323-327, 1988; y Neuberger, M.S. et al., Nature 314, 268-270, 1985).

El término “anticuerpo quimérico” indica un anticuerpo monoclonal que contiene una región variable, es decir, una región de unión, de una fuente o especie y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, que se obtiene habitualmente por técnicas de ADN recombinante. Son especialmente preferidos los anticuerpos quiméricos que tienen una región variable murina y una región constante humana. Dichos anticuerpos quiméricos murino/humanos son el producto de genes de inmunoglobulina expresada que contienen segmentos de ADN que codifican a las regiones variables de inmunoglobulina murina y segmentos de ADN 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. Dichos anticuerpos “quiméricos” se denominan también “anticuerpos de clase modificada”. Los métodos para la obtención de anticuerpos quiméricos incluyen las técnicas convencionales de ADN recombinante y las técnicas de transfección genética, ahora ya bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Morrison, S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855, 1984; documentos US 5.202.238 y US 5.204.244).

El término “anticuerpo humano”, tal como se emplea en el presente documento incluye 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. Pharmacol. 5, 368-374, 2001). Basándose en 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. et al., Curr. Opin. Biotechnol. 13, 593-597, 2002.

El término “anticuerpo humano recombinante” se emplea en el presente documento para incluir a todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, por ejemplo los anticuerpos aislados en una célula hospedadora, por ejemplo una célula NS0 o CHO o de un animal (por ejemplo, un ratón), que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados empleando vectores de expresión recombinantes transfectedos en una célula hospedadora. Los anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana en forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención se han sometido a una hipermutación somática “*in vivo*”. Por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que se derivan de y guardan relación con las secuencias VH y VL de línea germinal humana, pero no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos “*in vivo*”.

Tal como se usa en el presente documento “se une específicamente” o “se une específicamente a” indica un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD20. Preferentemente, la afinidad de unión tiene un valor KD de 10^{-9} moles/l o menor (por ejemplo, 10^{-10} moles/l), preferentemente un valor KD de 10^{-10} moles/l o menor (por ejemplo, 10^{-12} moles/l). La afinidad de unión se determina mediante un ensayo de unión estándar, por ejemplo la técnica de resonancia de plasmón superficial (BIACORE[®]).

El término “molécula de ácido nucleico”, tal como se emplea en el presente documento, incluye moléculas de ADN y de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente será un ADN bicatenario.

Los “dominios constantes” no intervienen directamente en la unión del anticuerpo al antígeno, pero intervienen en las funciones efectoras (ADCC, unión a complemento y CDC).

La “región variable” (región variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) tal como se emplean en el presente documento indica cualquier par de cadenas ligera y pesada que intervienen directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de cadenas ligeras y pesadas humanas variables tienen la misma estructura general y cada dominio contiene cuatro regiones marco conservadas (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres “regiones hipervariables” (o regiones determinantes de la complementariedad, CDR). Las regiones marco conservadas adoptan una conformación lámina β y las CDR pueden formar bucles que conectan con la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por regiones marco conservadas y, junto con las CDR de la otra cadena, forman un sitio de unión a antígeno. Las regiones CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo desempeñan un papel especialmente importante en la especificidad de unión/afinidad de los anticuerpos de acuerdo con la invención y por ello constituyen otro objeto de la invención.

Los términos “región hipervariable” o “porción de unión a antígeno de un anticuerpo” se emplean en el presente documento para indicar los restos de aminoácido de un anticuerpo que son los que producen la unión al antígeno. La región hipervariable consta de restos aminoácido de las “regiones determinantes de la complementariedad” o “CDR”. Las regiones “marco conservadas” o “FR” son aquellas regiones de dominio variable distintas de los restos de la región hipervariable ya definidas antes. Por consiguiente, las cadenas ligeras y pesadas 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 pesada es la región que más contribuye a la unión al antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat et al., *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”.

Los términos “CD20” y “antígeno CD20” se emplean indistintamente e incluyen todas las variantes, isoformas y especies homólogas y CD20 humano, que se expresan de modo natural por parte las células o se expresan en células transfectedas con el gen de CD20. La unión de un anticuerpo de la invención al antígeno CD20 media en la muerte de las células que expresan CD20 (por ejemplo, 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: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), inducción de la muerte celular y/o apoptosis, agregación homotípica, etc.

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 y Bp35.

El término “anticuerpo anti-CD20” de acuerdo con la invención es un anticuerpo que se fija específicamente al antígeno CD20. En función de las propiedades de unión 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) según Cragg, M.S. et al., *Blood* 103, 2738-2743, 2004; y Cragg, M.S. et al., *Blood* 101, 1045-1052, 2003, ver tabla 1.

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

anticuerpos anti-CD20 de tipo I	anticuerpos anti-CD20 de tipo II
epítipo CD20 de tipo I	epítipo 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 unión	capacidad reducida de unión
agregación homotípica	agregación homotípica más fuerte
inducción de apóptosis después de unión cruzada	fuerte inducción de muerte celular sin unión cruzada

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

Tal como se usa en el presente documento, "anticuerpo anti-CD20" puede ser un anticuerpo bien de tipo I o bien de tipo II. Preferentemente, es un anticuerpo de tipo I, lo más preferentemente es rituximab.

10 Los anticuerpos anti-CD20 de tipo I tienen una proporción de capacidades de unión a CD20 en células Raji (ATCC nº CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 comparado con rituximab de 0,8 a 1,2, preferentemente de 0,9 a 1,1. Los ejemplos de dichos anticuerpos anti-CD20 de tipo I incluyen por ejemplo, rituximab, en el documento EP 2000149B1 (Anderson et al., ver por ejemplo, las figuras 4 y 5), 1F5 IgG2a (ECACC, hibridoma; Press et al., Blood 69/2, 584-591, 1987), HI47 IgG3 (ECACC, hibridoma), 2C6 IgG1 (publicado en el documento WO 2005/103081), 2F2 IgG1 u ofatumumab (publicado en el documento WO 2004/035607 y WO 2005/103081) y 2H7 IgG1 (publicado en el documento WO 2004/056312 y WO 2006/084264, por ejemplo, las variantes publicadas en las tablas 1 y 2). Preferentemente, el anticuerpo anti-CD20 de tipo I es un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que rituximab.

20 Los anticuerpos anti-CD20 de tipo II tienen una proporción de capacidades de unión al CD20 en células Raji (ATCC-No. CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 comparado con rituximab de 0,3 a 0,6, preferentemente de 0,35 a 0,55, más preferentemente de 0,4 a 0,5. Los ejemplos de dichos anticuerpos anti-CD20 de tipo II incluyen por ejemplo, al tositumomab (B1 IgG2a), anticuerpo IgG1 B-Ly1 humanizado (un anticuerpo IgG1 quimérico humanizado, descrito en el documento WO 2005/044859), 11B8 IgG1 (descrito en el documento WO 2004/035607) y AT80 IgG1. Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo B-Ly1 humanizado (descrito en el documento WO 2005/044859).

30 La "proporción de las capacidades de unión a la CD20 en células Raji (ATCC nº CCL-86) de anticuerpos anti-CD20 comparada con 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 rituximab conjugado con Cy5 en un FACSArray (Becton Dickinson) con células Raji (ATCC nº CCL-86) y se calcula del modo siguiente:

Proporción de capacidades de unión al CD20 en células Raji (ATCC nº CCL-86) =

$$35 \frac{\text{MFI (Cy5 - anticuerpo anti - CD20)}}{\text{MFI (Cy5 - rituximab)}} \times \frac{\text{Cy5 - proporción marcado (Cy5 - rituximab)}}{\text{Cy5 - proporción marcado (Cy5 - anticuerpo anti - CD20)}}$$

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

40 Típicamente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I tiene una proporción de capacidades de unión a la CD20 en células Raji (ATCC nº CCL-86) de dicho primer anticuerpo anti-CD20 comparado con rituximab de 0,8 a 1,2, preferentemente de 0,9 a 1,1.

45 Típicamente, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II tiene una proporción de capacidades de unión a la CD20 en células Raji (ATCC nº CCL-86) de dicho segundo anticuerpo anti-CD20 comparado con rituximab de 0,3 a 0,6, preferentemente de 0,35 a 0,55, más preferentemente de 0,4 a 0,5.

50 En una realización preferida, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II, preferentemente un anticuerpo B-Ly1 humanizado, tiene una mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

Por "anticuerpo que tiene una mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)" se entiende aquel anticuerpo, término ya definido antes, que tiene una ADCC aumentada 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 une al 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 de acuerdo con el 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-Curios de ^{51}Cr , se lavan dos veces con medio de cultivo celular y se suspenden de nuevo en medio de cultivo celular a una densidad de 10^5 células/ml;

iii) se trasvasan 100 microlitros de la anterior suspensión final de células diana a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos;

iv) el anticuerpo se diluye en serie 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 microtitulación de 96 pocillos, 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 pocillos 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 pocillos 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 (véase el apartado anterior iv);

vii) después se centrifuga la placa de microtitulación de 96 pocillos a $50 \times g$ durante 1 minuto y se incuba a 4°C durante 1 hora;

viii) se añaden 50 microlitros de la suspensión PBMC (véase el apartado anterior i) a cada pocillo, obteniéndose una proporción de células efectoras:diana de 25:1 y se introducen las placas en un incubador en una atmósfera con un 5% de CO_2 a 37°C durante 4 horas;

ix) se recoge el líquido sobrenadante sin células de cada pocillo 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 $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$, en la que ER es la radiactividad media cuantificada (véase el apartado anterior ix) de dicha concentración de anticuerpo, MR es la radiactividad media cuantificada (véase el apartado anterior ix) para los controles MR (véase el apartado anterior v) y SR es la radiactividad media cuantificada (véase el apartado anterior ix) para los controles SR (véase el apartado anterior vi);

4) "ADCC aumentada" 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 hospedadoras, 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 "ADCC aumentada" 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 Umaña, P. et al., 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 de acuerdo con la invención en presencia de complemento. La CDC se mide preferentemente por tratamiento de una preparación de células que expresan CD20 con un anticuerpo anti-CD20 de acuerdo con la invención, en presencia de complemento. Se encuentra CDC si con una concentración de 100 nM el anticuerpo se induce la lisis (muerte celular) del 20% o más de las células tumorales después de 4 horas. El ensayo se lleva a

cabo preferentemente con células tumorales marcadas con ^{51}Cr o Eu y se mide el ^{51}Cr o Eu liberados. Los controles incluyen la incubación de las células tumorales diana con complemento pero sin el anticuerpo.

5 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. Preferentemente, tanto los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y como los de tipo II son anticuerpos del isotipo IgG1.

10 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 el documento EP 2000149B1 (Anderson et al.). El rituximab ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes que tienen linfoma no de Hodgkin de células B, positivo para CD20, recurrente o refractario, de bajo grado o folicular. Los estudios del mecanismo de acción "*in vitro*" ponen de manifiesto que rituximab presenta citotoxicidad dependiente de complemento humano (CDC) (Reff et al., Blood 83(2), 435-445, 1994). Despliega además una actividad significativa en ensayos que miden la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

20 El término "anticuerpo B-Ly1 humanizado" indica el anticuerpo B-Ly1 humanizado descrito en el documento 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 pesada murina (VH): SEQ ID NO: 1; región variable de la cadena ligera 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). Estos "anticuerpos B-Ly1 humanizados" se describen con detalle en el documento WO 2005/044859.

25 Preferentemente, el "anticuerpo B-Ly1 humanizado" tiene la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada entre el grupo de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:20 (de B-HH2 a B-HH9 y de B-HL8 a B-HL17 de WO 2005/044859). Son especialmente preferidas las SEQ ID NO: 3, 4, 7, 9, 11, 13 y 15 (B-HH2, BHH-3, B-HH6, B-HH8, B-HL8, B-HL11 y B-HL13 del documento WO 2005/ 044859). Preferentemente, el "anticuerpo B-Ly1 humanizado" tiene una región variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 20 (B-KV1) de WO 2005/044859. Además, el anticuerpo B-Ly1 humanizado es preferentemente un anticuerpo IgG1. Preferentemente, dichos anticuerpos B-Ly1 humanizados son productos de glucoingeniería (GE) de la región Fc según procedimientos descritos en el documento WO 2005/044859, el documento WO 2004/065540, Umaña, P. et al., Nature Biotechnol. 17, 176-180, 1999 y el documento WO 99/154342. Dichos anticuerpos B-Ly1 humanizados de glucoingeniería tienen un modelo alterado de glucosilación en la región Fc, tienen preferentemente un nivel reducido de restos de fucosa. Preferentemente, al menos un 40% o más (en una realización entre el 40% y el 60%, en otra realización al menos el 50% y en otra realización adicional al menos el 70% o más) de los oligosacáridos de la región Fc no están fucosilados. Además, los oligosacáridos de la región Fc están preferentemente bisectados. Preferentemente, el "anticuerpo B-Ly1 humanizado" contiene la VH B-HH6 y la VL B-KV1 del documento WO2005/044859. Tal como se usa en el presente documento dicho anticuerpo se denomina también "HuMab<CD20>". En otra realización especialmente preferible, dicho anticuerpo tiene un nivel reducido de restos de fucosa, ya definidos antes, y/o los oligosacáridos de la región Fc están lo más preferentemente bisectados. En otra realización especialmente preferida, dicho anticuerpo despliega una ADCC aumentada, ya definida antes.

45 El componente oligosacárido puede afectar de modo significativo a 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 et al., Nature Biotechnol. 14, 975-81, 1996).

55 Las células de mamífero son los hospedadores preferidos para la producción de glucoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad de glucosilar proteínas de la forma más compatible para la aplicación humana (Cumming et al., Glycobiology 1, 115-30, 1991; Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14, 975-81, 1996). Las bacterias muy raramente glucosilan a las proteínas y al igual que otros tipos de hospedadores 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 mamífero, las que más se han utilizado durante las dos últimas décadas son las células de ovario de hámster chino (CHO). Además de dar 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 cría de hámster (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 et al., *Nature Biotechnol.* 14, 975-81, 1996).

5 Todos los anticuerpos contienen estructuras de hidrato de carbono en posiciones conservadas de las regiones constantes de cadena pesada, 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. Típicamente 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. et al., *Glycobiology* 5(8), 813-22, 1995).

15 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 Umaña, P. et al., *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. et al., *Glycobiology* 5, 813-822, 1995; Jefferis, R. et al., *Immunol. Rev.* 163, 59-76, 1998; Wright, A. y Morrison, S.L., *Trends Biotechnol.* 15, 26-32, 1997).

30 Se ha demostrado previamente que la sobreexpresión de la $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), 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 Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17, 176-180, 1999; y el documento WO 99/154342, cuyos contenidos se incorporan a la presente en su totalidad por referencia). 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 (Umaña, P. et al., *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.

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

50 Los "pacientes" o "sujetos" son cualquier mamífero que padezca las enfermedades o afecciones de acuerdo con la invención y son preferentemente seres humanos.

55 El término "cáncer que expresa CD20" tal como se emplea en el presente documento indica preferentemente los linfomas (preferentemente linfoma no de Hodgkin de células B (NHL)) y leucemias linfocíticas. Tales linfomas y leucemias linfocíticas incluyen por ejemplo, (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 del 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 y (j) la enfermedad de Hodgkin.

Preferentemente, el cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células B no de Hodgkin (NHL). En especial, el cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células del 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 pilosas, 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 usa en el presente documento “enfermedad autoinmune” indica una enfermedad o trastorno que surge de o que está dirigido contra los tejidos propios del individuo. Los ejemplos de enfermedades y trastornos autoinmunes incluyen, pero sin limitación: artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artrosis, artritis psoriática), psoriasis, dermatitis, polimiositis/dermatomiositis, necrólisis epidérmica tóxica, escleroderma sistémico y esclerosis, respuestas asociadas con la enfermedad del intestino inflamatorio, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del distrés respiratorio, síndrome del distrés respiratorio del adulto (ARDS), meningitis, encefalitis, uveítis, colitis, glomerulonefritis, estados patológicos alérgicos, eccema, asma, estados patológicos que implican la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmune, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus eritematoso sistémico (SLE), diabetes de inicio juvenil, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica, respuestas inmunes asociadas a una hipersensibilidad aguda o retardada mediadas por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis, incluida granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis (incluida ANCA), anemia aplásica, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica inmune, incluida la anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa, aplasia de glóbulos rojos pura (PRCA), deficiencia del factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapédesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central (SNC), síndrome de lesiones orgánicas múltiples, miastenia grave, enfermedades mediadas por complejos de antígeno-anticuerpo, enfermedades de membrana de base antiglomerular, síndrome de anticuerpo anti-fosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad de Bechet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjorgen, síndrome de Stevens Johnson, penfigoide vesicular, pénfigo, poliendocrinopatías autoinmunes, nefropatías, polineuropatías de IgM o neuropatía mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmune, enfermedad autoinmune de testículos y ovarios, incluidas orquitis y ooforitis autoinmunes, hipotiroidismo primario, enfermedades endocrinas autoinmunes, incluida la tiroiditis autoinmune, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes de endocrinopatía poliglandular I), diabetes de tipo I, también llamada diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM), síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmune, neumonitis intersticial linfoide (VIH), bronquiолitis obliterante (no trasplante) frente al NSIP, síndrome de Guillain-Barre, vasculitis de vasos grandes (incluida la polimialgia reumática y la arteritis de células gigantes (arteritis de Takayasu), vasculitis de vasos medios (incluida la enfermedad de Kawasaki y la poliarteritis nodosa), espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger (nefropatía de IgA), glomerulonefritis progresiva rápida, cirrosis biliar primaria, esprúe celiaco (enteropatía del gluten), crioglobulinemia, esclerosis lateral amitrófica (ALS), enfermedad de la arteria coronaria, etc.

Un “agente inhibidor del crecimiento” se emplea en el presente documento para indicar un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, en especial la célula cancerosa que expresa CD20, ya sea “*in vitro*”, ya sea “*in vivo*”. Por tanto, un agente inhibidor de crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células que expresan al CD20 en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), por ejemplo los agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen a las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de tipo II, como son la doxorubicina, la epirubicina, la daunorubicina, los etopósidos y la bleomicina. Estos agentes que interrumpen la G1 desbordan hacia la interrupción de la fase S, por ejemplo los agentes alquilantes del ADN, tales como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbazina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluoruracilo y el Ara-C. Más información se encontrará en “The Molecular Basis of Cancer”, Mendelsohn y Israel, coord., capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”, cuyos autores son Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), en especial la p. 13.

“Tratamiento” indica tanto el tratamiento terapéutico como las medidas profilácticas o preventivas. Las personas que necesitan tratamiento incluyen a aquellas que ya tienen la enfermedad, como aquellas, en las que conviene prevenir la enfermedad. Por tanto, el paciente a tratar en el presente documento es tanto la persona, a la que se ha diagnosticado que tiene la enfermedad, como la persona que está predispuesta o es susceptible de contraer la enfermedad.

El término “agente citotóxico” se emplea en el presente documento para indicar una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o provoca la destrucción de dichas células. El término incluye a los isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² y a los isótopos radiactivos del Lu), a los agentes quimioterapéuticos y a las toxinas, por ejemplo las toxinas de moléculas pequeñas o las toxinas activas enzimáticamente de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos los fragmentos y/o variantes de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen a los agentes alquilantes, por ejemplo la tiotepa y la ciclosfosfamida (CYTOXAN™); los sulfonatos de alquilo, por ejemplo el busulfan, improsulfan y piposulfan; las aziridinas, como son la benzodopa,

carboquona, meturedopa y uredopa; las etileniminas y metilmelaminas, incluidas la altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolmelamina; las acetogeninas (en especial la bullatacina y la bullatacinona); el delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARENOL™); la beta-lapachona; el lapachol; las colchicinas; el ácido betulínico; una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN™), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR™), la acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); la briostatina; la callistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); la podofilotoxina; el ácido podofilínico; los tenipósidos; las criptoficinas (en especial la criptoficina 1 y la criptoficina 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluidos sus análogos sintéticos, el KW-2189 y CBI-TMI); la eleuterobina; la pancratistatina; una sarcodictina; la espongistatina; las mostazas nitrogenadas, como el clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, mecloretamina-óxido clorhidrato, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfa[pil]nida, mostaza de uracilo; las nitrosureas como la carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranirmustina; los antibióticos del tipo enedina (por ejemplo, caliqueamicina, en especial la caliqueamicina-gamma 11 y caliqueamicina-omega 11 (véase, por ejemplo, Angew, Chemie Intl. Ed. Engl., 33, 183-186, 1994); dinemicina, incluida la dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y los cromóforos afines de antibióticos de la cromoproteína enedina), las aclacinomisinas, la actinomisina, la autramicina, la autramicina, las bleomicinas, la cactinornicina, la carabicina, la carminomicina, la carzinofilina, las cromomicinas, la dactinomicina, la daunorrubicina, la detorrubicina, la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorubicina (incluida la ADRIAMICINA™, la morfolino-doxorrubicina, la cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, la doxorubicina HCl liposoma inyectable (DOXIL™), la doxorubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET™), la doxorubicina liposómica pegilada (CAELYX™) y la desoxidoxorrubicina), la epirubicina, la esorrubicina, la idarrubicina, la marcelomicina, las mitomicinas como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la potfiromicina, la puromicina, la quelamicina, la rodorrubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la zinostatina, la zorrubicina; los anti-metabolitos, por ejemplo el metotrexato, la gemcitabina (GEMZAR™), el tegafur (UFTORAL™), la capecitabina (XELODA™), una epotilona y el 5-fluoruracilo (5-FU); los análogos de ácido fólico, por ejemplo la denopterina, el metotrexato, la pteropterina, el trimetrexato; los análogos de purina, como la fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; los análogos de pirimidina como la ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; los anti-adrenales como la aminoglucetimidina, mitotano, trilostano; los rellenos de ácido fólico, como el ácido frolínico; la aceglatona; los glucósidos de aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidainina; maitanosinoides, como la maitansina y las ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; la pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; el complejo de polisacárido PSKL™ (JHS Natural Products, Eugene, OR); el razoxano; la rizoxinz; el sizofiran; el espirogermaranio; el ácido tenuazónico; la triaziquona; la 2,2',2"-triclorotrietilamina; los tricotecenos (en especial la toxina T-2, la verracurina A, la roridina A y la anguidina); el uretano; la dacarbazina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromano; la gacitina; los arabinósidos ("Ara-C"); la tiotopa; los taxoides, por ejemplo, el paclitaxel (TAXOL™), la formulación de paclitaxel en nanopartículas de ingeniería de albúmina (ABRAXANE™) y el docetaxel (TAXOTERE™); el cloranbucilo; la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metotrexato; los agentes de platino como el cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; las vincas, que impiden que la polimerización de la tubulina pueda formar microtúbulos, incluidas la vinblastina (VELBAN™), vincristina (ONCOVINA™), vindesina (ELDISINA™, FILDESINA™) y vinorelbina (NAVELBINA™); los etopósidos (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la leucovovina; la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; la difluormetilornitina (DMFO); los retinoides, como el ácido retinoico, incluido el bezaroteno (TARGRETINA™); los bisfosfonatos por ejemplo el clodronato (por ejemplo, BONEFOS™ u OSTAC™), el etidronato (DIDROCAL™), NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA™), el alendronato (FOSAMAJX™), el pamidronato (ARELIA™), el tiludronato (SKELID™) o risedronato (ACTONEL™); la troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano-nucleósido de citosina); los oligonucleótidos antisentido, en especial los que inhiben la expresión de los genes en los mecanismos de señalización que intervienen en la proliferación celular aberrante, por ejemplo el PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); las vacunas, como la vacuna THERATOPE™ y las vacunas de terapia genética, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTINA™, la vacuna LEUVECTINA™ y la vacuna VAXID™; el inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN™); el rmRH (por ejemplo, ABARELIX™); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); la perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), el inhibidor de proteosoma (por ejemplo, PS341); el bortezomib (VELCADE™); CCI-779; el tipifarnib (RI 1577); orafenib, ABT510; el inhibidor de Bcl-2 como el oblimersen sódico (GENA SENSE™); el pixantrona; los inhibidores del EGFR (ver la definición que sigue); los inhibidores de tirosina-quinasa (ver la definición que sigue); y las sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores que sean farmacéuticamente aceptables; así como las combinaciones de dos o más de los anteriores, por ejemplo el CHOP, un abreviatura de la terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona (que opcionalmente puede incluir también interferón-A (CHVP/interferón-A); el FOLFOX, una abreviatura del regimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINA™) combinado con 5-FU y leucovovina; el CVP (ciclofosfamida, vincristina y prednisolona); el MCP (mitoxantrona, clorambucilo y prednisolona); el FC (fludarabina y ciclofosfamida); el ICE (ifosfamida, carboplatino y etopósido); y la dexametasona, citarabina y cisplatino (DHAP); la dexametasona, doxorubicina liposómica y vincristina (DVD); etc.

Un "agente antiangiogénico" indica un compuesto que bloquea o interfiere en algún grado el desarrollo de los vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico puede ser, por ejemplo una molécula pequeña o un anticuerpo que se una al factor de crecimiento o al receptor del factor de crecimiento que interviene en el fomento de la angiogénesis. El factor

antiangiogénico preferido es este contexto un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), por ejemplo el bevacizumab (AVASTINA™).

5 El término "citocina" es un término genérico de las proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra
 célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de tales citocinas son las linfocinas, las monocinas y las
 hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citocinas las hormonas del crecimiento, por ejemplo la
 hormona del crecimiento humano, la hormona de crecimiento humano N-metionilo y las hormonas de crecimiento
 10 bovino, las hormonas del paratiroides, la tiroxina, la insulina, la proinsulina, la relaxina; la prorrelaxina, las hormonas de
 glucoproteínas, por ejemplo las hormonas estimuladoras de foliculo (FSH), las hormonas estimuladoras del tiroides
 (TSH), las hormonas luteinizantes (LH), el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblastos, la
 prolactina, el lactógeno placentario, el factor de necrosis tumoral α y β , la sustancia inhibidora muleriana, los péptidos
 asociados con la gonadotropina murina, la inhibina; la activina, el factor de crecimiento endotelial vascular, la integrina,
 la trombopoyetina (TPO), los factores de crecimiento nervioso, por ejemplo el NGF- β , el factor de crecimiento
 15 plaquetario; los factores de crecimiento de transformación (TGFs), por ejemplo el TGF- α y el TGF- β , los factores de
 crecimiento I y II de tipo insulina, la eritropoyetina (EPO), los factores osteoinductivos; los interferones, por ejemplo el
 interferón α , β y γ , los factores estimuladores de formación de colonias (CSFs), por ejemplo el macrófago-CSF (M-
 CSF), el granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF) y el granulocito CSF (G-CSF), las interleucinas (ILs), por ejemplo el IL-
 1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, un factor de necrosis tumoral, por ejemplo el TNF-
 20 α o TNF- β y otros factores polipeptídicos, incluidos el LIF y un ligando de kit (KL). Tal como se usa en el presente
 documento el término citocina incluye a las proteínas de fuentes naturales o procedentes de cultivos celulares
 recombinantes y los equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencias naturales.

25 El término "cantidad eficaz" indica la cantidad que proporciona el efecto deseado. En el caso del ingrediente de una
 formulación, como pueda ser la enzima hialuronidasa de acuerdo con la presente invención, la cantidad eficaz es la
 cantidad necesaria para aumentar la dispersión y la absorción del anticuerpo anti-CD20 administrado
 simultáneamente, de tal manera que el anticuerpo anti-CD20 pueda actuar de modo terapéuticamente eficaz del modo
 antes descrito. En el caso de una sustancia farmacéutica, es la cantidad de ingrediente activo eficaz para tratar una
 enfermedad en el paciente. Si la enfermedad es un cáncer, la cantidad eficaz de fármaco puede reducir el número de
 30 células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, frenar en cierta medida y preferentemente detener) la
 infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos colindantes; inhibir (es decir, frenar en cierta medida y
 preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir en cierta medida el crecimiento del tumor; y/o aliviar en cierta
 medida uno o más síntomas asociados con el cáncer. En la medida en la que el fármaco puede impedir el crecimiento
 y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La cantidad eficaz puede prolongar la
 35 progresión de la supervivencia libre, traduciéndose en una respuesta objetiva (incluidas la respuesta parcial, PR y la
 respuesta completa, CR), prolongar el tiempo total de supervivencia y/o mejorar uno o más síntomas del cáncer.

40 El término "formulación farmacéutica" indica una preparación que se presenta en una forma tal que permite que sea
 eficaz la actividad biológica del ingrediente activo y que no contiene componentes adicionales que puedan ser tóxicos
 en grado inaceptable para el sujeto, al que se pretende administrar la formulación. Dichas formulaciones son estériles.

Una formulación "estéril" es aséptica o exenta de cualquier organismo vivo y de sus esporas.

45 Una formulación "aceptable" es aquella, en la que todas las proteínas que contiene conservan esencialmente su
 estabilidad física y/o su estabilidad química y/o su actividad biológica durante el almacenaje a la temperatura prevista
 para dicho almacenaje, por ejemplo, entre 2 y 8°C. Preferentemente, la formulación conserva esencialmente su
 estabilidad física y química así como su actividad biológica durante el almacenaje. El período de almacenaje se elige
 en general en base a la estabilidad al almacenaje que se pretende para dicha formulación. Además, la formulación es
 estable preferentemente después de congelar (por ejemplo, a -20°C) y descongelar la formulación, por ejemplo
 50 después de 1 o más ciclos de congelación y descongelación. En la técnica se dispone de varias técnicas analíticas
 para medir la estabilidad de las proteínas, que se han revisado por ejemplo en: Peptide and Protein Drug Delivery, pp.
 247-301, Vincent Lee, coord., editorial Marcel Dekker Inc., Nueva York, 1991 y en: Jones, A., Adv. Drug Delivery Rev.
 10, 29-90, 1993. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada para un período de tiempo
 seleccionado. La estabilidad puede evaluarse cualitativa y/o cuantitativamente de muy diversas maneras, incluida la
 55 evaluación de la formación de agregados (empleando por ejemplo la cromatografía de exclusión por tamaño, midiendo
 la turbidez y/o por inspección visual); la evaluación de la heterogeneidad de cargas empleando la cromatografía de
 intercambio catiónico o la electroforesis de zonas capilares; el análisis SDS-PAGE para comparar el anticuerpo
 reducido y el intacto; la evaluación de la actividad biológica o la función del anticuerpo de unión al antígeno; etc. La
 inestabilidad puede implicar uno o más hechos como los siguientes: agregación, desamidación (por ejemplo,
 60 desamidación de la Asn), oxidación (por ejemplo, oxidación de la Met), isomerización (por ejemplo, isomerización de la
 Asp), grapado/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo, fragmentación de la región bisagra), formación de succinimida,
 cisteína(s) desapareada(s), etc.

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos empleados de acuerdo con la presente invención se preparan para
 el almacenaje mezclando opcionalmente un anticuerpo que tenga el grado deseado de pureza con los vehículos,
 65 excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol,

A., coord., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los consumidores en las dosis y concentraciones empleadas.

El término “tensioactivo” se emplea en el presente documento 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 a los ésteres polietileno-sorbita-ácidos grasos (Tween), los polietileno-polipropileno-glicoles, los poli(óxido de etileno)-estearatos, los éteres de alquilo de poli(óxido de etileno), por ejemplo, los monolauril-éteres de poli(óxido de etileno), los éteres e alquilfenilpoli(óxido de etileno) (Triton X), los copolímeros de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (Poloxamer, Pluronic) y los dodecilsulfato sódicos (SDS). Los ésteres de poli(óxido de etileno)-sorbita-ácidos grasos más indicados son los polisorbatos 20 (suministrados con el nombre comercial de Tween™ 20) y los polisorbatos 80 (suministrados con el nombre comercial de Tween™ 80). Los copolímeros de polietileno-polipropileno más apropiados son los suministrados con los nombres de Pluronic® F68 o Poloxamer™ 188. Los polioxietileno-estearatos preferidos son los suministrados con el nombre comercial de Myrj™. Los éteres de alquilo de poli(óxido de etileno) más apropiados son los que suministran con el nombre de Brij™. Los éteres de alquilfenol-poli(óxido de etileno) más apropiados son los que suministran con el nombre comercial de Triton X.

El término “tampón” se emplea en el presente documento para indicar un tampón farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento la expresión “agente tampón que proporciona un pH de $5,5 \pm 2,0$ ” indica un agente que proporciona una solución que resiste los cambios de pH gracias a sus componentes conjugados ácido/base. Los tampones farmacéuticamente aceptables incluyen pero sin limitación: tampones de histidina, tampones citrato, tampones gluconato, tampones succinato, tampones acetato, tampones glicilglicina, otros tampones ácidos orgánicos y tampones fosfato. Los tampones preferidos contienen L-histidina o mezclas de L-histidina con clorhidrato de L-histidina con agentes isotónicos, potencialmente con ajuste del pH con un ácido o una base, ya conocidos en la técnica. El más preferido es el tampón de L-histidina.

Un “tampón de histidina” es un tampón que contiene el aminoácido histidina. Los ejemplos de tampones histidina incluyen el cloruro de histidina, el acetato de histidina, el fosfato de histidina, el sulfato de histidina. El tampón de histidina preferido a tenor de lo descrito en los ejemplos que siguen es el cloruro de histidina. En una realización preferida, el tampón cloruro de histidina se prepara valorando la L-histidina (base libre, sólido) con ácido clorhídrico diluido o disolviendo la L-histidina y el clorhidrato de L-histidina (por ejemplo, monohidratado) en una cantidad y proporción definidas.

Se entiende por “isotónico” que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán en general una osmolalidad de ~ 300 mOsm/kg. La isotonicidad puede medirse empleando un osmómetro de tipo de presión de vapor o de depresión de punto de congelación.

El término “agentes isotónicos” se emplea en el presente documento 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, por ejemplo, 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 sin limitación: 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 sacarosa, 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.

El término “líquido” empleado en el presente documento en relación con la formulación de acuerdo con la invención indica una formulación que es líquida a una temperatura al menos de 2 a 8°C .

El término “liofilizado” empleado en el presente documento en relación con la formulación de acuerdo con 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.

El término “sales” se emplea en el presente documento 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.

El término “aminoácido” se emplea en el presente documento 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.

Un “sacárido” abarca en el presente documento la composición general $(CH_2O)_n$ y sus derivados, incluidos los monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, alcoholes de azúcar, azúcares reductores, azúcares no reductores, etc. Los ejemplos de los sacáridos presentes incluyen glucosa, sacarosa, trehalosa, lactosa, fructosa, maltosa, dextrano, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, silitol, sorbitol, manitol, milibiosa, melecitosa, rafinosa, manotriosa, estaquiosa, maltosa, lactulosa, maltulosa, glucitol, maltitol, lactitol, isomaltulosa, etc. Se incluyen también dentro de la invención la glucosamina, N-metilglucosamina (también llamada “meglumina”), galactosamina y ácido neuramínico y las combinaciones de los sacáridos de acuerdo con la invención. Aquí, el sacárido preferido es un disacárido no reductor, por ejemplo la trehalosa o la sacarosa. El sacárido más preferido de acuerdo con la presente invención es la trehalosa.

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

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.

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.

El problema que se pretende solucionar con la presente invención consiste, pues, en desarrollar nuevas formulaciones farmacéuticas estables, muy concentradas, de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo o una mezcla de dichas moléculas de anticuerpo para inyección subcutánea. Dichas formulaciones, además de cantidades muy elevadas de anticuerpo anti-CD20 o mezclas de los mismos, contienen un agente tamponador, un estabilizante o una mezcla de dos o más estabilizantes, un tensioactivo no iónico y preferentemente una cantidad eficaz de al menos una enzima hialuronidasa. La preparación de formulaciones muy concentradas de anticuerpos es un gran reto porque se produce un aumento potencial de viscosidad cuando la concentración de proteínas es más elevada y un aumento potencial de la agregación de proteínas, un fenómeno que de por sí depende de la concentración. Las viscosidades elevadas inciden negativamente en la viabilidad del proceso (por ejemplo, los pasos de bombeo y de filtración) de las formulaciones de anticuerpos y de la administración (por ejemplo, aptitud para la administración con jeringuilla). Con la adición de los excipientes se logra en algunos casos disminuir las viscosidades elevadas. El control y el análisis de la agregación de proteínas es un reto cada vez mayor. La agregación puede presentarse potencialmente durante varios pasos del proceso de fabricación, que incluyen la fermentación, purificación, formulación y también durante el almacenaje. En el comportamiento de agregación de una proteína terapéutica pueden influir diferentes factores, por ejemplo la temperatura, la concentración de la proteína, el estrés causado por la agitación, la congelación y la descongelación, los efectos de los disolventes y tensioactivos y las modificaciones químicas. Durante el desarrollo de una formulación muy concentrada de anticuerpo, tiene que efectuarse un seguimiento y un control de la tendencia de la proteína a la agregación mediante la adición de diversos excipientes y tensioactivos [Kiese, S. et al., J. Pharm. Sci. 97(10), 4347-4366, 2008].

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica estable, muy concentrada, de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo o una mezcla de dichas moléculas de anticuerpo para la aplicación parenteral. Preferentemente, la vía de aplicación es la administración intravenosa en forma de bolo o de infusión continua durante un período de tiempo por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intra-articular, intrasinoval o intratecal. Es preferida la administración de los anticuerpos por vía intravenosa o subcutánea; es preferida en especial la inyección subcutánea. Tal como se ha descrito antes, no es fácil generar una formulación farmacéutica de un anticuerpo anti-CD20 estable, muy concentrada, que esté esencialmente libre de partículas. Si se pretende que dicha formulación se destine a la aplicación subcutánea, entonces, en una forma preferida de ejecución, dicha formulación se combina con una enzima hialuronidasa.

Más en concreto, la formulación farmacéutica estable, muy concentrada, de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo es una formulación de la presente invención que contiene:

- aproximadamente de 20 a 350 mg/ml de anticuerpo anti-CD20;
- aproximadamente de 1 a 100 mM de un agente tamponador que proporcione un pH de $5,5 \pm 2,0$;
- aproximadamente de 1 a 500 mM de un estabilizante o una mezcla de dos o más estabilizantes, en la que opcionalmente la metionina se emplea como estabilizante secundario, preferentemente con una concentración de 5 a 25 mM;

- del 0,01 al 0,1 % de un tensioactivo no iónico; y
- preferentemente una cantidad eficaz de al menos una enzima hialuronidasa.

5 La formulación farmacéutica estable, muy concentrada, de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo de la presente invención puede prepararse en forma líquida o puede prepararse en forma liofilizada. La concentración de anticuerpo dentro de la formulación reconstituida puede aumentarse por reconstitución de una formulación liofilizada para obtener una concentración de proteína dentro de la formulación reconstituida que se sitúa aproximadamente entre 2 y 40 veces mayor que la concentración de proteína en la mezcla antes del paso de la liofilización.

10 La concentración preferida de anticuerpo anti-CD20 se sitúa entre 50 y 150 mg/ml, la especialmente preferida entre 75 y 150 mg/ml, la incluso más preferida en 120 ± 20 mg/ml, la particularmente preferida en aproximadamente 120 mg/ml.

15 La concentración preferida del agente tampón se sitúa entre 1 y 50 mM, más preferentemente entre 10 y 30 mM; la concentración especialmente preferida es aproximadamente de 20 mM. Los expertos conocen varios agentes tampón de la técnica, ya descritos antes. El agente tampón preferido se elige entre el grupo formado por un tampón histidina, un tampón ácido acético y un tampón ácido cítrico, lo más preferentemente un tampón L-histidina/HCl. El tampón histidina de acuerdo con la invención se emplea en una cantidad aproximadamente de 1 mM a 50 mM, preferentemente de aproximadamente 10 mM a 30 mM y más preferentemente todavía de aproximadamente 20 mM. El tampón ácido acético de acuerdo con la invención es preferentemente de aproximadamente 10 mM a 30 mM y lo más preferentemente de aproximadamente 20 mM. El tampón ácido cítrico de acuerdo con la invención se sitúa preferentemente aproximadamente entre 10 mM y 30 mM y lo más preferentemente en aproximadamente 20 mM.

25 Con independencia del tampón utilizado, el pH se ajustará en un valor comprendido aproximadamente entre 4,5 y 7,0 y preferentemente aproximadamente entre 5,5 y 6,5, también preferentemente entre el grupo formado por 5,5, 6,0, 6,1 y 6,5. Este pH puede conseguirse ajustando con un ácido o con una base conocidos en la técnica o empleando mezclas adecuadas de componentes tampón o por ambos métodos.

30 El o los estabilizantes (que se emplean como sinónimos con el término "agente estabilizante" en la presente descripción de patente) se elige(n) preferentemente entre el grupo formado por una sal, un hidrato de carbono, un sacárido y aminoácidos(s), más preferentemente un hidrato de carbono o un sacárido, más preferentemente un azúcar admitido por las autoridades como aditivo o excipiente apropiado para formulaciones farmacéuticas, elegido lo más preferentemente entre el grupo formado por la α , α -trehalosa dihidratada, NaCl y metionina. La concentración preferida del estabilizante se sitúa entre 15 y 250 mM o más preferentemente entre 150 y 250 mM. Es especialmente preferida una concentración de aproximadamente 210 mM. La formulación puede contener un estabilizante secundario, en cuyo caso este estabilizante secundario será preferentemente la metionina, preferentemente con una concentración de 5 a 25 mM, más preferentemente con una concentración de 5 a 15 mM. La concentración especialmente preferida de la metionina es aproximadamente de 10 mM.

40 El tensioactivo no iónico es preferentemente un polisorbato, se elige más preferentemente entre el grupo formado por el polisorbato 20, polisorbato 80 y un copolímero de polietileno-polipropileno. La concentración del tensioactivo no iónico se sitúa entre el 0,01 y el 0,1 % (p/v) o entre el 0,02 y el 0,08 % (p/v) y preferentemente entre el 0,02 y el 0,06 % (p/v), lo más preferentemente en aproximadamente el 0,06 % (p/v).

45 El término "azúcar" se emplea en el presente documento para indicar un azúcar farmacéuticamente aceptable, empleado en una cantidad comprendida entre 25 mM y 500 mM. Preferentemente entre 100 y 300 mM. Con mayor preferencia entre 180 y 240 mM. Preferentemente en 210 mM.

50 La concentración de la enzima hialuronidasa dependerá de la enzima hialuronidasa concreta que se emplee para la preparación de la formulación de acuerdo con la invención. Los expertos podrán determinar fácilmente la cantidad eficaz de enzima hialuronidasa en base a las enseñanzas que se describen a continuación. Deberá proporcionarse en una cantidad suficiente, de modo que sea posible un aumento de la dispersión y absorción del anticuerpo anti-CD20 co-administrado. La cantidad eficaz de enzima hialuronidasa se sitúa preferentemente entre aproximadamente 1.000 y 16.000 U/ml, con lo cual dicha cantidad equivale aproximadamente a un valor entre 0,01 mg y 0,15 mg de proteína, en base a la actividad específica supuesta de 100.000 U/mg. La concentración preferida de la enzima hialuronidasa se sitúa aproximadamente entre 1.500 y 12.000 U/ml. Es especialmente preferida una concentración situada aproximadamente entre 2.000 U/ml y aproximadamente 12.000 U/ml. Las cantidades recién especificadas equivalen a la cantidad de enzima hialuronidasa añadida inicialmente a la formulación. La enzima hialuronidasa está presente en forma de formulación final combinada o para el uso en la co-administración, por ejemplo, en forma de co-formulación que se describe a continuación. El tema importante para la formulación reivindicada es que a la vez esté disponible para el uso y/o se inyecte en la forma de la composición reivindicada.

60 La enzima hialuronidasa puede derivarse de animales, muestras humanas o fabricarse en base a la tecnología de ADN recombinante del modo descrito a continuación.

65

Más particularmente, las formulaciones farmacéuticas estables muy concentradas de acuerdo con la presente invención tienen una de las composiciones siguientes:

a) de 100 a 150 mg/ml de anticuerpo anti-CD20, dicho anticuerpo es preferentemente rituximab, ocrelizumab el HuMab<CD20>; de 1 a 50 mM de un tampón histidina, preferentemente L-histidina / HCl, de pH aproximadamente 5,5; de 15 a 250 mM de un estabilizante, que es preferentemente α,α -trehalosa dihidratada y opcionalmente metionina como segundo estabilizante, con una concentración de 5 a 25 mM; un tensioactivo no iónico elegido entre el grupo del polisorbato 20 y polisorbato 80, preferentemente del 0,02 al 0,06 % (p/v) y opcionalmente de 1.000 a 16.000 U/ml de una enzima hialuronidasa, preferentemente la rHuPH20, lo más preferentemente con una concentración de 2.000 U/ml a 12.000 U/ml.

b) 120 ± 20 mg/ml de anticuerpo anti-CD20, este anticuerpo es preferentemente rituximab, ocrelizumab el HuMab<CD20>; de 10 a 30 mM, preferentemente 20 mM de un tampón histidina, preferentemente L-histidina / HCl de pH aproximadamente 5,5; de 150 a 250 mM, preferentemente 210 mM de un estabilizante que es preferentemente α,α -trehalosa dihidratada y opcionalmente metionina como segundo estabilizante, con una concentración de 5 a 25 mM, preferentemente de 5 a 15 mM, lo más preferentemente de 10 mM; un tensioactivo no iónico elegido entre el grupo del polisorbato 20 y el polisorbato 80, preferentemente del 0,02 al 0,06 % (p/v) y opcionalmente de 1.000 a 16.000 U/ml, preferentemente de 1.500 a 12.000 U/ml, lo más preferentemente de 2.000 U/ml a 12.000 U/ml de una enzima hialuronidasa, preferentemente la rHuPH20.

c) 120 mg/ml del anticuerpo anti-CD20, este anticuerpo es preferentemente rituximab, ocrelizumab el HuMab<CD20>; de 10 a 30 mM, preferentemente 20 mM de un tampón histidina, preferentemente L-histidina / HCl de un pH de aproximadamente 5,5; de 150 a 250 mM, preferentemente 210 mM de un estabilizante que es preferentemente α,α -trehalosa dihidratada y opcionalmente metionina como segundo estabilizante, con una concentración de 5 a 25 mM, preferentemente de 5 a 15 mM, lo más preferentemente 10 mM; un tensioactivo no iónico elegido entre el grupo del polisorbato 20 y el polisorbato 80, preferentemente del 0,02 al 0,06 % (p/v) y opcionalmente de 1.000 a 16.000 U/ml, preferentemente de 1.500 a 12.000 U/ml, lo más preferentemente de 2.000 U/ml a 12.000 U/ml de una enzima hialuronidasa, preferentemente la rHuPH20.

d) 120 mg/ml de anticuerpo anti-CD20, preferentemente rituximab; 20 mM de un tampón histidina, preferentemente L-histidina / HCl de pH aproximadamente 5,5; 210 mM de la α,α -trehalosa dihidratada y opcionalmente 10 mM de metionina como segundo estabilizante; un tensioactivo no iónico elegido entre el grupo del polisorbato 20 y el polisorbato 80, preferentemente del 0,02 al 0,06 % (p/v) y opcionalmente de 2.000 U/ml a 12.000 U/ml de una enzima hialuronidasa, preferentemente la rHuPH20.

e) una formulación liofilizada que contiene 120 mg/ml del anticuerpo anti-CD20, preferentemente rituximab; 20 mM de un tampón histidina, preferentemente la L-histidina/HCl de pH aproximadamente 5,5; 210 mM de α,α -trehalosa dihidratada y opcionalmente 10 mM de metionina como segundo estabilizante; un tensioactivo no iónico elegido entre el grupo del polisorbato 20 y el polisorbato 80, preferentemente del 0,02 al 0,06 % (p/v) y opcionalmente de 2.000 U/ml a 12.000 U/ml de una enzima hialuronidasa, preferentemente la rHuPH20.

Se proporciona una formulación farmacéutica estable de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo que contiene de aproximadamente 30 mg/ml a 350 mg/ml, por ejemplo de 30 mg/ml a 100 mg/ml (incluidos aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml o aproximadamente 100 mg/ml) de ocrelizumab (por ejemplo, el 2H7.v16 humanizado); de aproximadamente 1 a 100 mM de un agente tamponador (por ejemplo, acetato sódico) que ajuste el pH a $5,5 \pm 2,0$ (por ejemplo, pH 5,3); aproximadamente de 15 a 250 mM de un estabilizante o una mezcla de dos o más estabilizantes (incluida la trehalosa, por ejemplo, aproximadamente un 8 % de trehalosa dihidratada); aproximadamente del 0,01 al 0,1 % (p/v) de un tensioactivo no iónico; y opcionalmente una cantidad eficaz de al menos una enzima hialuronidasa (por ejemplo, la rHuPH20), preferentemente en una cantidad de aproximadamente 1.500/ml a aproximadamente 12.000 U/ml.

Las composiciones alternativas de formulaciones preferidas se describen en los ejemplos.

Se ha propuesto facilitar la inyección subcutánea de proteínas y anticuerpos terapéuticos empleando pequeñas cantidades de las glucoproteínas hialuronidasa solubles (sHASEGPs); véase WO 2006/091871. Se ha constatado que la adición de glucoproteínas hialuronidasa solubles (en forma de formulación combinada o por co-administración) facilita la administración del fármaco terapéutico a la hipodermis. Con despolimerización rápida del hialuronano HA en el espacio extracelular sHASEGP se reduce la viscosidad del intersticio, con lo cual aumenta la conductancia hidráulica y se consigue la administración de volúmenes mayores de forma segura y confortable al tejido subcutáneo. La mayor conductancia hidráulica inducida por la sHASEGP gracias a la viscosidad intersticial reducida permite una mayor dispersión, aumentando potencialmente la biodisponibilidad sistémica del fármaco terapéutico administrado por vía s.c.

Las formulaciones farmacéuticas estables muy concentradas de la presente invención que contienen una glucoproteína hialuronidasa soluble son, pues, especialmente indicadas para inyección subcutánea. Los expertos entenderán fácilmente que tal formulación, que contiene un anticuerpo anti-CD20 y una glucoproteína hialuronidasa soluble, puede proporcionarse para la administración en forma de formulación combinada única o como alternativa en

forma de dos formulaciones separadas que pueden mezclarse inmediatamente antes de la inyección subcutánea. Como alternativa, el anticuerpo anti-CD20 y la glucoproteína hialuronidasa soluble pueden administrarse en forma de inyecciones separadas en diferentes partes del cuerpo, preferentemente en zonas muy próximas entre sí. Es posible además inyectar los agentes terapéuticos presentes en la formulación de acuerdo con la presente invención en forma de inyecciones sucesivas, por ejemplo, en primer lugar la glucoproteína hialuronidasa soluble y después la inyección de la formulación del anticuerpo anti-CD20. Estas inyecciones pueden efectuarse también en orden inverso, a saber, en primer lugar la inyección de la formulación del anticuerpo anti-CD20 y después la inyección de la glucoproteína hialuronidasa soluble. En el caso de que el anticuerpo anti-CD20 y la glucoproteína hialuronidasa soluble se administren en forma de inyecciones separadas, una o ambas proteínas pueden aportarse con el agente tampón, el o los estabilizantes y el tensioactivo no iónico, en las concentraciones especificadas en las reivindicaciones que siguen, pero excluyendo la enzima hialuronidasa. La enzima hialuronidasa puede aportarse después, por ejemplo, en el tampón de L-histidina/HCl de pH aproximadamente 6,5, de 100 a 150 mM de NaCl y del 0,01 al 0,1 % (p/v) del polisorbato 20 o del polisorbato 80. En una realización preferida se aporta el anticuerpo anti-CD20 con el agente tampón, el o los estabilizantes y el tensioactivo no iónico, en las concentraciones especificadas en las reivindicaciones anexas.

Tal como se ha indicado antes, la glucoproteína hialuronidasa soluble puede considerarse como un excipiente más de la formulación del anticuerpo anti-CD20. La glucoproteína hialuronidasa soluble puede añadirse a la formulación del anti-CD20 durante la fabricación de la formulación del anti-CD20 o puede añadirse poco antes de la inyección. Como alternativa, la glucoproteína hialuronidasa soluble puede aportarse en forma de inyección separada. En este último caso, la glucoproteína hialuronidasa soluble puede aportarse en un vial separado, ya sea en forma liofilizada que tiene que reconstituirse con diluyente apropiados antes de que tenga lugar la inyección subcutánea, ya sea en forma de formulación líquida facilitada por el fabricante. La formulación del anti-CD20 y la glucoproteína hialuronidasa soluble puede aportarse en forma de entidades separadas o bien aportarse en forma de kits que contengan tanto los componentes inyectables como las instrucciones apropiadas para su administración subcutánea. Pueden aportarse también las instrucciones apropiadas para la reconstitución y/o administración de una o de ambas formulaciones.

Por consiguiente, la presente invención proporciona también composiciones farmacéuticas que contienen de una formulación farmacéutica estable, muy concentrada, de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo o una mezcla de dicho anticuerpo y una cantidad adecuada al menos de una enzima hialuronidasa en forma de kit que contienen tanto los componentes de la inyección como las instrucciones adecuadas para su administración subcutánea.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a dispositivo de inyección que contiene una formulación farmacéutica estable, muy concentrada, de acuerdo con la presente invención. Tal formulación puede constar de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo o una mezcla de dichas moléculas de anticuerpo y excipientes apropiados descritos a continuación y puede contener además una glucoproteína hialuronidasa soluble ya sea como formulación combinada, ya sea como formulación separada para la co-administración.

En la técnica anterior se conoce una gran variedad de anticuerpos anti-CD20. Dichos anticuerpos son preferentemente anticuerpos monoclonales. Pueden ser también anticuerpos llamados quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos totalmente humanos. Pueden ser anticuerpos anti-CD20 de longitud completa; fragmentos de anticuerpo anti-CD20 que tengan la misma actividad biológica; incluidas las variantes de secuencias de aminoácidos y / o variantes de glucosilación de dichos anticuerpos o fragmentos. Los ejemplos de anticuerpos anti-CD20 humanizados se conocen ya con los nombres INN de rituximab, ocrelizumab y afutuzumab (HuMab<CD20>). El anticuerpo anti-CD20 terapéutico de mayor éxito es rituximab suministrado por Genentech Inc. y F. Hoffmann-La Roche Ltd. con los nombres comerciales de MABTHERA™ o RITUXAN™.

El anticuerpo anti-CD20 en el presente documento definido se elige preferentemente entre el grupo del rituximab (véase por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 7.381.560 y la EP-2000149B1 de Anderson et al., véanse por ejemplo, las figuras 4 y 5), ocrelizumab (descrito en el documento WO 2004/056312) y WO 2006/084264 (por ejemplo, las variantes descritas en las tablas 1 y 2), preferentemente la variante v.16 o v.114 o v.511 y el afutuzumab (HuMab<CD20>; véase WO 2005/044859). El anticuerpo anti-CD20 más preferido es rituximab. Los términos "rituximab", "ocrelizumab" y "afutuzumab" (HuMab<CD20>) incluyen a todos los anticuerpos anti-CD20 correspondientes que cumplen los requisitos necesarios para obtener el permiso de comercialización en su calidad de producto idéntico o biosimilar en el país o territorio elegido entre el grupo de países formado por los Estados Unidos, Europa y Japón. El rituximab tiene las regiones CDR definidas en la Patente de Estados Unidos n.º 7.381.560 y en el documento EP-2000149B1.

En la técnica anterior se conoce ya un gran número de glucoproteínas hialuronidasas solubles. Con el fin de seguir definiendo el funcionamiento, el mecanismo de acción y las propiedades de tales glucoproteínas hialuronidasas solubles se aporta la siguiente información básica.

La matriz intersticial (hipodérmica) SC está formada por una red de proteínas fibrosas inmersas en un gel viscoelástico de glucosaminoglucanos. El hialuronano (HA), un disacárido lineal de unidades repetitivas no sulfatadas, es un glucosaminoglucano importante del tejido SC. Los fibroblastos secretan el HA al intersticio en forma de polímero

viscoso, de alto peso molecular de megadaltones, que después se degrada localmente, en la linfa y en el hígado, por acción de las hialuronidasas lisosómicas y de las exoglucosidasas. Aproximadamente el 50% del hialuronano del cuerpo se produce en el tejido SC, en el que se encuentra en aproximadamente 0,8 mg/g de peso de tejido húmedo [Aukland, K. y Reed, R., "Interstitial-Lymphatic Mechanisms in the control of Extracellular Fluid Volume", en: Physiology Reviews 73, 1-78, 1993]. Se estima que en promedio por 70 kg de persona adulta existen 15 gramos de HA, de los cuales el 30 por ciento se transforma cada día (se sintetiza y se degrada) [Laurent, L.B. et al., "Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver", Exp. Physiol. 76, 695-703, 1991]. Como principal constituyente del componente de tipo gel de la matriz hipodérmica, el HA contribuye significativamente a su viscosidad.

Los glucosaminoglucanos (GAGs) son polisacáridos lineales complejos de matriz extracelular (ECM). Los GAGs se caracterizan por estructuras disacárido repetitivas de una hexosamina N-sustituida y un ácido urónico (en el caso del hialuronano (HA), el sulfato de condroitina (CS), la condroitina (C), el sulfato de dermatano (DS), el sulfato de heparano (HS) y la heparina (H)) o la galactosa (en el caso del sulfato de queratano (KS)). Excepto para el HA, todos están unidos con enlace covalente a las proteínas del núcleo. Los GAGs y sus proteínas de núcleo guardan relación estructural con los proteoglicanos (PGs).

El hialuronano (HA) se ha encontrado en mamíferos, de modo predominante en los tejidos conjuntivos, la piel, los cartílagos y el líquido sinovial. El hialuronano es además el principal constituyente del humor vítreo del ojo. En el tejido conjuntivo, el agua de hidratación asociada con el hialuronano crea matrices hidratadas entre los tejidos. El hialuronano desempeña un papel clave en los fenómenos biológicos asociados con la movilidad celular, incluido el desarrollo rápido, la regeneración, la reparación, la embriogénesis, el desarrollo embriológico, la curación de las heridas, la angiogénesis y la tumorigénesis (Toole, Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (coord.), Plenum Press, Nueva York, 1991; pp. 1384-1386; Bertrand et al., Int. J. Cancer 52, 1-6, 1992; Knudson et al., FASEB J. 7, 1233-1241, 1993]. Además, los niveles de hialuronano guardan relación con la agresividad de los tumores [Ozello et al., Cancer Res. 20, 600-604, 1960; Takeuchi et al., Cancer Res. 36, 2133-2139, 1976; Kimata et al., Cancer Res. 43, 1347-1354, 1983].

Se ha encontrado el HA en la matriz extracelular de muchas células, en especial en tejidos conjuntivos blandos. Se ha asignado el HA para varias funciones fisiológicas, por ejemplo en la homeostasis de proteínas en agua y en plasma [Laurent, T.C. et al., FASEB J. 6, 2397-2404, 1992]. La producción de HA aumenta en las células proliferantes y puede desempeñar un papel en la mitosis. Se ha implicado también en la locomoción y la migración de las células. Parece que el HA desempeña un papel importante en la regulación, desarrollo y diferenciación celulares [Laurent et al., lugar citado].

El HA se ha empleado en muchas ocasiones en la medicina clínica. Sus propiedades protectoras de tejidos y reológicas han demostrado ser útiles para la cirugía oftálmica (por ejemplo, para proteger el endotelio de la córnea durante la cirugía de las cataratas). El HA en suero es un diagnóstico de la enfermedad hepática y de varios estados patológicos inflamatorios, por ejemplo la artritis reumatoide. El edema intersticial causado por acumulación del HA puede provocar la disfunción de varios órganos [Laurent et al., lugar citado].

Las interacciones de la proteína hialuronano intervienen también en la estructura de la matriz extracelular o "sustancia de base".

Las hialuronidasas son un grupo de enzimas generalmente activas en medio neutro o ácido, que se hallan en todo el reino animal. Las hialuronidasas varían en cuanto a especificidad de sustrato y mecanismo de acción (WO 2004/078140). Existen tres grupos generales de hialuronidasas:

1. las hialuronidasas de tipo mamífero, (EC 3.2.1.35) que son endo-beta-N-acetilhexosaminidasas con tetrasacáridos y hexasacáridos como productos finales principales. Tienen actividades tanto hidrolíticas como de transglucosidasa y pueden degradar al hialuronano y a los sulfatos de condroitina (CS), en general el C4-S y C6-S.
2. las hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.99.1) degradan al hialuronano en varios grados al CS y DS. Son endo-beta-N-acetilhexosaminidasas que operan mediante una reacción de beta-eliminación, que da lugar a productos finales primariamente disacáridos.
3. las hialuronidasas (EC 3.2.1.36) de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos son endo-beta-glucuronidasas que generan productos finales tetrasacáridos y hexasacáridos por hidrólisis del enlace 1-3-beta.

Las hialuronidasas de mamíferos pueden dividirse además en dos grupos: las enzimas activas en medio neutro y las enzimas activas en medio ácido. Existen seis genes de tipo hialuronidasa en el genoma humano: la HYALI, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALPI y PH20/SPAM1. La HYALPI es un pseudogén y la HYAL3 parece que no posee actividad enzimática con respecto a los sustratos conocidos. La HYAL4 es un condroitinasa y despliega poca actividad con respecto al hialuronano. La HYALI es el prototipo de enzima activa en medio ácido y la PH20 es el prototipo de enzima activa en medio neutro. Las hialuronidasas activas en medio ácido, por ejemplo la HYALI y la HYAL2 carecen en general de actividad catalítica en pH neutro (es decir, pH 7). Por ejemplo, la HYALI tiene poca actividad catalítica "in vitro" por encima de pH 4,5 [Frost, I.G. y Stern, R., "A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents", Anal. Biochemistry 251, 263-269, 1997]. La HYAL2 es una enzima activa en medio ácido, que tiene muy poca actividad específica "in vitro".

Las enzimas de tipo hialuronidasa pueden caracterizarse también como aquellas que generalmente están bloqueadas por la membrana del plasma con un anclaje glucosilfosfatidil-inositol, por ejemplo la HYAL2 humana y la PH20 humana [Danilkovitch-Miagkova et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(8), 4580-4585, 2003; Phelps et al., Science 240(4860), 1780-1782, 1988] y las que son generalmente solubles, por ejemplo la HYALI humana [Frost, I.G. et al., "Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase", Biochem. Biophys. Res. Commun. 236(1), 10-15, 1997]. Sin embargo existen variaciones de una especie a otra: la PH20 bovina por ejemplo es tiene una unión muy floja con la membrana plasmática y no está anclada mediante un anclaje sensible a fosfolipasa [Lalancette et al., Biol. Reprod. 65(2), 628-36, 2001]. Esta es la única característica de la hialuronidasa bovina que ha permitido el uso de la enzima hialuronidasa soluble de testículos bovinos como extracto para uso clínico (Wydase™, Hyalase™). Otras especies de PH20 son enzimas ancladas sobre lípidos, que por no general no son solubles, a menos que intervengan detergentes o lipasas. Por ejemplo, la PH20 humana está anclada a la membrana plasmática mediante un anclaje GPI. Los intentos de sintetizar constructos de PH20-ADN humanos que no introducirían un anclaje lípido en el polipéptido han conducido a una enzima catalíticamente inactiva o a una enzima insoluble [Arming et al., Eur. J. Biochem. 1; 247(3), 810-4, 1997]. La hialuronidasa de esperma de macaco de origen natural se ha encontrado tanto en forma soluble como en forma fijada sobre membrana. La forma fijada sobre membrana tiene 65 kDa y posee actividad enzimática a pH 7,0, mientras que la forma de 54 kDa solamente es activa a pH 4,0 [Cherr et al., Dev. Biol. 10; 175(1), 142-53, 1996]. Por lo tanto, las formas solubles de la PH20 a menudo carecen de actividad enzimática en condiciones neutras.

Tal como se ha indicado antes y con arreglo a las enseñanzas del documento WO 2006/091871 y de la Patente de Estados Unidos n.º 7.767.429 se pueden introducir pequeñas cantidades de glucoproteínas hialuronidasas solubles (sHASEGPs) en una formulación con el fin de facilitar la administración del fármaco terapéutico a la hipodermis. Con la HA que se despolimeriza rápidamente en el espacio extracelular sHASEGP se reduce la viscosidad del intersticio, con lo cual aumenta la conductancia hidráulica y se permite la administración de volúmenes grandes de modo seguro y confortable al tejido SC. La mayor conductancia hidráulica inducida por la sHASEGP gracias a la viscosidad intersticial reducida permite una mayor dispersión, aumentando potencialmente la biodisponibilidad sistémica del fármaco terapéutico administrado por vía s.c.

Cuando se inyecta a la hipodermis, la despolimerización de la HA por acción de la sHASEGP se localiza en el lugar de la inyección del tejido SC. La evidencia experimental pone de manifiesto que la sHASEGP se inactiva localmente en el espacio intersticial con una vida media de 13 a 20 minutos en los ratones, sin absorción sistémica detectable en la sangre después de una dosis intravenosa única a ratones CD-1. Dentro del compartimento vascular, la sHASEGP presenta una vida media de 2,3 a 5 minutos en ratones y en simios *Cynomolgus*, respectivamente, con dosis de hasta 0,5 mg/kg. La rápida eliminación de la sHASEGP, combinada con la síntesis continua del sustrato HA en el tejido SC, da lugar a un aumento de la permeabilidad transitoria y localmente activa para otras moléculas inyectadas simultáneamente, cuyos efectos son totalmente reversibles al cabo de 24 - 48 horas de la administración [Bywaters, G.L. et al., "Reconstitution of the dermal barrier to dye spread after Hyaluronidase injection", Br. Med. J. 2 (4741), 1178-1183, 1951].

Además de sus efectos en la dispersión local de líquidos, la sHASEGP actúa también como un intensificador de absorción. Las macromoléculas de tamaño mayor a 16 kilodaltones (kDa) quedan excluidas en su mayor parte de la absorción a través de los capilares por difusión y en su mayor parte se absorben por drenaje en los nódulos linfáticos. Una macromolécula administrada por vía subcutánea, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico (peso molecular aproximado: 150 kDa) tiene que atravesar por tanto la matriz intersticial antes de alcanzar los nódulos linfáticos de drenaje para la posterior absorción en el compartimento vascular. Aumentando la dispersión local, la sHASEGP aumenta la velocidad (K_a) de absorción de muchas macromoléculas. Esto conduce a mayores niveles pico en sangre (C_{max}) y potencialmente a una mayor biodisponibilidad con respecto a la administración SC en ausencia de la sHASEGP [Bookbinder, L.H. et al., "A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics", J. Control. Release 114, 230-241, 2006].

Los productos de hialuronidasa de origen animal se han utilizado clínicamente durante más de 60 años, primariamente para aumentar la dispersión y la absorción de otros fármacos administrados simultáneamente y para la hipodermoclastia (inyección/infusión SC de grandes volúmenes de líquidos) [Frost G.I., "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", Expert Opinion on Drug Delivery 4, 427-440, 2007]. Los detalles del mecanismo de acción de las hialuronidasas se han descrito extensamente en las publicaciones siguientes: Duran-Reynolds, F., "A spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action", C. R. Soc. Biol. Paris 69-81, 1938; Chain, E., "A mucolytic enzyme in testes extracts", Nature 977-978, 1939; Weissmann, B., "The transglycosylative action of testicular hyaluronidase", J. Biol. Chem. 216, 783-94, 1955; Tammi, R., Saamanen, A.M., Maibach, H.I., Tammi, M., "Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture", J. Invest. Dermatol. 97, 126-130, 1991; Laurent, U.B.G., Dahl, L.B., Reed, R.K., "Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver", Exp. Physiol. 76, 695-703, 1991; Laurent, T.C. y Fraser, J.R.E., "Degradation of Bioactive Substances: Physiology and Pathophysiology", Henriksen, J.H. (coord.), CRC Press, Boca Raton, FL; 1991, pp. 249-265; Harris, E.N. et al., "Endocytic function, glycosaminoglycan especificity, and antibody sensitivity of the recombinant human 190-kDa hyaluronan receptor for endocytosis (HARE)", J. Biol. Chem. 279, 36201-36209, 2004; Frost, G.I., "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", Expert Opinion on Drug Delivery 4, 427-440, 2007. Los productos de hialuronidasa aprobados en los países de la EU incluyen la

Hylase® “Dessau” y la Hyalase®. Los productos de hialuronidasa de origen animal aprobados en Estados Unidos incluyen la Vitrase™, Hydase™ y Amphadase™.

La seguridad y la eficacia de los productos de hialuronidasa se han aceptado en gran manera. El principal riesgo para la seguridad que se ha identificado es la hipersensibilidad y/o la generación de alergia, que se cree guardan relación con la falta de pureza de los preparados de origen animal [Frost, G.I., “Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration”, Expert Opinion on Drug Delivery 4, 427-440, 2007]. Nótese que hay diferencias con respecto a las dosis aprobadas de hialuronidasas de origen animal entre GB, Alemania y Estados Unidos. En GB, la dosis habitual en un adyuvante para inyección subcutánea o intramuscular es de 1500 unidades, que se añaden directamente al inyectable. En Estados Unidos, la dosis habitual empleada para este fin es de 150 unidades. En la hipodermocclisis, la hialuronidasa se emplea para facilitar la administración subcutánea de volúmenes de líquidos relativamente grandes. En GB, se administran en general 1500 unidades de hialuronidasa por cada 500 - 1000 ml de líquido para la aplicación subcutánea. En Estados Unidos se considera que 150 unidades son adecuadas para cada litro de solución de hipodermocclisis. En Alemania se considera que 150 - 300 unidades son adecuadas para este fin. En GB, la difusión de anestésicos locales se acelera con la adición de 1500 unidades. En Alemania y en Estados Unidos se considera que 150 unidades son adecuadas para este fin. Aparte de las diferencias de dosificación (la dosis en GB es diez veces superior a la de Estados Unidos), no se han publicado diferencias aparentes en los perfiles de seguridad de los productos de hialuronidasa de origen animal comercializados en Estados Unidos y GB, respectivamente.

El día 2 de diciembre de 2005, la empresa Halozyme Therapeutics Inc. consiguió el registro sanitario de la FDA para una formulación inyectable de hialuronidasa humana recombinante, la rHuPH20 (HYLENEX™). La FDA ha concedido el registro sanitario al HYLENEX™ en una dosis de 150 unidades para la administración SC en las indicaciones siguientes:

- como adyuvante para aumentar la absorción y la dispersión de otros fármacos inyectados
- para la hipodermocclisis
- como adjunto para la urografía SC para mejorar la resorción de los agentes radiopacos (impermeables a la radiación).

Como parte de la revisión reguladora se ha establecido que la rHuPH20 posee las mismas propiedades de intensificación de la dispersión y de la absorción de otros fármacos inyectados que las preparaciones de hialuronidasa de origen animal aprobadas previamente, pero con un mejor perfil de seguridad. En particular, en el caso de la hialuronidasa recombinante humana (rHuPH20) comparada con las hialuronidasas de origen animal se minimiza el riesgo potencial de contaminación con los agentes patológicos del animal y con las encefalopatías espongiiformes transmisibles.

Las glucoproteínas hialuronidasas solubles (sHASEGP), un proceso de obtención de las mismas y su utilización en composiciones farmacéuticas se han descrito en el documento WO 2004/078140.

El trabajo experimental detallado se describe a continuación y pone de manifiesto que la formulación reivindicada tiene de modo sorprendente una estabilidad al almacenaje favorable y cumple todos los requisitos necesarios para la aprobación por parte de las autoridades sanitarias.

Se cree que la enzima hialuronidasa de la formulación de acuerdo con la presente invención intensifica la entrega del anticuerpo anti-CD20 a la circulación sistémica, por ejemplo, aumentando la absorción de la sustancia activa (actúa como intensificador de permeabilidad). Se cree además que la enzima hialuronidasa aumenta también el aporte de anticuerpo anti-CD20 terapéutico a la circulación sistémica mediante la aplicación subcutánea por una hidrólisis reversible del hialuronano, un componente extracelular del tejido intersticial SC. La hidrólisis del hialuronano en la hipodermis abre temporalmente canales del espacio intersticial del tejido SC y, de este modo, mejora el aporte del anticuerpo anti-CD20 terapéutico a la circulación sistémica. Además, la administración provoca menos dolor en los humanos y menos hinchamiento del tejido SC derivado del volumen.

La hialuronidasa, si se administra localmente, tiene todo su efecto local. En otras palabras, la hialuronidasa se inactiva y se metaboliza localmente en minutos y no se ha publicado que tenga efectos sistémicos ni a largo plazo. La rápida inactivación de hialuronidasa en minutos, cuando entra en el caudal circulatorio, impide la capacidad realista de realizar estudios de biodistribución comparables entre los diferentes productos de hialuronidasa. Esta propiedad minimiza también cualquier tema potencial de seguridad sistémica, porque el producto de hialuronidasa no puede actuar en zonas distantes.

La característica común a todas las enzimas hialuronidasas de acuerdo con la presente invención es su capacidad de despolimerizar al hialuronano, con independencia de las diferencias en su estructura química, en fuentes de especie, en fuentes de tejido o en los lotes de producto farmacológico procedente de la misma especie y tejido. Son poco usuales por el hecho de que su actividad es la misma (excepto en potencia), a pesar de tener estructuras diferentes.

La enzima hialuronidasa según la formulación de la presente invención se caracteriza por no tener efectos adversos en la integridad molecular del anticuerpo anti-CD20 en la formulación farmacéutica estable en el presente documento descrita. Además, la enzima hialuronidasa modifica simplemente la aportación del anticuerpo anti-CD20 a la circulación sistémica, pero no posee otras propiedades que pudieran proporcionar o contribuir a los efectos terapéuticos del anticuerpo anti-CD20 absorbido sistémicamente. La enzima hialuronidasa no está biodisponible sistémicamente y no afecta negativamente a la integridad molecular del anticuerpo anti-CD20 en las condiciones de almacenaje recomendadas de la formulación farmacéutica estable de acuerdo con la invención. Debe considerarse, por tanto, como un excipiente de la formulación del anticuerpo anti-CD20 según esta invención. Cuando despliega su efecto terapéutico, representa un constituyente de la forma farmacéutica separada del anticuerpo anti-CD20 terapéuticamente activo.

En la técnica anterior se conoce ya un gran número de enzimas hialuronidasas apropiadas para la presente invención. La enzima preferida es una enzima hialuronidasa humana, lo más preferentemente la enzima conocida como la rHuPH20. La rHuPH20 forma parte del grupo de las β -1,4-glucosil-hidrolasas activas en medio neutro y ácido, que despolimerizan al hialuronano por hidrólisis del enlace β -1,4 entre la posición C₁ de la N-acetil-glucosamina y la posición C₄ del ácido glucurónico. El hialuronano es un polisacárido que se ha encontrado en la sustancia base intracelular del tejido conjuntivo, por ejemplo del tejido intersticial subcutáneo y de ciertos tejidos especializados, tales como el cordón umbilical y el humor vítreo. La hidrólisis del hialuronano disminuye temporalmente la viscosidad del tejido intersticial y fomenta la dispersión de los líquidos inyectados o de los trasudados o exudados localizados, facilitando de este modo su absorción. Los efectos de la hialuronidasa son locales y reversibles con la reconstitución completa del hialuronano del tejido, que tiene lugar en un período de 24 a 48 horas [Frost, G.I., "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", Expert Opinion on Drug Delivery 4, 427-440, 2007]. El aumento de la permeabilidad del tejido conjuntivo por la hidrólisis del hialuronano guarda relación con la eficacia de la hialuronidasa para su aptitud para aumentar la dispersión y la absorción de las moléculas administradas simultáneamente.

El genoma humano contiene diversos genes de hialuronidasa. Solamente el producto genético de la PH20 posee actividad eficaz de hialuronidasa en las condiciones extracelulares fisiológicas y actúa como agente de dispersión, mientras que las hialuronidasas que son activas en medio ácido no poseen esta propiedad.

La rHuPH20 es la primera enzima hialuronidasa humana y la única recombinante que actualmente está disponible para el uso terapéutico. El genoma humano contiene diversos genes de hialuronidasa; solamente el producto genético de la PH20 posee actividad eficaz de hialuronidasa en condiciones fisiológicas extracelulares y actúa como agente de dispersión. La proteína PH20 de origen natural tiene un anclaje lípido unido a los aminoácidos del extremo carboxi, que la une a la membrana plasmática. La enzima rHuPH20 desarrollada por Halozyme es una variante de eliminación truncada, que carece de tales aminoácidos en el extremo carboxi, que son los que dan lugar al anclaje sobre el lípido. Esto produce una enzima soluble, activa a pH neutro, similar a la proteína que se encuentra en los preparados de testículos bovinos. La proteína rHuPH20 se sintetiza con un péptido de señal de 35 aminoácidos, que se elimina del extremo N durante el proceso de secreción. La proteína rHuPH20 madura contiene una secuencia ortóloga auténtica en el extremo N, que se ha encontrado en los preparados de hialuronidasa bovina.

Las hialuronidasas PH20, incluidas la PH20 derivada de animales y la rHuPH20 humana recombinante, despolimerizan el hialuronano por hidrólisis del enlace β -1,4 entre la posición C₁ de la N-acetil-glucosamina y la posición C₄ del ácido glucurónico. El tetrasacárido es el producto de digestión más pequeño [Weissmann, B., "The transglycosylative action of testicular hyaluronidase", J. Biol. Chem. 216, 783-94, 1955]. Esta estructura de N-acetil-glucosamina/ácido glucurónico no se encuentra en los glucanos fijados sobre N de los productos biológicos recombinantes y, por ello, la rHuPH20 no afectará la glucosilación de anticuerpos, en los que está formulada, por ejemplo, rituximab. La misma enzima rHuPH20 posee seis glucanos fijados sobre N por molécula, con estructuras de núcleo similares a las encontradas en los anticuerpos monoclonales. Tal como se ha anticipado, estas estructuras fijadas sobre N no cambian con el tiempo, lo cual confirma la falta de actividad enzimática de la rHuPH20 de estas estructuras glucano fijadas sobre N. El corto período de vida media de la rHuPH20 y la síntesis constante de hialuronano conducen a una acción corta y localizada de la enzima en los tejidos.

La enzima hialuronidasa, que es un excipiente de la formulación subcutánea de acuerdo con la presente invención, se obtiene preferentemente por la tecnología de ADN recombinante. De este modo se asegura que se obtendrá siempre la misma proteína (secuencia idéntica de aminoácidos) y que se evitarán las reacciones alérgicas causadas por las proteínas contaminantes purificadas simultáneamente durante la extracción de un tejido. La enzima hialuronidasa empleada en la formulación de acuerdo con la presente invención es preferentemente una enzima humana, lo más preferentemente la rHuPH20.

La secuencia de aminoácidos de la rHuPH20 (HYLENEX™) es bien conocida y está disponible con el nº de registro CAS 75971-58-7. Su peso molecular aproximado es de 61 kDa (véase también la Patente de Estados Unidos n.º 7.767.429).

Se han realizado múltiples comparaciones estructurales y funcionales entre la hialuronidasa de mamíferos de fuentes naturales y los clones de ADNc de la PH-20 de humanos y de otros mamíferos. El gen de la PH-20 es el gen empleado

para el producto recombinante rHuPH20; sin embargo, el producto farmacológico recombinante es una versión truncada de 447 aminoácidos de la proteína completa codificada por el gen de la PH-20. Las semejanzas estructurales con respecto a las secuencias de aminoácidos raramente superan el 60% en ninguna comparación. Las comparaciones funcionales indican que la actividad de la rHuPH20 es muy similar a la de los productos de hialuronidasa aprobados anteriormente. Esta información es consistente con los hallazgos clínicos durante los últimos 50 años, de que independientemente de la fuente de la hialuronidasa, la seguridad y la eficacia clínicas de las unidades de hialuronidasa son equivalentes.

El uso de la rHuPH20 en la formulación del anticuerpo anti-CD20 SC de acuerdo con la presente invención permite la administración de grandes volúmenes de producto farmacológico e intensificar potencialmente la absorción del anticuerpo anti-CD20 administrado por vía subcutánea, preferentemente rituximab, a la circulación sistémica.

La osmolalidad de la formulación farmacéutica estable de acuerdo con la invención es de 350 ± 50 mOsm/kg.

La formulación farmacéutica estable de acuerdo con la invención está esencialmente libre de partículas visibles (inspección visual). Las partículas subvisibles (medidas por oscurecimiento luminoso) deberían cumplir preferentemente los criterios siguientes:

- número máximo de partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ por vial $\rightarrow 6000$
- número máximo de partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ por vial $\rightarrow 600$

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una formulación para la preparación de un medicamento útil para tratar una enfermedad o trastorno que pueda corregirse con el tratamiento con un anticuerpo anti-CD20, preferentemente un cáncer o una enfermedad no maligna, en un sujeto, que consiste en administrar la formulación en el presente documento descrita a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar dicha enfermedad o trastorno. Preferentemente, el anticuerpo anti-CD20 se administra simultáneamente, de modo concomitante o sucesivo, con un agente quimioterapéutico.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno, que puede corregirse con el tratamiento de un anticuerpo anti-CD20 (por ejemplo, un cáncer (preferido) o una enfermedad no maligna) en un sujeto, que consiste en administrar la formulación en el presente documento descrita a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar dicha enfermedad o trastorno. El cáncer o la enfermedad no maligna implica en general células que expresan la CD20, por ejemplo el anticuerpo anti-CD20, en la formulación terapéutico-farmacéutica SC de acuerdo con la presente invención que es capaz de fijarse sobre las células afectadas. El cáncer es preferentemente un cáncer que expresa CD20. La enfermedad no maligna que puede tratarse con la composición de acuerdo con la presente invención es preferentemente una enfermedad autoinmune en el presente documento definida. Preferentemente, el anticuerpo anti-CD20 se administra simultáneamente, de modo concomitante o sucesivo, con un agente quimioterapéutico.

La adición de la hialuronidasa a la formulación permite aumentar el volumen inyectado, que puede administrarse de modo seguro y confortable por vía subcutánea. El volumen de inyección preferido se sitúa entre 1 y 15 ml. Se ha observado que la administración de la formulación de acuerdo con la presente invención aumenta la dispersión, la absorción y la biodisponibilidad del anticuerpo terapéutico. Las moléculas grandes (es decir, > 16 kDa) que se administran por vía SC, se absorben preferentemente en el compartimento vascular a través de los líquidos linfáticos de drenaje [Supersaxo, A. et al., "Effect of Molecular Weight on the Lymphatic Absorption of Water-Soluble Compounds Following Subcutaneous Administration" 2, 167-169, 1990; Swartz, M.A., "Advanced Drug Delivery Review, The physiology of the lymphatic system" 50, 3-20, 2001]. La velocidad de introducción de estas moléculas grandes en la circulación sistémica se frena de este modo con respecto a la infusión intravenosa, por ello da lugar potencialmente a reacciones de frecuencia/intensidad de infusión reducidas.

Para la producción de la formulación subcutánea del anticuerpo anti-CD20 (preferentemente rituximab) de acuerdo con la invención se requieren concentraciones elevadas de anticuerpo (aproximadamente 120 mg/ml) en el paso final de purificación del proceso de fabricación. Por ello se añade un paso adicional de proceso (ultrafiltración/diafiltración) al proceso convencional de fabricación del anticuerpo anti-CD20, preferentemente rituximab. La formulación farmacéutica estable y muy concentrada del anticuerpo anti-CD20 de acuerdo con la invención puede proporcionar también una formulación estabilizada de proteínas, que puede reconstituirse con un diluyente adecuado para generar una formulación reconstituida de anticuerpo anti-CD20 de concentración elevada.

La formulación SC del anticuerpo anti-CD20 según esta invención se emplea preferentemente para tratar el cáncer, preferentemente un cáncer que exprese la CD20.

El término "aproximadamente" se emplea en la presente descripción de patente para indicar que el valor específico nombrado puede variar dentro de cierta medida, por ejemplo, indica que se incluyen en el valor nombrado las variaciones comprendidas dentro del intervalo ± 10 %, preferentemente ± 5 %, lo más preferentemente ± 2 %.

Aparte de los ensayos anteriores, los expertos disponen de varios ensayos “*in vivo*”. Por ejemplo, se pueden exponer las células del cuerpo del paciente a un anticuerpo que esté opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo y fijar el anticuerpo sobre las células del paciente de modo que se puedan evaluar, por ejemplo, por escaneo externo de la radiactividad o por análisis de la biopsia tomada del paciente que se ha expuesto previamente al anticuerpo.

Se contempla que la formulación SC de anticuerpo anti-CD20 según esta invención pueda utilizarse también para tratar varias enfermedades y trastornos no malignos, que incluyen por ejemplo las enfermedades autoinmunes en el presente documento definidas; la endometriosis; el escleroderma; la restenosis; los pólipos, por ejemplo los pólipos de colon, los pólipos nasales o los pólipos gastrointestinales; el fibroadenoma; las enfermedades respiratorias; la colecistitis; la neurofibromatosis; la enfermedad renal poliquística; las enfermedades inflamatorias; los trastornos cutáneos, incluida la psoriasis y la dermatitis; las enfermedades vasculares; los estados patológicos que conllevan una proliferación anormal de las células epiteliales vasculares; las úlceras gastrointestinales; la enfermedad de Menetrier, los adenomas secretores o el síndrome de pérdida de proteínas; los trastornos renales; los trastornos angiogénicos; las enfermedades oculares, por ejemplo la degeneración macular debida a la edad, el síndrome de histoplasmosis ocular presumido, la neovascularización de la retina por retinopatía diabética proliferativa, la vascularización de la retina, la retinopatía diabética o la degeneración macular debida a la edad; las patologías óseas, como son la artrosis, las ricketsias y la osteoporosis; los daños posteriores a un episodio isquémico cerebral; las enfermedades fibróticas y edémicas, por ejemplo la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar, la carcoidosis, la troiditis, el síndrome de hiperviscosidad sistémica, la enfermedad de Osier Weber-Rendu, la enfermedad pulmonar oclusiva crónica o los edemas posteriores a quemaduras, traumas, radiación, apoplejía, hipoxia e isquemia; la reacción de hipersensibilidad de la piel; la retinopatía diabética y la nefropatía diabética; el síndrome de Guillain-Barre; la enfermedad de injerto contra hospedador o rechazo del trasplante; la enfermedad de Paget; la inflamación ósea o articular; el envejecimiento por exposición al sol (causado por ejemplo, por radiación UV sobre la piel humana); la hipertrofia benigna de próstata; ciertas infecciones microbianas, incluidos los patógenos microbianos elegidos entre los adenovirus, hantaviruses, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia* spp. y *Bordetella pertussis*; las trombosis causadas por agregación de plaquetas; los estados patológicos reproductivos, por ejemplo la endometriosis, el síndrome de hiperestimulación de ovarios, la preeclampsia, la hemorragia uterina disfuncional o la menometrorragia; la sinovitis; el ateroma; las nefropatías agudas y crónicas (incluidas la glomerulonefritis proliferativa y la enfermedad renal inducida por la diabetes); el eccema; la formación de cicatrices hipertróficas; el choque endotóxico y la infección fúngica; la poliposis adenomatosa familiar; las enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la demencia derivada del SIDA, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la retinitis pigmentosa, la atrofia muscular espinal y la degeneración cerebelar); los síndromes mielodisplásicos; la anemia aplásica; la lesión isquémica; la fibrosis del pulmón, del riñón o del hígado; la enfermedad de hipersensibilidad mediada por células T; la estenosis pilórica hipertrófica infantil; el síndrome obstructivo urinario; la artritis psoriática; y la tiroiditis de Hasimoto. Las indicaciones no malignas preferidas para la terapia son las en el presente documento mencionadas.

Cuando la indicación es el cáncer, el paciente puede tratarse con una combinación de la formulación del anticuerpo y un agente quimioterapéutico. La administración combinada incluye la administración simultánea o concurrente empleando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica y la administración sucesiva en cualquier orden, preferentemente habrá un tiempo en el que ambos (o todos) los ingredientes activos ejercen sus actividades biológicas de modo simultáneo. Por lo tanto, el agente quimioterapéutico puede administrarse antes o después de la administración de la formulación del anticuerpo de acuerdo con la presente invención. En esta realización, el lapso de tiempo entre al menos una administración del agente quimioterapéutico y al menos una administración de la formulación del anticuerpo de acuerdo con la presente invención se elige preferentemente aproximadamente de 1 mes o menos y lo más preferentemente de 2 semanas o menos. Como alternativa, el agente quimioterapéutico y la formulación de anticuerpo de acuerdo con la presente invención se administran de modo concurrente al paciente, en una sola formulación o en formulaciones separadas.

El tratamiento con dicha formulación de anticuerpo producirá una mejora de los signos o síntomas del cáncer o de la enfermedad. Por ejemplo, cuando la enfermedad a tratar es un cáncer, dicha terapia puede producir una mejora de la supervivencia (supervivencia total y/o progreso de la supervivencia libre) y/o puede producir una respuesta clínica objetiva (parcial o completa). Además, el tratamiento con la combinación del agente quimioterapéutico y la formulación de anticuerpo puede producir un beneficio terapéutico sinérgico o superior al aditivo en el paciente.

Preferentemente, el anticuerpo en la formulación administrada es un anticuerpo tal cual. Sin embargo, el anticuerpo administrado puede combinarse con un agente citotóxico. Preferentemente, el inmunoc conjugado y/o el antígeno al que está unido está/están internalizados en la célula, obteniéndose una eficacia terapéutica mayor del inmunoc conjugado en el exterminio de las células cancerosas, sobre las que se fija. En una realización preferida, el agente citotóxico se dirige contra o interfiere en el ácido nucleico de la célula cancerosa. Los ejemplos de estos agentes citotóxicos incluyen a los maitanosinoides, las calioheamicinas, las ribonucleasas y las endonucleasas de ADN. Los inmunoc conjugados preferidos son los inmunoc conjugados de rituximab-maitanosinoide similares al trastuzumab-DM1 (T-DM1) descritos en el documento WO 2003/037992, más preferentemente el inmunoc conjugado T-MCC-DM1.

Para la aplicación subcutánea, la formulación puede administrarse con un dispositivo apropiado, por ejemplo una jeringuilla (pero sin limitarse a ella); una dispositivo de inyección (por ejemplo, el dispositivo INJECT-EASE™ y

GENJECT™); una bomba de infusión (por ejemplo, Accu-Chek™); una pluma inyectora (por ejemplo la GENPEN™; un dispositivo sin jeringuilla (por ejemplo, MEDDECTOR™ y BIOJECTOR™); o mediante un sistema de administración de parche subcutáneo.

5 La cantidad a administrar de dicha formulación de anticuerpo anti-CD20 para la prevención o el tratamiento de una enfermedad y el régimen de administración dependerán del tipo (especie, género, edad, peso, etc.) y del estado general de salud del paciente a tratar y de la severidad de la enfermedad o estado patológico a tratar. Es también importante en el momento de determinar correctamente la dosis el curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y su respuesta al anticuerpo. La determinación definitiva de la dosis dependerá del criterio del médico que atiende al paciente. El anticuerpo se administra de modo conveniente al paciente de una vez o en una serie de tratamientos. En función del tipo y severidad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de dicho anticuerpo anti-CD20 es una dosis inicial a probar para la administración al paciente.

15 La dosis preferida de dicho anticuerpo anti-CD20 se situará en el intervalo comprendido entre aproximadamente 0,05 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal. Por lo tanto, se podrá administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). En función del tipo (especie, género, edad, peso, etc.) y estado general de salud del paciente y del tipo de anticuerpo anti-CD20, la dosis del primer anticuerpo puede diferir de la del segundo anticuerpo anti-CD20. Tales dosis pueden administrarse una vez al día o bien de modo intermitente, por ejemplo, cada tres días, cada seis días o incluso cada semana o cada tres semanas. Puede administrarse una dosis inicial mayor de carga y después una o más dosis menores. Basándose en los estudios clínicos (ver también los ejemplos 3 y 4 de ilustración no limitante del rituximab), la dosis preferida se sitúa entre 300 mg/m² y 900 mg/m². Con mayor preferencia, la dosis preferida del anticuerpo anti-CD20 se sitúa entre unos 375 mg/m² y unos 800 mg/m². Las dosis específicas preferidas de dicho anticuerpo anti-CD20 son dosis de aproximadamente 375 mg/m², aproximadamente 625 mg/m² y aproximadamente 800 mg/m². Son también preferidas las dosis fijas de dicho anticuerpo anti-CD20.

30 En una realización, las dosis fijas para el caso de linfomas de células B, preferentemente el linfoma no de Hodgkin, son las siguientes. Son preferidos de aproximadamente 1200 mg a 1800 mg de dicho anticuerpo anti-CD20 por dosis. Son más preferidas las dosis elegidas entre el grupo formado por aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1600 mg y aproximadamente 1700 mg de dicho anticuerpo anti-CD20 por dosis. Es especialmente preferida una dosis fija para el caso de pacientes de linfoma de células B, preferentemente pacientes de linfoma no de Hodgkin, situada en torno a 1400 mg de dicho anticuerpo anti-CD20 (por ejemplo, rituximab) por dosis, que puede administrarse con arreglo a diversos regímenes, incluido aproximadamente cada 2 meses (incluidas aproximadamente cada 8 semanas), aproximadamente cada 3 meses (incluidas aproximadamente cada 12 semanas), durante unos 2 años (o más), etc. (véase también los ejemplos 3 y 4 para la ejemplificación no limitante del rituximab).

40 En otra realización, las dosis fijas para los pacientes de leucemia, preferentemente los pacientes de leucemia linfocítica crónica (CLL), son las siguientes. Son preferidos de unos 1600 mg a unos 2200 mg de dicho anticuerpo anti-CD20 por dosis. Son más preferidas las dosis elegidas entre el grupo formado por unos 1700 mg, unos 1800 mg, unos 1900 mg y unos 2100 mg de dicho anticuerpo anti-CD20 por dosis. En una realización, la dosis fija para los pacientes de leucemia, preferentemente los pacientes de CLL, se sitúa en unos 1870 mg de dicho anticuerpo anti-CD20 (por ejemplo, rituximab) por dosis.

45 En otra realización adicional, las dosis fijas para pacientes que sufren una enfermedad autoinmune, por ejemplo la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, el lupus, la nefritis, la diabetes, la ITP o la vasculitis, son las siguientes. Son preferidos de unos 1200 mg a unos 220 mg de dicho anticuerpo anti-CD20 por dosis, por ejemplo unos 1500 mg de dicho anticuerpo anti-CD20 (por ejemplo, rituximab) por dosis.

50 Si se administra un agente quimioterapéutico, normalmente se administrará en dosis ya conocidas para el mismo o bien opcionalmente se reducirán debido a la acción combinada de los fármacos o los efectos secundarios negativos que puedan atribuirse a la administración del agente quimioterapéutico. La preparación y los regímenes de dosificación de dichos agentes quimioterapéuticos podrán realizarse con arreglo a las instrucciones del fabricante o los médicos expertos podrán determinarlos empíricamente. La preparación y los regímenes de dosificación para dicha quimioterapia se han descrito también en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

60 La formulación farmacéutica estable del anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo de acuerdo con la invención se administra preferentemente en forma de inyección subcutánea, repitiéndose preferentemente la administración varias veces a intervalos de 3 semanas (q3w). Preferentemente, el volumen total de líquido inyectado se administra en un período de tiempo de 1 a 10 minutos, preferentemente de 2 a 6 minutos, lo más preferentemente de 3 ± 1 minutos. Preferentemente, se administran 2 ml/minuto, es decir, por ejemplo aproximadamente 240 mg/min. Para muchos pacientes, a los que no se administran otros agentes quimioterapéuticos por vía intravenosa (i.v.), esta administración subcutánea conduce a una mayor conveniencia del paciente con el potencial de la autoadministración doméstica. Estos conduce a una mejor tolerancia y puede reducir/eliminar costes asociados con la administración i.v. (a saber, costes de dispensario para la administración i.v., alquiler de camas hospitalarias, transporte del paciente, etc.). La

administración subcutánea de acuerdo con la presente invención llevará asociada con mucha probabilidad una frecuencia y/o intensidad reducidas de las reacciones derivadas de la infusión.

5 En una realización preferida, el medicamento es útil para prevenir o reducir la metástasis o la posterior diseminación en dicho paciente, que sufre un cáncer que expresa CD20. El medicamento es útil para aumentar la duración de la supervivencia del paciente, aumentar la progresión de la supervivencia libre de tal paciente, aumentar la duración de la respuesta, lo cual se traduce en una mejora estadísticamente significativa y clínicamente notable del paciente tratado, que se mide por la duración de la supervivencia, la progresión de la supervivencia libre, el índice de respuesta o la duración de la respuesta. En una realización preferida, el medicamento es útil para aumentar el índice de respuesta en un grupo de pacientes.

15 En el contexto de la presente invención pueden utilizarse uno o más agentes inhibidores del crecimiento, citotóxicos, quimioterapéuticos, anti-angiogénicos, anti-cancerosos o citocinas o compuestos que intensifican los efectos de estos agentes en el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 del cáncer que expresa CD20. Preferentemente se emplea un tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 sin agentes citotóxicos, ni quimioterapéuticos ni anti-cancerosos adicionales y sin compuestos que intensifiquen los efectos de estos agentes.

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

40 El uso de los agentes citotóxicos y anticancerosos antes descritos y de los fármacos anticancerosos antiproliferativos específicos de su diana, por ejemplo los inhibidores de las proteína-quinasas, en los regímenes quimioterapéuticos está en general bien caracterizado en las técnicas de terapia del cáncer y su empleo estará sometido a las mismas consideraciones de tolerancia de seguimiento y de eficacia y para el control de las vías de administración y de las dosis, con algunos ajustes. Por ejemplo, las dosis actuales de los agentes citotóxicos pueden variar en función de la respuesta del paciente a las células cultivadas, determina por métodos de histocultivo. En general, la dosis se reducirá por comparación con la cantidad que se emplea en ausencia de otros agentes adicionales.

50 Las dosis típicas de agente citotóxico eficaz pueden situarse dentro de los intervalos recomendados por el fabricante y cuando proceda por las respuestas "in vitro" o las respuestas obtenidas en modelos animales, pudiendo reducirse hasta en aproximadamente un orden de magnitud en concentración o en cantidad. Por lo tanto, la dosis actual dependerá del criterio del facultativo que atiende al paciente, del estado general de salud de este y de la eficacia del método terapéutico basado en la respuesta "in vitro" del cultivo primario de células malignas o de la muestra de tejido histocultivado o de las respuestas observadas en modelos animales apropiados.

55 En el contexto de la presente invención, una cantidad eficaz de radiación ionizante podrá aplicarse y/o podrá utilizarse un compuesto radiofarmacéutico además del tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 para un cáncer que exprese la CD20. La fuente de radiación puede ser interna o externa al paciente a tratar. Si la fuente es externa al paciente, la terapia se conoce como terapia de radiación por rayos externos (EBRT). Cuando la fuente de radiación es interna al paciente, el tratamiento se denomina braquiterapia (BT). Los átomos radiactivos empleados en el contexto de la presente invención pueden elegirse entre el grupo formado por (pero sin limitarse a ellos): 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 dichos isótopos radiactivos. Preferentemente se emplea el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 sin radiación ionizante.

65 La terapia de radiación es un tratamiento estándar para controlar tumores no resectable o inoperable y/o metástasis tumorales. Se han observado resultados mejores cuando la terapia de radiación se combina con la quimioterapia. La

terapia de radiación se basa en el principio de que la radiación en dosis elevada suministrada a una zona diana producirá la muerte de las células reproductoras tanto del tejido tumoral como del normal. El régimen de dosificación de radiación se define en general en término de dosis de radiación absorbida (Gy), tiempo y fraccionamiento y el oncólogo tendrá que definirlo cuidadosamente. La cantidad de radiación que el paciente recibe dependerá de varias consideraciones, pero las dos más importantes son la ubicación del tumor en relación con otras estructuras u órganos críticos del organismo y la extensión que ha cubierto el tumor en su diseminación. Un curso típico de tratamiento para un paciente sometido a la terapia de radiación será un régimen de tratamiento durante un período de 1 a 6 semanas, con una dosis total comprendida entre 10 y 80 Gy, administrada al paciente en una sola fracción diaria de aproximadamente 1,8 - 2,0 Gy, durante 5 días por semana. En una realización preferida de la presente invención se observa sinergismo cuando los tumores de pacientes humanos se tratan con el tratamiento de la invención combinado con la radiación. En otras palabras, la inhibición del crecimiento tumoral mediante los agentes que contienen la formulación del anticuerpo anti-CD20 de la invención se intensifica cuando se combina con la radiación, opcionalmente con agentes quimioterapéuticos o anticancerosos adicionales. Los parámetros de las terapias adyuvantes de radiación se han descrito, por ejemplo, en el WO 99/60023.

Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con el anticuerpo e incluyen, pero sin limitación un segundo (tercero, cuarto, etc.) agente(s) terapéutico(s) (en otras palabras: un cóctel de diferentes agentes quimioterapéuticos); otro anticuerpo monoclonal; un agente inhibidor del crecimiento; un agente citotóxico; un agente quimioterapéutico; un agente anti-angiogénico; y/o una citocina, etc.; o cualquier combinación apropiada de los mismos.

Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a cirugía para eliminar las células cancerosas y/o a terapia de radiación.

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo fabricado, que contiene la formulación farmacéutica de la presente invención y proporciona instrucciones para el uso de la misma. Este artículo fabricado consta de un contenedor. Los contenedores apropiados incluyen, por ejemplo, a los frascos, viales (por ejemplo, viales de doble cámara o de cámara múltiple), jeringuillas (por ejemplo jeringuillas de doble cámara o de cámara múltiple) y tubos de ensayo. El contenedor puede fabricarse con una gran variedad de materiales, por ejemplo de vidrio o de plástico. El contenedor contiene la formulación y lleva una etiqueta pegada sobre el mismo o asociada al mismo, el contenedor puede llevar también las indicaciones de uso. El contenedor que lleva la formulación puede ser un vial multiuso, que permite administraciones repetidas (por ejemplo, de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo fabricado puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial o del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas e insertos del paquete con las instrucciones de uso.

El anticuerpo formulado de acuerdo con la presente invención es preferentemente esencialmente puro y de modo deseable esencialmente homogéneo (es decir, libre de proteínas contaminantes, etc., en tal caso la enzima hialuronidasa de la formulación según esta invención no deberá considerarse una proteína contaminante del anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con la presente invención).

La invención se comprenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no deberán tomarse sin embargo como limitadores del alcance de la invención.

Ejemplos

Las formulaciones de anticuerpo anti-CD20 para la administración subcutánea de acuerdo con la invención se han desarrollado en base a los resultados experimentales presentados a continuación aplicando métodos generales de preparación y de análisis y ensayos que se describen a continuación.

Ejemplo 1: Preparación de formulaciones líquidas muy concentradas

Se obtiene rituximab por técnicas ya conocidas en general de producción de proteínas recombinantes. Se expande una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) de ingeniería genética, preparada del modo descrito en el documento EP-B-2000149, en un cultivo celular a partir del banco de células originales (master cell bank). Se recolecta el anticuerpo monoclonal rituximab del líquido del cultivo celular y se purifica empleando la cromatografía de afinidad en la proteína A inmovilizada, la cromatografía de intercambio catiónico, un paso de filtración para eliminar los contaminantes víricos y después la cromatografía de intercambio aniónico y un paso de ultrafiltración/ diafiltración.

Se fabrica la rHuPH20 por técnicas ya conocidas en general para la producción de proteínas recombinantes. El proceso se inicia con la descongelación de células del banco de células de trabajo (working cell bank, WCB) o del banco de células originales (master cell bank, MCB), realizando la expansión del cultivo celular en una serie de frascos de centrifugación. Se emplea el cultivo celular de hasta 6 litros para obtener una fuente continua de células que se mantiene en presión selectiva con metotrexato. Después de expandirse a aproximadamente 36 litros, el cultivo se transfiere a un biorreactor de 400 litros para llegar a un volumen final del lote de aproximadamente 300 litros. El biorreactor de producción trabaja en modo discontinuo, sin presión de selección y la duración de la fase de producción es de aproximadamente dos semanas. La rHuPH20 se secreta al líquido de cultivo. Puede utilizarse también un biorreactor de 1000 litros para llegar a un volumen final del lote de 500 litros. Una vez finalizada la fase de producción

se clarifica el líquido recogido por filtración y después se trata con disolvente/detergente para inactivar los virus. Después se purifica la proteína por una serie de cuatro procesos de cromatografía de columna para eliminar las impurezas surgidas durante el proceso o inherentes al producto. Se realiza un paso de filtración de virus y se concentra el material filtrado de la partida, se formula con el tampón final siguiente: 10 mg/ml de rHuPH20 en 20 mM de tampón L-histidina/ HCl, pH 6,5, 130 mM NaCl, 0,05% (p/v) de polisorbato 80. Se almacena el material del lote de rHuPH20 por debajo de -70°C.

Los demás excipientes de la formulación de acuerdo con la presente invención son los que se emplean habitualmente en la práctica y que los expertos conocen bien. Por tanto no es necesario entrar en la descripción detallada de los mismos.

Las formulaciones líquidas de producto farmacológico para la administración subcutánea de acuerdo con la invención se desarrollan del modo siguiente.

Para la preparación de las formulaciones líquidas se intercambia el tampón del rituximab por un tampón de diafiltración que contiene la composición anticipada del tampón y, si fuera necesario, se concentra por diafiltración hasta una concentración de anticuerpo de aproximadamente 200 mg/ml. Una vez finalizada la operación de diafiltración se añaden los excipientes (por ejemplo, trehalosa, rHuPH20, tensioactivo) en forma de soluciones patrón a la solución del anticuerpo. Finalmente se ajusta la concentración de proteína con un tampón hasta que la concentración final del rituximab sea de aproximadamente 120 mg/ml.

Todas las formulaciones se filtran en condiciones estériles a través de filtros de baja unión de proteínas de 0,22 µm y se envasan en condiciones asépticas en viales de vidrio estériles de 6 ml, que se cierran con tapones de caucho recubierto con ETFE (copolímero de etileno-trifluoretileno) y tapas de aluminio corrugado de tipo "alucrimp". El volumen envasado es de aproximadamente 3,0 ml. Se almacenan estas formulaciones en diferentes condiciones climáticas (5°C, 25°C y 40°C) durante diferentes intervalos de tiempo y se someten a estrés (1 semana con una frecuencia de agitación de 200 rpm a 5°C y 25°C) y métodos de estrés por congelación-descongelación. Se analizan las muestras antes y después de la realización de los ensayos de estrés por los métodos analíticos siguientes:

- 1) espectrofotometría UV;
- 2) cromatografía de exclusión por tamaño (SEC);
- 3) cromatografía de intercambio iónico (IEC);
- 4) se determina la turbidez de la solución;
- 5) se determinan las partículas visibles; y
- 6) se determina la actividad de la rHuPH20.

La espectroscopía UV para determinar el contenido de proteínas se realiza en un espectrofotómetro Perkin Elmer λ35 UV en un intervalo de longitudes de onda de 240 nm a 400 nm. Se diluyen las muestras de proteína tal cual hasta aproximadamente 0,5 mg/ml con el correspondiente tampón de formulación. Se calcula la concentración de proteína con arreglo a la ecuación 1.

$$\text{Ecuación 1: contenido de proteína} = \frac{A(280) - A(320) \times \text{dil. factor}}{\epsilon \left\langle \frac{\text{cm}^2}{\text{mg}} \right\rangle \times d \langle \text{cm} \rangle}$$

Se corrige la absorción de luz UV a 280 nm con la dispersión de la luz a 320 nm y se multiplica por el factor de dilución, que se ha determinado a partir de las masas pesadas y las densidades de la muestra tal cual y el tampón de dilución. Se divide el numerador por el producto de la longitud del trayecto que atraviesa la cubeta d y el coeficiente de extinción ε.

Se realiza la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para detectar las especies de peso molecular elevado (agregados) y los productos de hidrólisis de peso molecular bajo (LMW) de las formulaciones. El método requiere un instrumento HPLC apropiado equipado con un detector UV (longitud de onda de detección = 280 nm) y una columna TosoHaas TSK G3000SWXL (7,8 x 300 mm). Se separan los monómeros intactos, los agregados y los productos de hidrólisis en un perfil de elución isocrática, empleando hidrogenofosfato dipotásico 0,2 M, cloruro potásico 0,25 M, de pH 7,0, con un caudal de 0,5 ml/min.

Se realiza la cromatografía de intercambio iónico (IEC) para detectar los productos de degradación química que alteran la carga neta del rituximab en las formulaciones. A tal fin se digiere rituximab con papaína. El método requiere un instrumento HPLC apropiado, equipado con un detector UV (longitud de onda de detección = 280 nm) y una columna analítica de intercambio catiónico Polymer Labs PL-SCX 1000A. Como fases móviles A y B se emplean MES 10 mM, de pH 6,0 y MES 10 mM, cloruro sódico 0,2 M, de pH 6,0, respectivamente, con un caudal de 1 ml/min.

ES 2 574 052 T3

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

5 Se analizan las muestras para detectar las partículas visibles con un instrumento de inspección visual Seidenader V90-T.

10 Se realiza como ensayo de actividad un ensayo enzimático *in vitro* de la rHuPH20 como hialuronidasa. El ensayo se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el hialuronano (hialuronato sódico) se une a un precipitante catiónico. Se mide la actividad enzimática incubando la rHuPH20 con el sustrato hialuronano después precipitando el hialuronano no digerido con albúmina de suero acidificada (suero de caballo). Se mide la turbidez a una longitud de onda de 640 nm y la disminución de la turbidez resultante de la actividad enzimática en el sustrato hialuronano es un indicativo de la actividad enzimática. Se lleva a cabo el procedimiento empleando una curva estándar generada con diluciones de patrones de referencia de ensayo de la rHuPH20 y la actividad de la muestra se lee de la curva.

15 Los resultados de los ensayos de estabilidad de las formulaciones de A a J se recogen en las tablas añadidas a continuación.

20 Composiciones y datos de estabilidad de las formulaciones líquidas de producto farmacológico rituximab según esta invención

La formulación A es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 120 mg/ml de rituximab, 20 mM L-histidina, 210 mM trehalosa dihidratada, 10 mM metionina, 0,06% de polisorbato 80, 2.000 U/ml de rHuPH20 a pH 5,5.

temperatura almacenaje/ condiciones de estrés	tiempo de almacenaje	concentración de proteína (mg/ml)	HPLC - exclusión por tamaño			HPLC - intercambio iónico		turbidez (FTU)	partículas visibles	actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	inicial	114	2,2	97,8	0,1	24	65	4,2	libre de partículas	1970
agitación 5°C	1 semana	114	2,4	97,5	0,1	n.d.	n.d.	4,2	libre de partículas	1760
agitación 25°C	1 semana	115	2,3	97,6	0,1	n.d.	n.d.	4,4	libre de partículas	1676
congelación/ descongelación	(5 ciclos)	114	2,4	97,5	0,1	n.d.	n.d.	4,4	libre de partículas	2123
5°C	4 semanas	114	2,2	97,8	0,1	25	65	4,7	libre de partículas	1979
	13 semanas	114	2,1	97,8	0,1	26	62	4,6	libre de partículas	2219
	26 semanas	114	2,1	97,8	0,2	25	63	4,4	libre de partículas	2412
25°C	4 semanas	114	2,0	97,9	0,1	25	64	4,7	libre de partículas	1975
	13 semanas	n.d.	1,9	97,8	0,3	24	61	4,8	libre de partículas	2215
	26 semanas	n.d.	1,9	97,6	0,5	22	60	4,3	libre de partículas	2409
40°C	4 semanas	114	2,1	97,3	0,6	19	61	5,5	libre de partículas	n.d.
	13 semanas	n.d.	3,2	91,4	5,4	13	55	8,1	libre de partículas	n.d.

n.d. = no determinado

ES 2 574 052 T3

La formulación B es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 120 mg/ml de rituximab, 20 mM L-histidina, 210 mM trehalosa dihidratada, 10 mM metionina, 0,06% de polisorbato 80, 2.000 U/ml de rHUPH20 a pH 6,1.

temperatura almacenaje/ condiciones de estrés	tiempo de almacenaje	concentración de proteína (mg/ml)	HPLC - exclusión por tamaño			HPLC - intercambio iónico		turbidez (FTU)	partículas visibles	actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	inicial	117	2,3	97,7	0,1	25	63	7,1	libre de partículas	2463
agitación 5°C	1 semana	116	2,2	97,7	0,1	n.d.	n.d.	7,2	libre de partículas	2288
agitación 25°C	1 semana	118	2,1	97,8	0,1	n.d.	n.d.	6,9	libre de partículas	2613
congelación/ descongelación	(5 ciclos)	116	2,3	97,7	0,1	n.d.	n.d.	6,6	esencialmente libre de partículas	2259
5°C	4 semanas	117	2,2	97,8	0,1	25	62	6,3	libre de partículas	2485
	13 semanas	114	2,3	97,6	0,1	25	62	6,3	libre de partículas	2237
	26 semanas	119	2,2	97,7	0,1	25	61	6,8	libre de partículas	2344
25°C	4 semanas	n.d.	2,0	97,9	0,1	25	62	6,6	libre de partículas	2179
	13 semanas	n.d.	2,1	97,7	0,2	24	61	6,3	libre de partículas	2083
	26 semanas	n.d.	2,1	96,2	1,8	23	60	6,9	libre de partículas	2397
40°C	4 semanas	n.d.	2,2	96,1	1,7	21	59	8,6	libre de partículas	n.d.
	13 semanas	n.d.	3,3	92,2	4,5	14	53	21,0	libre de partículas	n.d.

n.d. = no determinado

ES 2 574 052 T3

La formulación C es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 120 mg/ml de rituximab, 20 mM L-histidina, 210 mM trehalosa dihidratada, 10 mM metionina, 0,06% de polisorbato 80, 12.000 U/ml de rHUPH20 a pH 5,5.

condiciones de almacenaje	tiempo de almacenaje	concentración de proteína (mg/ml)	HPLC - exclusión por tamaño			HPLC - intercambio iónico			turbidez (FTU)	partículas visibles	actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)				
-	inicial	126	1,7	98,3	0,0	27	58	4,4	libre de partículas	11963	
agitación 5°C	1 semana	127	1,6	98,3	0,0	n.d.	n.d.	4,0	libre de partículas	12083	
agitación 25°C	1 semana	127	1,6	98,4	0,1	n.d.	n.d.	4,5	libre de partículas	11150	
congelación/ descongelación	(5 ciclos)	126	1,6	98,4	0,0	n.d.	n.d.	4,2	esencialmente libre de partículas	11869	
5°C	7 semanas	124	1,5	98,5	0,0	26	62	5,0	libre de partículas	12206	
	19 semanas	120	1,5	98,5	0,1	26	62	4,1	libre de partículas	11945	
	26 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.	
25°C	7 semanas	n.d.	1,5	97,8	0,7	25	63	5,8	libre de partículas	12259	
	19 semanas	n.d.	1,5	97,3	1,2	24	61	4,8	libre de partículas	13137	
	26 semanas	n.d.	1,8	96,6	1,6	24	60	4,4	libre de partículas	12948	
40°C	7 semanas	n.d.	2,5	94,6	2,9	18	60	10,2	libre de partículas	n.d.	
	19 semanas	n.d.	3,7	89,8	6,5	12	55	20,0	libre de partículas	n.d.	
n.d. = no determinado											

ES 2 574 052 T3

La formulación D es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 120 mg/ml de rituximab, 20 mM de ácido acético, 210 mM trehalosa dihidratada, 10 mM metionina, 0,06% de polisorbato 20, 12.000 U/ml de rHUPH20 a pH 5,5.

condiciones de almacenaje	tiempo de almacenaje	concentración de proteína (mg/ml)	HPLC - exclusión por tamaño			HPLC - intercambio iónico		turbidez (FTU)	partículas visibles	actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	inicial	127	1,6	98,4	0,0	26	62	4,9	libre de partículas	12619
agitación 5°C	1 semana	125	1,5	98,4	0,0	n.d.	n.d.	4,3	libre de partículas	12507
agitación 25°C	1 semana	123	1,5	98,4	0,1	n.d.	n.d.	4,3	libre de partículas	12923
congelación/descongelación	(5 ciclos)	124	1,5	98,4	0,0	n.d.	n.d.	4,4	esencialmente libre de partículas	12394
5°C	7 semanas	125	1,5	98,4	0,0	26	63	5,0	esencialmente libre de partículas	10030
	19 semanas	123	1,5	98,5	0,1	26	62	4,7	libre de partículas	15324
	26 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.
25°C	7 semanas	n.d.	1,6	97,7	0,7	25	62	4,9	libre de partículas	13099
	19 semanas	n.d.	1,6	97,2	1,2	24	61	5,1	libre de partículas	13031
	26 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.
40°C	7 semanas	n.d.	2,6	94,8	2,6	17	60	28,7	libre de partículas	n.d.
	19 semanas	n.d.	3,6	90,5	6,0	9	56	51,9	libre de partículas	n.d.
n.d. = no determinado										

ES 2 574 052 T3

La formulación E es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 120 mg/ml de rituximab, 20 mM L-histidina, 210 mM trehalosa dihidratada, 10 mM metionina, 0,06% de polisorbato 20, 12.000 U/ml de rHUPH20 a pH 5,5.

condiciones de almacenamiento	tiempo de almacenamiento	concentración de proteína (mg/ml)	HPLC - exclusión por tamaño			HPLC - intercambio iónico		turbidez (FTU)	partículas visibles	actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	inicial	126	1,5	98,5	0,0	26	62	4,6	esencialmente libre de partículas	12231
agitación 5°C	1 semana	128	1,5	98,5	0,0	n.d.	n.d.	4,4	esencialmente libre de partículas	12524
agitación 25°C	1 semana	127	1,5	98,5	0,1	n.d.	n.d.	4,2	libre de partículas	11438
congelación/descongelación	(5 ciclos)	127	1,5	98,5	0,0	n.d.	n.d.	4,3	libre de partículas	14440
5°C	7 semanas	125	1,5	98,5	0,0	26	62	4,7	libre de partículas	12824
	19 semanas	125	1,5	98,5	0,1	26	62	4,5	libre de partículas	13891
	26 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.
25°C	7 semanas	n.d.	1,5	97,8	0,7	25	62	4,3	libre de partículas	13540
	19 semanas	n.d.	1,5	97,4	1,1	24	61	4,6	libre de partículas	11243
	26 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.
40°C	7 semanas	n.d.	2,5	94,6	2,9	18	60	10,6	libre de partículas	n.d.
	19 semanas	n.d.	3,9	89,6	6,5	12	55	22,7	libre de partículas	n.d.
n.d. = no determinado										

ES 2 574 052 T3

La formulación F es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 120 mg/ml de rituximab, 20 mM L-histidina, 120 mM cloruro sódico, 10 mM metionina, 0,02% de polisorbato 80, 12.000 U/ml de rHUPH20 a pH 5,5.

condiciones de almacenaje	tiempo de almacenaje	concentración de proteína (mg/ml)	HPLC - exclusión por tamaño			HPLC - intercambio iónico			turbidez (FTU)	partículas visibles	actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	Fab NS clips a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	inicial	124	1,6	98,3	0,0	3	26	62	28,7	libre de partículas	12034
agitación 5°C	1 semana	127	1,6	98,4	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	31,0	libre de partículas	12083
agitación 25°C	1 semana	125	2,4	97,5	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	31,1	libre de partículas	11150
congelación/ descongelación	(5 ciclos)	125	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	30,4	libre de partículas	11869
5°C	7 semanas	122	1,6	98,4	0,0	3	25	63	31,4	libre de partículas	10368
	19 semanas	118	1,5	98,4	0,1	3	26	62	31,8	libre de partículas	11654
	26 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.
25°C	7 semanas	n.d.	1,7	97,6	0,7	3	25	63	31,1	libre de partículas	13853
	19 semanas	n.d.	1,7	97,1	1,2	3	24	61	31,6	libre de partículas	12556
	26 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.
40°C	7 semanas	n.d.	2,9	94,1	3,1	5	19	59	87,0	libre de partículas	n.d.
	19 semanas	n.d.	4,3	88,8	6,9	6	13	55	211,0	libre de partículas	n.d.
n.d. = no determinada											

ES 2 574 052 T3

La formulación G es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 120 mg/ml de rituximab, 20 mM ácido cítrico, 120 mM cloruro sódico, 10 mM metionina, 0,02% de polisorbato 80, 12.000 U/ml de rHUPH20 a pH 6,5.

condiciones de almacenaje	tiempo de almacenaje	concentración de proteína (mg/ml)	HPLC - exclusión por tamaño			HPLC - intercambio iónico			turbidez (FTU)	partículas visibles	actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	Fab NS clips a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	inicial	126	1,8	98,1	0,0	4	26	62	40,3	libre de partículas	10808
agitación 5°C	1 semana	122	1,8	98,2	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	35,6	libre de partículas	9324
agitación 25°C	1 semana	125	2,3	97,7	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	35,7	libre de partículas	n.a.
congelación/ descongelación	(5 ciclos)	126	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	34,5	libre de partículas	11270
5°C	7 semanas	124	1,8	98,2	0,0	3	24	63	38,5	esencialmente libre de partículas	12854
	19 semanas	118	1,7	98,2	0,1	3	26	62	37,6	libre de partículas	11202
	26 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.
25°C	7 semanas	n.d.	1,9	97,4	0,7	2	24	63	40,2	esencialmente libre de partículas	11645
	19 semanas	n.d.	2,1	96,9	1,1	3	24	60	36,9	libre de partículas	14233
40°C	26 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		libre de partículas	n.d.
	7 semanas	n.d.	3,1	94,3	2,6	5	19	58	101,0	esencialmente libre de partículas	n.d.
	19 semanas	n.d.	4,8	89,4	5,8	7	12	52	385,0	libre de partículas	n.d.

n.d. = no determinada

ES 2 574 052 T3

La formulación H es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 120 mg/ml de rituximab, 20 mM ácido cítrico, 210 mM trehalosa dihidratada, 10 mM metionina, 0,06% de polisorbato 80, 12.000 U/ml de rHUPH20 a pH 6,5.

condiciones de almacenaje	tiempo de almacenaje	concentración de proteína (mg/ml)	HPLC - exclusión por tamaño			HPLC - intercambio iónico			turbidez (FTU)	partículas visibles	actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	Fab NS clips a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	inicial	127	2,0	98,0	0,0	3	26	62	33,4	libre de partículas	11951
agitación 5°C	1 semana	128	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	30,3	libre de partículas	10936
agitación 25°C	1 semana	127	1,9	98,0	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	29,7	libre de partículas	12595
congelación/ descongelación	(5 ciclos)	127	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	32,0	libre de partículas	11442
5°C	7 semanas	124	1,8	98,2	0,0	3	24	63	33,8	libre de partículas	11723
	19 semanas	122	1,7	98,2	0,1	3	26	62	30,8	libre de partículas	12180
	26 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.
25°C	7 semanas	n.d.	2,0	97,3	0,7	3	25	62	30,8	libre de partículas	12328
	19 semanas	n.d.	2,1	96,9	1,1	4	24	60	31,4	libre de partículas	12017
	26 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.
40°C	7 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5	20	58	84,8	libre de partículas	n.d.
	19 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7	11	50	295,0	libre de partículas	n.d.
n.d. = no determinada											

ES 2 574 052 T3

La formulación I es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 120 mg/ml de rituximab, 20 mM L-histidina, 120 mM cloruro sódico, 10 mM metionina, 0,04% de polisorbato 80, 12.000 U/ml de rHUPH20 a pH 6,0.

condiciones de almacenaje	tiempo de almacenaje	concentración de proteína (mg/ml)	HPLC - exclusión por tamaño				HPLC - intercambio iónico			turbidez (FTU)	partículas visibles	actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	Fab NS clips a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)				
-	inicial	123	1,7	98,3	0,0	3	25	62	34,0	libre de partículas	11022	
agitación 5°C	1 semana	125	1,6	98,3	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	33,3	libre de partículas	12231	
agitación 25°C	1 semana	124	1,7	98,3	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	32,1	libre de partículas	8371	
congelación/descongelación	(5 ciclos)	123	1,8	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	32,9	libre de partículas	12058	
5°C	7 semanas	122	1,6	98,4	0,0	3	25	62	33,5	libre de partículas	11108	
	19 semanas	119	1,6	98,4	0,1	3	26	62	34,4	libre de partículas	11548	
	26 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.	
25°C	7 semanas	n.d.	1,7	97,7	0,6	3	25	62	34,8	libre de partículas	12679	
	19 semanas	n.d.	1,8	97,2	1,1	4	24	60	34,6	libre de partículas	13252	
	26 semanas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.	
40°C	7 semanas	n.d.	2,5	94,9	2,6	5	20	58	88,1	libre de partículas	n.d.	
	19 semanas	n.d.	3,7	90,4	5,9	7	14	53	292,0	libre de partículas	n.d.	
n.d. = no determinada												

ES 2 574 052 T3

La formulación J es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 25 mg/ml de GA101 (huMab<CD20>), 20 mM L-histidina, 240 mM trehalosa dihidratada, 0,02% de Poloxamero 188, 2.000 U/ml de rHUPH20 a pH 6,0

temperatura almacenaje/ condiciones de estrés	tiempo de almacenaje	concentración de proteína (mg/ml)	HPLC - exclusión por tamaño			HPLC - intercambio iónico		turbidez (FTU)	partículas visibles	actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	región ácida (%)	pico principal (%)			
-	inicial	25,1	0,6	98,5	0,9	18,5	68,6	6,0	libre de partículas	1833
-20°C	26 semanas	26,2	0,6	98,6	0,8	18,7	68,3	5,8	libre de partículas	2078
5°C	26 semanas	25,7	0,7	98,4	0,9	19,1	67,9	5,6	libre de partículas	1380
25°C	26 semanas	25,9	0,9	97,3	1,9	26,7	60,8	6,0	libre de partículas	978
40°C	26 semanas	26,1	3,0	86,8	9,7	40,9	19,5	7,2	esencialmente libre de partículas	< límite de cuantificación

n.d. = no determinado

Ejemplo 2: Preparación de formulaciones líquidas de 2H7 humanizado anti-CD20

Para la preparación de las formulaciones líquidas, el anticuerpo recombinante humanizado 2H7 anti-CD20 (2H7.v16, descrito en el documento WO 2006/084264) se somete a cambio de tampón, adoptando el tampón de diafiltración que contiene la composición de tampón ya anticipada y, si fuera necesario, se concentra hasta una concentración de anticuerpo aproximadamente de 60 a 120 mg/ml. Una vez alcanzada la concentración deseada se añaden los excipientes (por ejemplo, trehalosa, rHuPH20, Polisorbato 20) en forma de soluciones patrón a la solución del anticuerpo. Finalmente se ajusta la concentración de proteína con el tampón de la formulación final hasta una concentración de 2H7 humanizado de aproximadamente 30, 50 ó 100 mg/ml.

Todas las formulaciones se filtran en condiciones estériles en filtros de unión de proteínas de 0,22 µm y se envasan en condiciones asépticas en viales de vidrio estériles de 3 ml con tapones de caucho butilo laminos con resina fluorada, que se cierran con sellos de tipo "flip-off" de aluminio-plástico. El volumen envasado es de aproximadamente 1,2 ml. Estas formulaciones se almacenan a diferentes temperaturas (5°C, 25°C y 40°C) durante diferentes intervalos de tiempo. Las muestras se analizan en cada punto temporal de estabilizada por los métodos analíticos siguientes:

- 1) espectrofotometría UV
- 2) cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)
- 3) cromatografía de intercambio iónico (IEC)
- 4) ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) para determinar la actividad del 2H7 humanizado
- 5) ensayo de turbidimetría para determinar la actividad del rHuPH20

1). La concentración de proteína se determina por espectroscopía de absorción ultravioleta empleando un espectrofotómetro Agilent 8453, en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 240 nm y 400 nm. Las muestras se diluyen gravimétricamente hasta aproximadamente 0,5 mg/ml con el correspondiente tampón de formulación. Las concentraciones de proteína se calculan con arreglo a la ecuación 1:

$$\text{concentración de proteína} = ((A_{\text{máx}} - A_{320}) \times DF) / (\epsilon(\text{cm}^2/\text{mg}) \times d(\text{cm})) \text{ (ecuación 1)}$$

en la que DF es el factor de dilución; d es la longitud de recorrido a través de la cubeta; y ϵ es el coeficiente de extinción, que es de 1,75 (cm²/mg⁻¹) para el 2H7 en la A_{máx}. La absorción de luz UV en la A_{máx} (por ejemplo de 278 a 280 nm) se corrige con la dispersión de la luz a 320 nm y se multiplica por el factor de dilución, que se determina a partir de las masas pesadas y de las densidades de la muestra pura y del tampón de dilución. El numerador se divide por el producto de la longitud de recorrido a través de la cubeta d y el coeficiente de extinción ϵ .

2). Se aplica la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para detectar las especies solubles de peso molecular elevado (agregados) y los productos de hidrólisis de peso molecular bajo (fragmentos) de las formulaciones. La SEC se efectúa en un aparato HPLC de la serie 1100 de Agilent Technologies, Inc., equipado con un detector UV (longitud de onda de detección: 280 nm) y una columna TSK G3000SWXL (7,8 x 300 mm). Se separan los monómeros intactos, los agregados y los productos de hidrólisis con un perfil de elución isocrático, empleando fosfato potásico 0,20 M y cloruro potásico 0,25 M de pH 6,2, con un caudal de 0,3 ml/min.

3). Se realiza la cromatografía de intercambio iónico (IEC) para detectar los productos de degradación química que alteran la carga neta del anticuerpo anti-CD20 en las formulaciones. A tal fin se incuba el anticuerpo anti-CD20 con la carboxipeptidasa B para catalizar la hidrólisis de los aminoácidos básicos. La cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo en un aparato HPLC de la serie 1100 de Agilent Technologies, Inc., equipado con un detector UV (longitud de onda de detección: 280 nm) y una columna Dionex ProPac WCX-10 (4 x 250 mm). Se separan las variantes ácidas y básicas empleando un gradiente lineal de fosfato potásico 25 mM de pH 6,9 (fase móvil A) y cloruro potásico 120 mM, disuelto en fosfato potásico 25 mM (fase móvil B), con un caudal de 0,5 ml/min.

4). El ensayo de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) se realiza para determinar la actividad "in vitro" del anticuerpo anti-CD20. El ensayo de la potencia de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) se emplea para medir la capacidad del anticuerpo de lisar las células del linfoblastoide B humano (WIL2-S) en presencia de complemento humano. Este ensayo se realiza en placas de 96 pocillos de microtitulación de cultivo de tejido. En este ensayo se incuban concentraciones variables del material de referencia, el anticuerpo anti-CD20, el control o la o las muestras diluidas en el diluyente de ensayo junto con células WIL2-S (50.000 células/pocillo) en presencia de una cantidad fija de complemento humano. Se incuba la placa a 37°C/5 % de CO₂ en un incubador humidificado durante 1-2 horas. Una vez finalizado el período de incubación se añaden a cada pocillo 50 µl del colorante redox ALAMARBLUE™ y se incuba la placa durante 5-26 horas. El ALAMARBLUE™ es un colorante redox de fluorescencia de una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm, cuando las células vivas lo reducen. Por consiguiente, los cambios de color y de fluorescencia son proporcionales al número de células viables. Los resultados, expresados en unidades relativas de fluorescencia (RFU), se representan en una gráfica frente a las concentraciones del anticuerpo anti-CD20 y se emplea un programa paralelo para estimar la actividad de las muestras de anticuerpo anti-CD20 con respecto al material de referencia.

5) Se realiza un ensayo turbidimétrico para determinar la actividad de la hialuronidasa y la concentración enzimática. Este método se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une a la albúmina del suero acidificado. Resumiendo, se prepara una serie de diluciones del patrón de referencia de trabajo de la hialuronidasa rhuPH20 (Halozyme, Inc.), comprendidas entre 2,5 U/ml y 0,25 U/ml en el diluyente de la enzima (70 mM NaCl, 25 mM PIPES, pH 5,5, 0,66 mg/ml de gelatina hidrolizada, un 0,1 % de albúmina de suero humano). Se diluyen las muestras de referencia hasta una concentración final de 1,5 U/ml en el diluyente de la enzima. Se trasvasan 30 µl del patrón y de las diluciones de las muestras a una placa de 96 pocillos de "fondo negro transparente" (Nunc). Después se recubre la placa y se calienta previamente a 37°C durante 5 minutos. Se inicia la reacción añadiendo 30 µl de solución de sustrato ácido hialurónico 0,25 mg/ml (70 mM NaCl, 25 mM PIPES, pH 5,5, 0,25 mg/ml de hialuronato sódico seco, Lifecore Biomedical). Se agita la placa brevemente y se incuba a 37°C durante 10 minutos. Después de este paso de incubación se interrumpe la reacción añadiendo 240 µl de solución de trabajo de suero (un 2,5 % de suero de caballo, acetato potásico 500 mM, pH 4,25). Después de un período de desarrollo de 30 minutos a temperatura ambiente se mide la turbidez de la mezcla reaccionante en un lector de microplacas a una longitud de onda de 640 nm. La disminución de la turbidez resultante de la actividad enzimática en el sustrato de ácido hialurónico es un indicativo de la actividad de la hialuronidasa. Se determina la actividad de la muestra con respecto a la curva de calibrado, generada con diluciones del patrón de referencia de trabajo rhuPH20.

Los resultados obtenidos con las diferentes formulaciones de anticuerpo 2H7 humanizado se recogen en las tablas siguientes.

La formulación K es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 30 mg/ml de 2H7 humanizado, 30 mM acetato sódico, 8% de trehalosa dihidratada, 0,02% Polisorbato 20, 0 U/ml de rhuPH20 a pH 5,3

Temperatura almacenaje	Tiempo almacenaje	Concentración de proteína (mg/ml)	HPLC exclusión tamaños			HPLC intercambio iónico		Potencia CDC (% actividad específica)	Actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	Monómero (%)	LMW (%)	% variante ácida	% pico principal		
-	Inicial	32	0,9	98,9	0,2	27,1	67,5	103	ND
	12 semanas	ND	0,8	98,1	1,1	27,8	65,9	110	ND
5°C	24 semanas	ND	0,8	98,1	1,1	25,6	68,1	89	ND
	36 semanas	ND	0,9	98,6	0,5	27,0	68,3	97	ND
	48 semanas	ND	1,0	97,4	1,6	25,9	68,3	96	ND
	72 semanas	ND	0,9	97,9	1,2	25,2	68,2	109	ND
25°C	96 semanas	ND	0,9	97,8	1,3	28,1	66,1	96	ND
	4 semanas	ND	0,7	98,0	1,2	29,5	64,7	ND	ND
	8 semanas	ND	0,8	97,7	1,5	32,5	61,9	ND	ND
	12 semanas	ND	0,8	97,4	1,8	35,0	59,1	83	ND
40°C	24 semanas	ND	1,0	96,8	2,2	40,9	52,1	ND	ND
	2 semanas	ND	0,7	97,8	1,6	36,0	57,7	ND	ND
	4 semanas	ND	0,8	96,6	2,5	45,1	47,4	ND	ND
	8 semanas	ND	1,0	94,9	4,1	60,3	33,3	ND	ND

*ND = no determinada

ES 2 574 052 T3

La formulación L es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 30 mg/ml de 2H7 humanizado, 30 mM acetato sódico, 8% de trehalosa dihidratada, 0,02% Polisorbato 20, 1500 U/ml de rhuPH20 a pH 5,3.

Temperatura almacenaje	Tiempo almacenaje	Concentración de proteína (mg/ml)	HPLC exclusión tamaños			HPLC intercambio iónico		Potencia CDC (% actividad específica)	Actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	Monómero (%)	LMW (%)	% variante ácida	% pico principal		
5°C	Inicial	32	0,9	98,9	0,2	27,1	67,4	114	1309
	12 semanas	ND	0,8	97,9	1,3	27,6	65,7	110	1520
	24 semanas	ND	0,8	98,1	1,2	26,1	67,1	82	1112
	36 semanas	ND	0,9	97,3	1,8	27,0	67,9	98	1166
	48 semanas	ND	0,9	97,3	1,8	26,2	67,9	100	1620
	72 semanas	ND	0,9	97,9	1,3	26,0	68,2	97	ND
	96 semanas	ND	0,9	97,8	1,3	28,1	66,0	96	ND
	4 semanas	ND	0,7	98,0	1,3	29,5	64,7	ND	1147
	8 semanas	ND	0,8	97,8	1,4	32,1	61,9	ND	847
25°C	12 semanas	ND	0,8	97,3	1,9	35,1	59,3	89	892
	24 semanas	ND	1,0	96,8	2,2	41,3	51,9	ND	777
	2 semanas	ND	0,8	97,6	1,6	35,3	57,4	ND	ND
	4 semanas	ND	0,8	96,7	2,4	45,2	46,9	ND	ND
	8 semanas	ND	1,0	95,0	4,0	59,8	34,3	ND	ND
40°C	2 semanas	ND	0,8	97,6	1,6	35,3	57,4	ND	ND
	4 semanas	ND	0,8	96,7	2,4	45,2	46,9	ND	ND
	8 semanas	ND	1,0	95,0	4,0	59,8	34,3	ND	ND

*ND = no determinada

ES 2 574 052 T3

La formulación M es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 30 mg/ml de 2H7 humanizado, 30 mM acetato sódico, 8% de trehalosa dihidratada, 0,02% Polisorbato 20, 12.000 U/ml de rhuPH20 a pH 5,3.

Temperatura almacenaje	Tiempo almacenaje	Concentración de proteína (mg/ml)	HPLC exclusión tamaños			HPLC intercambio iónico		Potencia CDC (% actividad específica)	Actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	Monómero (%)	LMW (%)	% variante ácida	% pico principal		
-	Inicial	33	0,9	98,9	0,2	27,2	67,4	103	10584
	12 semanas	ND	0,8	97,7	1,6	26,5	66,8	111	8864
5°C	24 semanas	ND	0,8	97,8	1,4	25,8	68,1	85	14319
	36 semanas	ND	0,8	97,5	1,7	27,1	68,0	96	11408
	48 semanas	ND	0,9	96,7	2,4	26,2	67,9	95	13817
	72 semanas	ND	0,9	97,6	1,6	26,4	68,0	98	ND
	96 semanas	ND	0,9	97,4	1,6	28,3	65,8	108	ND
	4 semanas	ND	0,8	97,7	1,5	29,6	64,7	ND	13464
25°C	8 semanas	ND	0,8	97,4	1,7	32,1	61,9	ND	10975
	12 semanas	ND	0,9	97,0	2,1	35,4	58,7	92	10394
	24 semanas	ND	1,0	96,5	2,5	41,0	51,8	ND	819
	2 semanas	ND	1,1	97,3	1,6	35,7	57,2	ND	ND
40°C	4 semanas	ND	0,8	96,6	2,5	45,5	47,5	ND	ND
	8 semanas	ND	1,0	94,9	4,1	59,9	33,3	ND	ND

*ND = no determinada

ES 2 574 052 T3

La formulación N es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 50 mg/ml de 2H7 humanizado, 30 mM acetato sódico, 8% de trehalosa dihidratada, 0,02% Polisorbato 20, 0 U/ml de rhuPH20 a pH 5,3.

Temperatura almacenaje	Tiempo almacenaje	Concentración de proteína (mg/ml)	HPLC exclusión tamaños			HPLC intercambio iónico		Potencia CDC (% actividad específica)	Actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	Monómero (%)	LMW (%)	% variante ácida	% pico principal		
-	Inicial	50	0,9	98,9	0,2	27,0	67,6	107	ND
	12 semanas	ND	0,9	98,1	1,0	26,9	66,6	86	ND
5°C	24 semanas	ND	0,9	97,9	1,1	25,8	67,7	88	ND
	36 semanas	ND	1,0	97,9	1,1	27,1	68,5	92	ND
	48 semanas	ND	1,0	97,8	1,2	26,2	67,8	95	ND
	72 semanas	ND	1,0	97,8	1,2	26,5	67,9	101	ND
25°C	96 semanas	ND	1,1	97,6	1,3	28,4	65,8	98	ND
	4 semanas	ND	0,9	97,9	1,2	29,5	64,9	ND	ND
	8 semanas	ND	0,9	97,6	1,5	32,1	61,8	ND	ND
	12 semanas	ND	1,0	97,4	1,6	35,3	58,9	86	ND
40°C	24 semanas	ND	0,9	97,9	1,1	40,0	52,8	ND	ND
	2 semanas	ND	0,9	97,5	1,6	35,3	56,9	ND	ND
	4 semanas	ND	1,1	96,2	2,7	45,2	47,8	ND	ND
	8 semanas	ND	1,4	94,1	4,4	59,7	32,9	ND	ND

*ND = no determinada

ES 2 574 052 T3

La formulación O es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 50 mg/ml de 2H7 humanizado, 30 mM acetato sódico, 8% de trehalosa dihidratada, 0,02% Polisorbato 20, 1.500 U/ml de rhuPH20 a pH 5,3.

Temperatura almacenaje	Tiempo almacenaje	Concentración de proteína (mg/ml)	HPLC exclusión tamaños			HPLC intercambio iónico		Potencia CDC (% actividad específica)	Actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	Monómero (%)	LMW (%)	% variante ácida	% pico principal		
-	Inicial	51	0,9	98,9	0,2	27,1	67,4	116	1537
	12 semanas	ND	0,9	97,8	1,3	25,8	67,4	109	1454
	24 semanas	ND	0,9	97,9	1,2	26,0	67,7	84	1372
	36 semanas	ND	1,0	97,5	1,5	27,7	67,3	93	1432
5°C	48 semanas	ND	1,1	97,0	2,0	26,0	68,4	102	1356
	72 semanas	ND	1,1	97,6	1,4	26,5	68,0	97	ND
	96 semanas	ND	1,2	97,6	1,3	28,2	65,9	104	ND
	4 semanas	ND	0,9	97,9	1,3	29,7	64,6	ND	1269
25°C	8 semanas	ND	0,9	97,4	1,6	32,1	62,0	ND	966
	12 semanas	ND	1,0	97,5	1,5	35,2	58,9	89	1002
	24 semanas	ND	1,3	96,5	2,2	40,5	52,2	ND	ND
	2 semanas	ND	0,9	97,5	1,6	35,9	56,1	ND	ND
40°C	4 semanas	ND	1,1	96,3	2,6	46,5	45,7	ND	ND
	8 semanas	ND	1,4	94,6	4,0	60,5	31,9	ND	ND

*ND = no determinada

ES 2 574 052 T3

La formulación P es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 50 mg/ml de 2H7 humanizado, 30 mM acetato sódico, 8% de trehalosa dihidratada, 0,02% Polisorbato 20, 12.000 U/ml de rhuPH20 a pH 5,3.

Temperatura almacenaje	Tiempo almacenaje	Concentración de proteína (mg/ml)	HPLC exclusión tamaños			HPLC intercambio iónico		Potencia CDC (% actividad específica)	Actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	Monómero (%)	LMW (%)	% variante ácida	% pico principal		
-	Inicial	52	0,9	98,9	0,2	27,2	67,4	110	9932
	12 semanas	ND	0,9	97,7	1,4	26,8	67,6	102	9668
5°C	24 semanas	ND	0,9	97,7	1,4	25,7	68,2	ND	11292
	36 semanas	ND	1,0	97,5	1,5	27,5	67,0	96	15469
	48 semanas	ND	1,1	97,4	1,6	26,1	68,2	100	10832
	72 semanas	ND	1,0	97,7	1,3	26,3	68,0	106	ND
25°C	96 semanas	ND	1,2	97,4	1,5	29,3	64,8	100	ND
	4 semanas	ND	0,9	97,6	1,5	29,7	64,6	ND	11765
	8 semanas	ND	1,0	97,6	1,4	32,3	61,9	ND	11594
	12 semanas	ND	1,1	97,1	1,8	35,4	58,8	86	10119
40°C	24 semanas	ND	1,2	96,4	2,4	41,1	51,8	ND	8960
	2 semanas	ND	1,1	97,3	1,6	35,9	55,5	ND	ND
40°C	4 semanas	ND	1,1	96,4	2,5	44,9	46,5	ND	ND
	8 semanas	ND	1,4	94,5	4,1	60,4	33,2	ND	ND

*ND = no determinada

ES 2 574 052 T3

La formulación Q es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 100 mg/ml de 2H7 humanizado, 30 mM acetato sódico, 8% de trehalosa dihidratada, 0,02% Polisorbato 20, 0 U/ml de rhuPH20 a pH 5,3.

Temperatura almacenaje	Tiempo almacenaje	Concentración de proteína (mg/ml)	HPLC exclusión tamaños			HPLC intercambio iónico		Potencia CDC (% actividad específica)	Actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	Monómero (%)	LMW (%)	% variante ácida	% pico principal		
-	Inicial	102	1,0	98,8	0,2	27,2	67,5	101	ND
	12 semanas	ND	1,2	97,7	1,1	26,7	68,0	106	ND
5°C	24 semanas	ND	1,3	97,6	1,2	25,8	67,5	84	ND
	36 semanas	ND	1,3	97,2	1,5	27,4	67,4	95	ND
	48 semanas	ND	1,3	97,2	1,6	26,2	68,3	89	ND
	72 semanas	ND	1,4	97,4	1,2	26,4	68,3	106	ND
25°C	96 semanas	ND	1,5	97,2	1,2	28,1	66,4	96	ND
	4 semanas	ND	1,2	97,5	1,2	31,0	63,7	ND	ND
	8 semanas	ND	1,5	97,2	1,4	32,4	61,9	ND	ND
	12 semanas	ND	1,6	96,7	1,7	35,4	58,9	90	ND
40°C	24 semanas	ND	1,9	96,0	2,1	40,6	52,1	ND	ND
	2 semanas	ND	1,4	97,1	1,6	35,4	57,7	ND	ND
	4 semanas	ND	1,8	95,5	2,7	45,6	47,3	ND	ND
	8 semanas	ND	2,3	93,5	4,3	60,3	32,9	ND	ND

*ND = no determinada

ES 2 574 052 T3

La formulación R es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 100 mg/ml de 2H7 humanizado, 30 mM acetato sódico, 8% de trehalosa dihidratada, 0,02% Polisorbato 20, 1.500 U/ml de rhuPH20 a pH 5,3.

Temperatura almacenaje	Tiempo almacenaje	Concentración de proteína (mg/ml)	HPLC exclusión tamaños			HPLC intercambio iónico		Potencia CDC (% actividad específica)	Actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	Monómero (%)	LMW (%)	% variante ácida	% pico principal		
5°C	Inicial	101	1,0	98,8	0,2	27,3	67,5	98	1389
	12 semanas	ND	1,2	97,7	1,2	25,3	67,7	104	1655
	24 semanas	ND	1,3	97,6	1,2	26,0	67,6	82	1381
	36 semanas	ND	1,3	96,6	2,2	26,7	68,7	95	1644
	48 semanas	ND	1,3	96,5	2,2	26,2	68,2	94	1381
	72 semanas	ND	1,4	97,5	1,2	26,7	68,1	106	ND
	96 semanas	ND	1,5	97,2	1,3	28,1	66,2	95	ND
	4 semanas	ND	1,2	97,5	1,2	29,2	64,2	ND	1376
25°C	8 semanas	ND	1,4	97,3	1,3	32,5	60,4	ND	1018
	12 semanas	ND	1,6	96,9	1,5	35,3	58,9	91	942
	24 semanas	ND	1,9	96,0	2,2	40,7	53,8	ND	616
	2 semanas	ND	1,3	97,1	1,5	35,8	55,8	ND	ND
40°C	4 semanas	ND	1,8	95,6	2,7	45,8	47,6	ND	ND
	8 semanas	ND	2,3	93,6	4,0	59,3	32,4	ND	ND

*ND = no determinada

ES 2 574 052 T3

La formulación S es una formulación líquida que tiene la composición siguiente: 100 mg/ml de 2H7 humanizado, 30 mM acetato sódico, 8% de trehalosa dihidratada, 0,02% Polisorbato 20, 12.000 U/ml de rhuPH20 a pH 5,3.

Temperatura almacenaje	Tiempo almacenaje	Concentración de proteína (mg/ml)	HPLC exclusión tamaños			HPLC intercambio iónico		Potencia CDC (% actividad específica)	Actividad enzimática (U/ml)
			HMW (%)	Monómero (%)	LMW (%)	% variante ácida	% pico principal		
-	Inicial	101	1,0	98,8	0,2	27,4	67,4	99	11692
5°C	12 semanas	ND	1,1	97,6	1,2	25,8	68,1	97	10699
	24 semanas	ND	1,2	97,6	1,2	26,1	67,2	80	11946
	36 semanas	ND	1,2	97,1	1,7	26,1	69,3	95	14894
	48 semanas	ND	1,3	97,0	1,8	25,7	68,4	89	11820
	72 semanas	ND	1,4	97,4	1,3	26,4	68,3	102	ND
	96 semanas	ND	1,5	97,1	1,4	28,1	66,2	97	ND
25°C	4 semanas	ND	1,3	97,4	1,3	29,8	64,6	ND	11897
	8 semanas	ND	1,4	97,1	1,4	32,5	61,6	ND	11117
	12 semanas	ND	1,5	96,6	1,8	35,5	58,7	89	10763
	24 semanas	ND	1,9	95,9	2,3	41,1	51,1	ND	7783
40°C	2 semanas	ND	1,4	97,0	1,6	35,6	55,9	ND	ND
	4 semanas	ND	1,8	95,6	2,6	46,0	48,0	ND	ND
	8 semanas	ND	2,2	93,8	4,0	61,4	32,7	ND	ND

*ND = no determinada

Ejemplo 3: Tratamiento de pacientes con la formulación

Los regímenes en los que se administra rituximab se han convertido en el estándar para el tratamiento de pacientes que sufren varias enfermedades malignas de células B, positivas de CD20. Actualmente se administra rituximab por infusión intravenosa (i.v.) durante varias horas. Algunos pacientes mencionan los prolongados tiempos de infusión y los efectos secundarios asociados a la misma como consecuencias no confortables del actual tratamiento terapéutico. Además, el procedimiento requerido para establecer el acceso intravenoso se considera invasivo y puede ser doloroso, en particular en el caso de pacientes que sufren enfermedades malignas y que deben tratarse repetidamente. La administración subcutánea (s.c.) podría simplificar significativamente el tratamiento, acortando el tiempo de administración a menos de 10 minutos y mejorando la experiencia del paciente. La hialuronidasa humana recombinante (rHUPH20) se ha desarrollado y se ha aprobado para mejorar la dispersión y la absorción de los fármacos co-administrados. Se ha combinado con rituximab para conseguir que los volúmenes mayores de 10 ml puedan administrarse de forma segura y conformable por vía s.c. La finalidad de este tratamiento es seleccionar la dosis de la formulación s.c. de rituximab con la rHuPH20 preparada del modo descrito en el ejemplo 1 (formulación A), que da una exposición comparable a la rituximab i.v. y para evaluar su seguridad y tolerabilidad en pacientes varones y mujeres, que sufren linfoma folicular (FL), durante el tratamiento de mantenimiento.

En este ejemplo se proporcionan datos del estadio 1 de un estudio de fase IB aleatorio, de etiqueta abierta, adaptable a varios centros. Se reparten 124 pacientes de forma aleatoria en cuatro grupos de tratamiento de mantenimiento con rituximab: 16 pacientes de control i.v., 34 pacientes de dosis 1 s.c. (375 mg/m²), 34 pacientes de dosis 2 s.c. (625 mg/m²) y 40 pacientes de dosis 3 s.c. (800 mg/m²). Antes del reparto aleatorio se tratan los pacientes elegibles al menos con una dosis i.v. de rituximab de 375 mg/m² en el modo de mantenimiento. Para los pacientes integrados en uno de los grupos s.c. se reemplaza una dosis única i.v. por una dosis s.c. Los pacientes reciben rituximab en un régimen de cada 2 meses (q2m) o bien cada 3 meses (q3m), para la práctica local. Los datos de seguridad se disponen de un total de 119 pacientes. En general, rituximab s.c. se tolera bien. No se han publicado observaciones clínicamente significativa ni incidentes adversos serios atribuibles al tratamiento. Se han anotado un total de 95 incidentes adversos (AEs) de 46 pacientes (39 %). El AE documentado más a menudo es una "reacción asociada con la administración" (AAR que incluye sarpullido, eritema y ligeras molestias). Estos AARs son reversibles, predominantemente débiles en intensidad y solamente 1 incidente requirió un tratamiento (metoclopramida para la náusea). En conjunto, el perfil AE no es significativamente diferente del que cabía esperar de pacientes tratados con rituximab i.v. (después de la ARR, los incidentes más frecuentes son trastornos gastrointestinales e infecciones débiles). Se publican cuatro incidentes adversos serios (SAEs) en 4 pacientes separados, todos ellos por causas ajenas a la medicación del estudio. No se registraron AEs con desenlace fatal, ni abandonos ni interrupciones del tratamiento.

El volumen total administrado por vía s.c. a cada paciente se sitúa entre 4,4 y 15,0 ml. El volumen promedio inyectado por unidad de tiempo es de 2 ml/min. Las concentraciones máximas de rituximab en el suero de los grupos tratados por vía s.c. se observan entre el día 2 y el 8 (48 h y 168 h). Los parámetros farmacocinéticos son lineales con respecto a la dosis a lo largo del intervalo de dosis administradas por vía s.c. (375, 625 y 800 mg/m²). Las concentraciones de rituximab en el día 28 (C₂₈) y la extensión de la exposición del suero (AUC₀₋₅₇) en pacientes que reciben 625 mg/m² de rituximab s.c. son comparables a las que los pacientes que reciben la dosis estándar de rituximab i.v. de 375 mg/m².

Conclusión: rituximab subcutáneo puede administrarse de modo rápido, confortable y seguro, lográndose una exposición del suero comparable a la de la formulación intravenosa aprobada para pacientes FL durante el tratamiento de mantenimiento. La experiencia del paciente es favorable. Estos resultados animaron a seguir probando rituximab subcutáneo y se ha elegido una dosis fija de 1.400 mg de rituximab s.c. para el ensayo formal de no inferioridad C_{mínima} en el estadio 2 del estudio.

Ejemplo 4: Rituximab s.c. frente al rituximab i.v. en pacientes con linfoma folicular no de Hodgkin

Los pacientes con linfoma folicular (grado bajo) previamente no tratado reciben un tratamiento de mantenimiento con: (a) una formulación s.c. de rituximab (preparada de acuerdo con el ejemplo 1, formulación A) en combinación con CHOP o CVP o bien (b) rituximab i.v. en combinación con CHOP o CVP.

Se dividen los pacientes en grupos aleatorios para recibir 375 mg/m² de rituximab en forma de infusión intravenosa o bien 1.400 mg de rituximab por vía subcutánea. Además, los pacientes reciben quimioterapia estándar (CVP o CHOP). Los pacientes, que consiguen una respuesta completa o parcial después de 8 ciclos de tratamiento, recibirán el tratamiento de mantenimiento durante un número adicional como máximo de 12 ciclos. Los ciclos de tratamiento de mantenimiento se repetirán cada 8 semanas. El tiempo previsto para el tratamiento del estudio es de 96 semanas.

El tratamiento con 1.400 mg del anticuerpo anti-CD20 rituximab por vía s.c. como tratamiento de mantenimiento cada 8 semanas durante un máximo de 12 ciclos se espera que sea seguro y eficaz para tratar el linfoma folicular, opcionalmente en combinación con la quimioterapia (incluido el CHOP o el CVP).

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica estable altamente concentrada para administración subcutánea de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo que comprende:
- 5 a. de 50 a 350 mg/ml de anticuerpo anti-CD20;
 b. de 1 a 100 mM de un agente tamponador que proporciona un pH de $5,5 \pm 2,0$;
 c. de 1 a 500 mM de un estabilizante o una mezcla de dos o más estabilizantes;
 d. del 0,01 al 0,1% de un tensioactivo no iónico; y
 10 e. de 1.000 a 16.000 U/ml de una enzima hialuronidasa, preferentemente aproximadamente 2.000 U/ml o 12.000 U/ml.
2. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración del anticuerpo anti-CD20 es de 100 a 150 mg/ml, preferentemente de 120 ± 20 mg/ml.
- 15 3. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el agente tamponador está a una concentración de 1 a 50 mM.
4. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el agente tamponador proporciona un pH de 5,5 a 6,5, preferentemente seleccionado entre el grupo que consiste en 5,5, 6,0, 6,1 y 6,5.
- 20 5. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el agente tamponador es un tampón de histidina.
- 25 6. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el estabilizante es un sacárido, tal como, por ejemplo, dihidrato de α , α -trehalosa o sacarosa.
- 30 7. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el estabilizante está a una concentración de 15 a 250 mM.
8. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, en la que se usa metionina como estabilizante secundario.
- 35 9. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con la reivindicación 8, donde la metionina está presente a una concentración de 5 a 25 mM.
10. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el tensioactivo no iónico es un polisorbato, preferentemente seleccionado entre el grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80 y copolímero de polietileno-polipropileno.
- 40 11. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la concentración del polisorbato es del 0,02 % (p/v) al 0,08 % (p/v).
- 45 12. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la enzima hialuronidasa es rHuPH20.
13. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que el anticuerpo anti-CD20 es rituximab.
- 50 14. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que el anticuerpo anti-CD20 es ocrelizumab.
15. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que el anticuerpo anti-CD20 es HuMab<CD20>.
- 55 16. La formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que es estable tras su congelación y descongelación.
- 60 17. La formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en forma líquida.
18. La formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en forma liofilizada.
- 65

19. La formulación de anticuerpo anti-CD20 estable altamente concentrada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 que comprende 120 mg/ml de rituximab, L-histidina 20 mM, dihidrato de trehalosa 210 mM, metionina 10 mM, polisorbato 80 al 0,06 %, 2000 U/ml de rHuPH20 a pH 5,5.
- 5 20. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno susceptible de tratamiento con un anticuerpo anti-CD20, preferentemente cáncer o una enfermedad no maligna en un sujeto que comprende administrar la formulación descrita en el presente documento a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar dicha enfermedad o trastorno.
- 10 21. La formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en la que la formulación se coadministra de manera concomitante o secuencial con quimioterapia.
22. La formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 20 o 21 en la que la formulación comprende una dosis fija de 1200 mg a 2200 mg del anticuerpo anti-CD20.
- 15 23. La formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 20 o 21 en la que la formulación comprende una dosis fija de 1200 mg a 1800 mg del anticuerpo anti-CD20.
- 20 24. La formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 20 o 21 en la que la formulación comprende una dosis fija de 1600 mg a 2200 mg del anticuerpo anti-CD20.