

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 728**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.01.2009 PCT/EP2009/000003**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2009 WO09083602**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2009 E 09700128 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2235060**

54 Título: **Agentes de disminución de células B, como anticuerpos anti-CD20 o fragmentos de los mismos para el tratamiento del síndrome de fatiga crónica**

30 Prioridad:

02.01.2008 EP 08000006
02.01.2008 US 18551

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2017

73 Titular/es:

BERGEN TEKNOLOGIOVERFØRING AS (100.0%)
THORMOHLSENGATE 55
5008 BERGEN, NO

72 Inventor/es:

MELLA, OLAV y
FLUGE, ØYSTEIN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 625 728 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

Agentes de disminución de células B, como anticuerpos anti-CD20 o fragmentos de los mismos para el tratamiento del síndrome de fatiga crónica

- 5 La presente invención se refiere en un primer aspecto a un anticuerpo anti-CD20 de disminución de células B o a un fragmento de anticuerpo de unión a CD20 del mismo para el tratamiento del síndrome de fatiga crónica y de la encefalomiелitis miálgica. En particular, la presente invención se refiere al uso de anticuerpos monoclonales anti-CD20 o fragmentos de los mismos que preferiblemente están humanizados para el tratamiento del síndrome de fatiga crónica/encefalomiелitis miálgica en un sujeto afectado por dicha enfermedad.

Antecedentes técnicos

10 SÍNDROME DE FATIGA CRÓNICA

- 15 El síndrome de fatiga crónica (SFC) se caracteriza por una fatiga grave, inexplicable, que persiste durante al menos seis meses consecutivos, y con una reducción sustancial de los niveles previos de actividades ocupacionales, sociales, o personales. Además, los pacientes experimentan a menudo síntomas persistentes o recurrentes tales como deterioro de la memoria a corto plazo o de la concentración, dolor muscular, dolor articular sin pruebas de artritis, cefalea, alteraciones del sueño, y agotamiento tras el ejercicio (Fukuda K, et al., 1994, *Ann Intern Med* 121:953-9et al 1994). Aunque muchos estudios han demostrado alteraciones sutiles en los análisis de sangre o las investigaciones radiológicas, no existe ningún biomarcador o análisis de diagnóstico.

Se cree que la prevalencia del SFC en todo el mundo es de al menos un 0,5 %, y la proporción mujeres:hombres es 3:1 (Wyller VB. 2007, *Acta Neurol Scand*, Supl. 187:7-14).

- 20 La etiología de SFC sigue sin estar clara. Las diversas hipótesis incluyen mecanismos inmunológicos, virológicos, neuroendocrinológicos y psicológicos. Se supone que la patogénesis de SFC es multifactorial e implica tanto factores del hospedador como ambientales (Devanur y Kerr 2006).

En una revisión reciente de noviembre de 2007, que describe las prioridades en la investigación actual de SFC, se resalta la necesidad urgente de dilucidar la patogénesis (Kerr JR et al., 2007, *J Clin Pathol* 60:113-6).

- 25 Muchos pacientes que padecen SFC tienen antecedentes de infección viral aguda que precede al desarrollo de la fatiga. Aunque los datos de las investigaciones muestran indicios de la activación del sistema inmunitario, los mecanismos de la enfermedad siguen siendo desconocidos. Se formó un grupo de estudio colaborativo en 2001 para dilucidar los mecanismos moleculares de SFC, con el objetivo de desarrollar un ensayo de diagnóstico, y también para guiar en el desarrollo de un tratamiento más específico (Devanur LD, Kerr JR. 2006, *J Clin Virol* 37:139-50).

- 30 Se han llevado a cabo varios estudios de expresión génica en SFC, lo que indica que hay alteraciones genéticas específicas pero complejas de acuerdo con una disfunción de la respuesta inmunitaria y de los mecanismos de defensa. Un estudio con micromatrices demostró una expresión diferencial de 16 genes en SFC, lo que sugiere la activación de células T y una alteración de la función neuronal y mitocondrial (Kaushik N, et al., 2005, *J Clin Pathol* 58:826-32). Otro estudio con micromatrices mediante el uso de muestras en serie de ARN total de células mononucleares de sangre periférica, de pacientes que desarrollaron SFC tras una infección por el virus de Epstein Barr (EBV) y también de sujetos con infección por EBV sin desarrollo de fatiga, concluyó que se desregularon varios genes que afectaban a la función mitocondrial y al ciclo celular (Vernon SD, et al., 2006, *BMC Infect Dis* 6:15). Otro estudio de la expresión génica en SFC propuso alteraciones de genes que responden al ejercicio, que incluyen varios implicados en el transporte de membrana y los canales iónicos (Whistler T, et al., 2005, *BMC Physiol* 5:5). Recientemente, un análisis de redes de genes en SFC reveló siete subtipos genómicos diferentes con diferencias en la presentación clínica y la gravedad (Kerr J, et al., 2007, *J Clin Pathol*). Otros diversos estudios han abordado la expresión génica global en SFC (Fang H, et. al., 2006, *Pharmacogenomics* 7:429-40; Whistler T, et al., 2003, *J Transl Med* 1:10).

- 45 Los datos de expresión génica no son concluyentes, pero sugieren que hay alteraciones de la expresión génica en SFC que representan diversas funciones celulares, y pueden indicar que la enfermedad tiene una patogénesis heterogénea.

- 50 Un tema predominante en la investigación de SFC ha sido la desregulación inmunitaria sostenida, tras estímulos exógenos agudos tales como una infección viral. Entre los patógenos microbianos que se ha informado que están asociados a SFC están el virus de Epstein-Barr (Lerner AM, et al., 2004, *In Vivo* 18:101-6), enterovirus (Chia JK, Chia AY. 2007, *J Clin Pathol*), parvovirus B19 (Matano S, et al., 2003, *Intern Med* 42:903-5), citomegalovirus (Lerner AM, et al., 2002, *In Vivo* 16:153-9), herpesvirus humano tipo 6 (Chapenko S, et al., 2006, *J Clin Virol* 37 Supl. 1:S47-51; Komaroff AL. 2006, *J Clin Virol* 37 Supl. 1:S39-46), *Chlamydia pneumoniae* (Nicolson GL, et al., 2003, *Apmis* 111:557-66). Sin embargo, los datos no son coherentes (Soto NE, Straus SE., 2000, *Herpes* 7:46-50).

- 55 Un estudio reciente del síndrome de fatiga postinfectivo no halló diferencias en la producción de citocinas ex vivo a lo

largo de un periodo de 12 meses, en comparación con los controles que se recuperaron rápidamente tras la infección (Vollmer-Conna U, et al., 2007, *Clin Infect Dis* 45:732-5). Otros sostienen que, a pesar de los indicios de la activación inmunitaria, como se demuestra por el número incrementado de células T activadas y los niveles elevados de citocinas, los pacientes de SFC pueden tener una función reducida de las células inmunitarias, con una citotoxicidad baja de las células NK y deficiencias de inmunoglobulinas (Patarca R. 2001, *Ann N Y Acad Sci* 933:185-200).

Otros informaron de un número elevado de linfocitos B circulantes, subgrupos de células NK alteradas también con una expresión incrementada de moléculas de adhesión, en comparación con los controles (Tirelli U, et al., 1994, *Scand J Immunol* 40:601-8), mientras otro estudio mostró células NK CD56+ reducidas, y linfocitos T CD4+ y CD8+ reducidos en pacientes de SFC (Racciatti D, et al., 2004, *Int J Immunopathol Pharmacol* 17:57-62). Además, se descubrió que las células T y NK de pacientes de SFC expresaron niveles inferiores de la proteína perforina de los gránulos intracelulares, lo que indica una capacidad reducida de mediar en la citotoxicidad.

Un estudio mostró varias anomalías en los marcadores de laboratorio asociados a la función inmunitaria en pacientes de SFC (Klimas NG, et al., 1990, *J Clin Microbiol* 28:1403-10). El resultado más coherente fue una citotoxicidad baja de células NK, pero también un incremento de las células T CD8+, un número elevado de células B CD20+, y un incremento del subgrupo de células B que coexpresan CD20 y CD5 (Klimas et al 1990). Estos datos apoyados hasta cierto punto por un estudio que informó de la expansión de linfocitos T citotóxicos CD8+ activados, junto con una disminución notable de la actividad de células NK, en pacientes de SFC (Barker E, et al., 1994, *Clin Infect Dis* 18 Suppl. 1:S136-41).

Un estudio reciente que comparó pacientes de SFC y controles informó de la expresión disminuida de CD69 en células T y células NK tras la estimulación mitogénica *in vitro*, lo que indica un trastorno de la activación temprana de la inmunidad celular mediada por estas células (Mihaylova I, et al., 2007, *Neuro Endocrinol Lett* 28:477-83).

Sin embargo, los datos sobre la desregulación inmunitaria en SFC no son coherentes, y un estudio que comparó subgrupos de linfocitos en pacientes de SFC con los de pacientes con depresión, esclerosis múltiple y controles sanos, no halló diferencias en los subgrupos de células T, B, o NK (Robertson MJ, et al., 2005, *Clin Exp Immunol* 141:326-32). De forma similar, una revisión de la inmunología en SFC concluyó que los estudios llevados a cabo en el campo de la investigación tuvieron una calidad variable, y que no se pudo identificar un patrón coherente de anomalías inmunológicas (Lyall M, et al., 2003, *J Psychosom Res* 55:79-90).

Junto con las hipótesis de la desregulación inmunitaria en SFC, se ha propuesto la autoinmunidad hacia neuropéptidos vasoactivos endógenos como mecanismo para la enfermedad (Staines DR., 2005, *Med Hypotheses* 64:539-42), sin embargo no está apoyado por datos científicos. El autor también ha propuesto mecanismos similares en la etiología de la fibromialgia, esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, y síndrome de muerte súbita del recién nacido, planteando la hipótesis de que la autoinmunidad hacia los neuropéptidos vasoactivos que actúan como hormonas, neurotransmisores, inmunomoduladores y factores neurotróficos puede explicar los cuadros clínicos complejos de estas enfermedades. Sin embargo, no se han documentado autoanticuerpos hacia estos neuropéptidos en SFC.

Un estudio investigó la presencia de anticuerpos circulantes anti-músculo y anti-SNC en pacientes de SFC y controles, sin detectar anticuerpos patógenos. Otro informe de autoanticuerpos antinucleares en SFC concluyó que no hubo asociación (Skowera A, et al., 2002, *Clin Exp Immunol* 129:354-8), mientras otro que investigó los autoanticuerpos comunes y los anticuerpos hacia antígenos específicos de neuronas mostró tasas mayores de anticuerpos hacia la proteína 2 asociada a microtúbulos y ssADN en SFC (Vernon SD, Reeves WC. 2005, *J Autoimmune Dis* 2:5). Un estudio individual mostró la presencia de autoanticuerpos hacia un receptor colinérgico muscarínico en un subgrupo de pacientes de SFC (Tanaka S, et al., 2003, *Int J Mol Med* 12:225-30), y se informaron niveles mayores de autoanticuerpos hacia antígenos celulares insolubles en SFC en comparación con los controles (von Mikeecz A., et al., 1997, *Arthritis Rheum* 40: 295-305).

Sin embargo, no hay pruebas directas con datos coherentes de la presencia de autoanticuerpos patógenos, o de una autoinmunidad mediada por linfocitos T. Ninguna prueba indirecta ha recreado la enfermedad de SFC en un modelo animal mediante inmunización con antígenos análogos a (supuestos) autoantígenos humanos.

El SFC no se define actualmente como una enfermedad autoinmunitaria, y un protocolo reciente de una revisión Cochrane del tratamiento farmacológico de SFC indica que la etiología es desconocida. (Rawson KM, et al., 2007. *Pharmacological treatments for chronic fatigue syndrome in adults. (Protocol)* Base de Datos Cochrane de Revisiones Sistemáticas, ejemplar nº 4. nº de art.: CD006813.)

Otras hipótesis para la patogénesis de SFC son la disfunción de las plaquetas sanguíneas (Kennedy G, et al., 2006, *Blood Coagul Fibrinolysis* 17:89-92), las alteraciones neurológicas (Natelson BH, et al., 2005, *Clin Diagn Lab Immunol* 12:52-5), neuroendocrinas (Van Den Eede F, et al., 2007, *Neuropsychobiology* 55:112-20), metabólicas o autónomas, la disfunción de canales iónicos (Chaudhuri A, et al., 2000, *Med Hypotheses* 54:59-63), la deficiencia de zinc (Maes M, et al., 2006, *J Affect Disord* 90:141-7), la exposición a toxinas o vacunaciones anteriores (Appel S, et al., 2007, *Autoimmunity* 40:48-53). Otros se han enfocado en una respuesta anormal al ejercicio con una

desregulación inmunitaria intracelular como posible mecanismo en la patogénesis de SFC (Nijs J, et al., 2004, *Med Hypotheses* 62:759-65). Además, el deterioro post-infeccioso de la capacidad de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 y n-6 se ha propuesto como factor importante en la patofisiología de SFC (Puri BK. 2007, *J Clin Pathol* 60:122-4).

- 5 Por lo tanto, las revisiones recientes sobre SFC en revistas de renombre indican que actualmente la enfermedad es de causa desconocida (Hampton T. 2006, *Jama* 296:2915; Hooper M. 2007, *J Clin Pathol* 60:466-71; Prins JB, et al., 2006, *Lancet* 367:346-55). Así, no ha surgido una imagen coherente para la etiología y patogénesis de SFC.

TRATAMIENTO ACTUAL DE SFC

- 10 Debido a la carencia de conocimiento sobre la patogénesis exacta, y sin un mecanismo causal conocido, no existe un tratamiento específico estándar actual para SFC. Una revisión sistemática concluyó que SFC debería estar asociada a un "modelo biopsicosocial" con énfasis en la rehabilitación muscular progresiva, combinada con un tratamiento conductual y cognitivo (Maquet et al, 2006, *Ann Readapt Med Phys* 49:337-47, 418-27).

La etiología desconocida de SFC es probablemente la razón de los sorprendentemente pocos estudios llevados a cabo que evalúan una terapia basada en una hipótesis biológica.

- 15 Como la mayoría de pruebas sugiere una desregulación del sistema inmunitario, quizás precipitada por un estímulo exógeno, dos estudios han evaluado el uso de gammaglobulina intravenosa para SFC. Uno fue un caso clínico de tres pacientes con SFC tras una infección aguda por parvovirus B19, tratados con inmunoglobulina intravenosa durante 5 días, con una mejora de los síntomas clínicos y la resolución de la desregulación de citocinas (Kerr et al, 2003., *Clin Infect Dis* 36:e100-6). En un estudio aleatorizado con doble enmascaramiento, controlado con placebo, de 71 adolescentes con SFC, se administraron tres infusiones de gammaglobulina con una separación de un mes, con una mejora funcional del grupo tratado con gammaglobulina en el seguimiento de seis meses con una duración media de 18 meses. En los primeros seis meses del ensayo, el grupo de placebo y el grupo tratado con gammaglobulina informaron de una mejora (Rowe 1997, *J Psychiatr Res* 31:133-47).

- 25 En un estudio piloto informado en forma de resumen (Lamprecht 2001, Meeting of the American association of chronic fatigue syndrome (AACFS), Seattle) se administró etanercept (Enbrel, es decir, proteína de fusión Fc-receptor p75 de factor de necrosis tumoral humano, que es un receptor de TNF competitivo soluble que actúa inhibiendo la respuesta celular mediada por TNF) a seis pacientes con SFC, y se informó de un beneficio clínico.

- 30 Entre otras estrategias terapéuticas, se usó valganciclovir para tratar a 12 pacientes con fatiga de larga duración y títulos elevados de anticuerpos hacia el virus de Epstein-Barr o el herpes virus 6 humano, y nueve tuvieron una mejora de los síntomas, sin embargo con incertidumbre sobre si los efectos estuvieron mediados por un efecto antiviral o por la inmunomodulación (Kogelnik AM, 2006, *J Clin Virol* 37 Supl. 1:S33-8). El tratamiento con azitromicina, un antibiótico con propiedades de inmunomodulación, proporcionó una mejora en el 59 % de 99 pacientes de SFC (Vermeulen & Scholte 2006, *J Transl Med* 4:34).

- 35 En una revisión reciente de las prioridades en la investigación actual de SFC (Kerr et al 2007, *J Clin Pathol* 60:113-6), se fomenta que los estudios nuevos se centren en la comprensión de la patogénesis molecular de la enfermedad, para ensayar biomarcadores útiles y para ayudar en el desarrollo de un tratamiento específico. Hay disponibles diversas técnicas moleculares y se han usado para este fin, que incluyen los análisis de la expresión génica global mediante el uso de micromatrices.

40 RITUXIMAB COMO EJEMPLO DE ANTICUERPOS DE DISMINUCIÓN DE CÉLULAS B EN EL LINFOMA DE CÉLULAS B Y LA AUTOINMUNIDAD

- 45 Rituximab (Mabthera, RITUXAN®) es un anticuerpo monoclonal dirigido hacia un epítipo de la porción extracelular de la molécula transmembrana CD20. El anticuerpo es una molécula quimérica humana-de ratón en la que la parte del fragmento de unión al antígeno (Fab) es de ratón y la parte Fc es humana. La proteína CD20 se expresa en los linfocitos B, pero no en células madre o en las células plasmáticas maduras. CD20 también se expresa en la gran mayoría de linfomas de células B. CD20 está implicado en la regulación de la conductancia de calcio transmembrana y la progresión del ciclo celular, pero se desconoce la función exacta (Janas et al 2005, *Biochem Soc Symp*:165-75). Tras la unión de Rituximab a CD20, se media una destrucción de células inmunológicas a través de la unión del complemento a la parte Fc con la activación de la cascada del complemento, y además a través de la activación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Glennie et al 2007, *Mol Immunol* 44:3823-37).

- 50 La molécula no se interioriza o desprende de la membrana plasmática tras la unión de Rituximab, lo que permite que el anticuerpo monoclonal persista sobre la superficie celular para prolongar el ataque inmunológico.

- 55 El papel de Rituximab en el tratamiento de los linfomas de células B ha crecido rápidamente. La inmunoterapia mediante el uso de Rituximab en combinación con la quimioterapia, o la monoterapia con Rituximab en linfomas poco activos, son actualmente los tratamientos de referencia, y han mejorado la supervivencia total en la mayoría de tipos habituales de linfomas de células B agresivos (linfoma difuso de células B grandes), tanto en ancianos (Coiffier et al 2002, *N Engl J Med* 346:235-42) como en pacientes más jóvenes (Pfreundschuh et

al 2006, *Lancet Oncol* 7:379-91), y también en la mayoría de los linfomas poco activos más habituales (linfoma folicular) (Marcus et al 2005, *Blood* 105:1417-23). En pacientes seleccionados con linfoma folicular, también se usa Rituximab como tratamiento de mantenimiento tras la terapia de inducción, con infusiones cada tres meses durante dos años, que muestran una supervivencia total mejorada (van Oers et al 2006, *Blood* 108:3295-301).

- 5 En los últimos años, se demostró que Rituximab también es un tratamiento eficaz en las enfermedades autoinmunitarias, en las que la disminución de células B está asociada a menudo con una mejora clínica, p.ej. en artritis reumatoide (Dass et al 2006, *Expert Opin Pharmacother* 7:2559-70). La lista de diferentes enfermedades autoinmunitarias en las que Rituximab tiene un papel terapéutico está creciendo (Sanz et al 2007, *Front Biosci* 12:2546-67). Para la futura selección como objetivo y disminución de células B, será importante el desarrollo de anticuerpos hacia subgrupos específicos de células B (Dorner & Lipsky 2007, *Expert Opin Biol Ther* 7:1287-99).

El anticuerpo de rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano modificado genéticamente dirigido hacia el antígeno CD20. Rituximab es el anticuerpo denominado "C2B8" en la patente de EE.UU. nº 5.736.137. RITUXAN® está indicado para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin de células B positivas para CD20, de grado bajo o folicular, recidivante o resistente. El mecanismo in vitro de los estudios de acción ha demostrado que RITUXAN® se une al complemento humano y lisa líneas de células B linfoides por medio de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (Reff et al. *Blood* 83(2):435-445 (1994)). Además, tiene una actividad significativa en ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Más recientemente, se ha demostrado que RITUXAN® tiene efectos antiproliferativos en ensayos de incorporación de timidina tritiada y para inducir la apoptosis directamente, mientras otros anticuerpos anti-CD19 y CD20 no los tienen (Maloney et al *Blood* 88(10):637a (1996)). También se ha observado experimentalmente la sinergia entre RITUXAN® y las quimioterapias y toxinas. En particular, RITUXAN® sensibiliza líneas celulares de linfoma de células B humanas resistentes a fármacos hacia los efectos citotóxicos de doxorubicina, CDDP, VP-16, toxina de la difteria y ricina (Demidem et al *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12(3):177-186 (1997)). Los estudios preclínicos in vivo han demostrado que RITUXAN® disminuye las células B de la sangre periférica, nódulos linfáticos, y médula ósea de monos cinomolgos, presumiblemente por medio de procesos mediados por el complemento y células (Reff et al. *Blood* 83(2):435-445 (1994)). Las patentes y publicaciones de patentes que se refieren a los anticuerpos hacia CD20 incluyen las patentes de EE.UU. nºs 5.776.456, 5.736.137, 5.843.439, 6.399.061, y 6.682.734, así como las sol. de patentes de EE.UU. nºs US 2002/0197255A1, US 2003/0021781A1, US 2003/0082172 A1, US 2003/0095963 A1, US 2003/0147885 A1 (Anderson et al); patente de EE.UU. nº 6.455.043B1 y el documento WO00/09160 (Grillo-Lopez, A.); WO00/27428 (Grillo-Lopez y White); WO00/27433 (Grillo-Lopez y Leonard); WO00/44788 (Braslawsky et al); WO01/10462 (Rastetter, W.); WO01/10461 (Rastetter y White); WO01/10460 (White y Grillo-Lopez); US2001/0018041A1, US2003/0180292A1, WO01/34194 (Hanna y Hariharan); sol. de EE.UU. nº US2002/0006404 y WO02/04021 (Hanna y Hariharan); sol. de EE.UU. nº US2002/0012665 A1 y WO01/74388 (Hanna, N.); sol. de EE.UU. nº US 2002/0058029 A1 (Hanna, N.); sol. de EE.UU. nº US 2003/0103971 A1 (Hariharan y Hanna); sol. de EE.UU. nº US2002/0009444A1, y WO01/80884 (Grillo-Lopez, A); WO01/97858 (White, C); sol. de EE.UU. nº US2002/0128488A1 y WO02/34790 (Reff, M.); WO02/060955 (Braslawsky et al.); WO2/096948 (Braslawsky et al.); WO02/079255 (Reff y Davies); patente de EE.UU. Nº 6.171.586B1, y WO98/56418 (Lam et al); WO98/58964 (Raju, S.); WO99/22764 (Raju, S.); WO99/51642, patente de EE.UU. nº 6.194.551B1, patente de EE.UU. nº 6.242.195B1, patente de EE.UU. nº 6.528.624B1 y patente de EE.UU. nº 6.538.124 (Idusogie et al); WO00/42072 (Presta, L.); WO00/67796 (Curd et al.); WO01/03734 (Grillo-Lopez et al.); sol. de EE.UU. nº US 2002/0004587A1 y WO01/77342 (Miller y Presta); sol. de EE.UU. nº US2002/0197256 (Grewal, L); sol. de EE.UU. nº US 2003/0157108 A1 (Presta, L.); patentes de EE.UU. nºs 6.565.827B1, 6.090.365B1, 6.287.537B1, 6.015.542, 5.843.398, y 5.595.721, (Kaminski et al); patentes de EE.UU. nºs 5.500.362, 5.677.180, 5.721.108, 6.120.767, 6.652.852B1 (Robinson et al); pat. de EE.UU. nº 6.410.391B1 (Raubitschek et al); patente de EE.UU. nº 6.224.866B1 y WO00/20864 (Barbera-Guillem, E.); WO01/13945 (Barbera-Guillem, E.); WO00/67795 (Goldenberg); sol. de EE.UU. nº US 2003/0133930 A1 y WO00/74718 (Goldenberg y Hansen); WO00/76542 (Golay et al.); WO01/72333 (Wolin y Rosenblatt); patente de EE.UU. nº 6.368.596B1 (Ghetie et al); patente de EE.UU. nº 6.306.393 y sol. de EE.UU. nº US2002/0041847 A1, (Goldenberg, D.); sol. de EE.UU. nº US2003/0026801A1 (Weiner y Hartmann); WO02/102312 (Engleman, E.); solicitud de patente de EE.UU. nº 2003/0068664 (Albitar et al); WO03/002607 (Leung, S.); WO 03/049694, US2002/0009427A1, y US 2003/0185796 A1 (Wolin et al); WO03/061694 (Sing y Siegal); US 2003/0219818 A1 (Bohen et al); US 2003/0219433 A1 y WO 03/068821 (Hansen et al.); US2003/0219818A1 (Bohen et al); US2002/0136719A1 (Shenoy et al); WO2004/032828 (Wahl et al), cada uno de los cuales se incorpora expresamente en la presente memoria como referencia. Véase, además, la patente de EE.UU. nº 5.849.898 y la sol. EP nº 330.191 (Seed et al); patente de EE.UU. nº 4.861.579 y EP332.865A2 (Meyer y Weiss); USP 4.861.579 (Meyer et al); WO95/03770 (Bhat et al); US 2003/0219433 A1 (Hansen et al).

PERFIL DE SEGURIDAD DE RITUXIMAB

El perfil de seguridad de Rituximab en el tratamiento de linfomas de células B es muy conocido, y se basa en la experiencia de una base de datos de 370.000 pacientes (Kavanaugh 2006, *J Rheumatol Suppl.* 77:18-23). En el tratamiento de linfomas, el efecto secundario más habitual es una reacción leve a moderada durante la primera infusión, provocada por la liberación de citocinas principalmente en pacientes con una masa tumoral inicial elevada (Solal-Celigny 2006, *Leuk Res* 30 Supl. 1:S16-21). Se pueden observar reacciones alérgicas durante la infusión, debidas a la naturaleza proteica de la molécula de Rituximab.

Una preocupación con todas las terapias dirigidas a las células B son los efectos previstos sobre la inmunidad humoral. Con un tratamiento prolongado, y en particular con un tratamiento de mantenimiento, es decir, infusiones cada tres meses durante dos años (tras una terapia de inducción con quizás 6-8 infusiones de Rituximab cada tres semanas), la disminución de células B es más pronunciada, y la mayoría de pacientes tienen hipogammaglobulinemia. Sin embargo, los niveles bajos de inmunoglobulinas y la disminución de células B no parecen tener un impacto importante sobre el riesgo clínico de infecciones.

Un efecto secundario potencialmente grave del uso de Rituximab es el desarrollo de enfermedad pulmonar intersticial. Esto es una complicación potencialmente mortal, pero muy infrecuente, con solamente 16 casos informados en la bibliografía (Wagner et al 2007, Am J Hematol 82:916-9).

Los problemas de seguridad relacionados con el tratamiento con Rituximab en las enfermedades autoinmunitarias crónicas se utilizan en los estudios clínicos (Edwards et al 2006, Best Pract Res Clin Rheumatol 20:915-28), y con menos tiempo para el seguimiento hasta ahora. La seguridad a largo plazo, por lo tanto, sigue sin clarificarse, especialmente cuando se va a administrar Rituximab una vez o dos veces al año durante muchos años. Para los pacientes con enfermedades autoinmunitarias, a menudo se administran infusiones de Rituximab dos veces (con una separación de unas cuantas semanas), y esta secuencia se puede repetir tras 6-12 meses, es decir, considerablemente menos dosis que en los pacientes de linfoma (a corto plazo).

Actualmente se usa en los ensayos clínicos la siguiente generación de anticuerpos anti-CD20, capaces de disminuir las células B, y presumiblemente se usarán en la práctica clínica en los siguientes años. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD20 completamente humanizado Ofatumomab de Glaxo-Smith-Kline está actualmente en ensayos clínicos para la recidiva de linfomas de células B. Se prevé que el anticuerpo anti-CD20 completamente humanizado de la siguiente generación dé como resultado una disminución aún más potente de células B, y debería ser, por lo tanto, aún más eficaz que Rituximab en el tratamiento de los linfomas de células B. Además, se prevé que exhiban menos efectos secundarios que los descritos para Rituximab.

Se han propuesto diversos regímenes para el tratamiento del síndrome de fatiga crónica. Por ejemplo, en el documento US 2007/025375, se proporciona un esquema de tratamiento complejo para el tratamiento de pacientes que padecen síndrome de fatiga crónica. Dicha región comprende entre otros la administración de milnacipran.

En vista de la etiología desconocida de SFC/EM, existe una demanda continuada de compuestos útiles para un tratamiento eficaz de SFC.

Breve descripción de la presente invención

La presente invención se dirige a proporcionar compuestos nuevos aplicables en el tratamiento del síndrome de fatiga crónica. En particular, los inventores han descubierto que los agentes de disminución de células B, los anticuerpos anti-CD20, son útiles en el tratamiento del síndrome de fatiga crónica.

Preferiblemente, los anticuerpos anti-CD20 o los fragmentos de anticuerpos de unión a CD20 de los mismos son anticuerpos monoclonales. De manera especialmente preferida, dichos anticuerpos monoclonales son anticuerpos humanizados cuando se administran a sujetos humanos. También se contempla en la presente invención que los anticuerpos pueden estar presentes como fragmentos de anticuerpos que se pueden producir p.ej. de manera recombinante mediante ingeniería genética.

En un aspecto adicional, se describen métodos para el tratamiento del síndrome de fatiga crónica/encefalomielitis miálgica que comprenden la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de disminución de células B, un anticuerpo anti-CD20 de disminución de células B o un fragmento de anticuerpo de unión a CD20 a un sujeto afectado por dicha enfermedad o trastorno.

Breve descripción del dibujo

Figura 1:

La Figura 1 muestra gráficamente el desarrollo de los síntomas de SFC para tres pacientes a lo largo de un periodo de un año resumiendo las diferentes intervenciones, concretamente Rituximab® o Metotrexato (M). La puntuación de los síntomas de SFC está en un intervalo de 0 a 10, en el que 0 significa sin síntomas, mientras 10 se refiere a síntomas muy graves de SFC.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a agentes de disminución de células B, anticuerpos anti-CD20 o fragmentos de anticuerpos de unión a CD20 de los mismos, para el uso en el tratamiento del síndrome de fatiga crónica/encefalomielitis miálgica.

En el contexto de la presente invención, las expresiones "síndrome de fatiga crónica (SFC)" y "encefalomielitis miálgica (EM)" se usan de manera sinónima.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "disminución de células B" o "actividad de disminución de células B" se refiere a la capacidad de la entidad, una entidad química o biológica, p.ej. un anticuerpo, de reducir los niveles de células B circulantes en un sujeto. La disminución de células B se puede conseguir, p.ej., induciendo la muerte celular o reduciendo la proliferación.

- 5 El antígeno "CD20", o "CD20", es una fosfoproteína no glicosilada de alrededor de 35 kDa, hallada sobre la superficie de más del 90% de células B de sangre periférica u órganos linfoides en seres humanos. CD20 está presente en las células B normales y también en las células B malignas, pero no se expresa en las células madre. Otros nombres para CD20 en la bibliografía incluyen "antígeno restringido a linfocitos B" y "Bp35". El antígeno CD20 se describe en Clark et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:1766 (1985), por ejemplo. El término CD20 incluye las moléculas equivalentes de otras especies distintas del ser humano. Recientemente, se ha informado de la expresión a nivel bajo de CD20 en un subgrupo de células T y células NK.

Una "célula B" es un linfocito que madura en la médula ósea, e incluye una célula B virgen, célula B de memoria, o célula B efectora (células plasmáticas).

- 15 Un "antagonista" o "agente de disminución de células B" que se usa de manera intercambiable en la presente memoria es una molécula que, p.ej. tras la unión a un marcador de la superficie de células B, CD20 en las células B, destruye o disminuye las células B en un mamífero y/o interfiere con una o más funciones de las células B, p.ej. reduciendo o previniendo una respuesta humoral generada por la célula B. El antagonista o agente de disminución de células B según la presente invención es capaz de disminuir las células B (es decir, reducir los niveles de células B circulantes) en un mamífero tratado con él. Tal disminución se puede conseguir por medio de diversos mecanismos tales como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la inhibición de la proliferación de células B y/o la inducción de la muerte de células B (p.ej. por medio de apoptosis). Los antagonistas incluidos dentro del alcance de la presente invención incluyen los anticuerpos, sintéticos o de péptidos de secuencia nativa y los antagonistas de moléculas pequeñas que se unen al marcador de la superficie de células B, opcionalmente conjugados o fusionados con un agente citotóxico.
- 20 Un antagonista es un anticuerpo hacia CD20 o un fragmento de anticuerpo de unión a CD20.

En la medida en que otras células distintas de las células B expresan el antígeno CD20 como un subgrupo de células T o células NK, estas células también disminuyen con el agente de disminución de células B, que es un agente que actúa por medio de CD20.

- 30 Los antagonistas que "inducen la apoptosis" son aquellos que inducen la muerte celular programada, p.ej. de una célula B, tal como se determina mediante los ensayos de apoptosis habituales, tal como la unión de anexina V, la fragmentación de ADN, el encogimiento celular, la dilatación del retículo endoplásmico, la fragmentación celular, y/o la formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos).

- 35 El término "anticuerpo" se usa en la presente memoria en el sentido más amplio, y de manera específica cubre los anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p.ej. anticuerpos biespecíficos) formados por al menos dos anticuerpos intactos, y los fragmentos de anticuerpos con tal de que exhiban la actividad biológica deseada.

En una realización preferida, el anticuerpo útil para el tratamiento de SFC es un fragmento de anticuerpo de unión a CD20 de disminución de células B.

- 40 Los "fragmentos de anticuerpos de unión a CD20" comprenden una porción de un anticuerpo intacto que comprende la región de unión al antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Para los fines de la presente memoria, un "anticuerpo intacto" es uno que comprende dominios variables pesados y ligeros, así como una región Fc.

- 45 Los "anticuerpos nativos" son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras el número de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera tiene además puentes disulfuro intracatenarios espaciados con regularidad. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V11) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V1) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

- 55 El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos, y se usan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular a su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan

regiones estructurales (FRs). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FRs, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectados mediante tres regiones hipervariables, que forman giros que conectan, y en ciertos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen en estrecha proximidad entre sí mediante las FRs y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento del antígeno y de unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y de la cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo la especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable simple (o mitad de un Fv que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad inferior a la del sitio de unión completo. El fragmento Fab contiene además el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos cuantos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente memoria de Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes alberga(n) al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron en un principio como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos. Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente diferentes, denominados kappa (K) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA5, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), p.ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas. Los fragmentos de anticuerpos "Fv de cadena simple" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica simple. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase Plückerthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V11) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V1) en la misma cadena polipeptídica (VH - V1). Mediante el uso de un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en el documento EP 404097; WO 93/11161; y Hollinger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por las posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, y tales variantes están presentes en general en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen en general diferentes anticuerpos dirigidos hacia diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige hacia un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo tal como se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe considerar que requiera la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención se pueden producir mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al, *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (véase, p.ej., la patente de EE.UU. n° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" se pueden aislar también de bibliotecas de anticuerpos en fagos mediante el uso de las técnicas descritas en Clackson et al, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al, *J. Mol Biol*, 222:581-597 (1991), por ejemplo. Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen de manera específica anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en las que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que

pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de tales anticuerpos, con tal de que exhiban la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. n° 4.816.567; Morrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria incluyen los anticuerpos "primatizados", que comprenden secuencias de unión al antígeno de dominios variables derivadas de un primate no humano (p.ej. monos del Viejo Mundo, tales como babuino, mono rhesus o cinomolgo) y las secuencias de las regiones constantes humanas (pat. de EE.UU. n° 5.693.780). Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p.ej., murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En ciertos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se hallan en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para perfeccionar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y en general dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los giros hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FRs son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, excepto por la(s) sustitución(es) en FR, como se indicó anteriormente. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, en general la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones et al, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). La expresión "región hipervariable", cuando se usa en la presente memoria, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende los residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (p.ej., los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un "giro hipervariable" (p.ej., los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los residuos "estructurales" o "FR" son los residuos de los dominios variables distintos de los residuos de la región hipervariable, tal como se define en la presente memoria. Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo (como se define en la presente memoria) que no está conjugado a una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico o radiomarcador. Los ejemplos de anticuerpos que se unen al antígeno CD20 incluyen: "C2B8" que actualmente se denomina "Rituximab" ("RITUXAN®") (patente de EE.UU. n° 5.736.137, incorporada expresamente en la presente memoria como referencia); el anticuerpo murino marcado con itrio-[90] 2B8 denominado "Y2B8" o "Ibritumomab Tiuxetan" ZEVALIN® (patente de EE.UU. n° 5.736.137, incorporada expresamente en la presente memoria como referencia); IgG2a murino "BI", también denominado "Tositumomab", opcionalmente marcado con 131I para generar el anticuerpo "131I-BI" (yodo 131I tositumomab, BEXXAR™) (patente de EE.UU. n° 5.595.721, incorporada expresamente en la presente memoria como referencia); el anticuerpo monoclonal murino "1F5" (Press et al. Blood 69(2):584-591 (1987) y las variantes del mismo que incluyen 1F5 "modificado estructuralmente" o humanizado (documento WO03/002607, Leung, S.; depósito de la ATCC HB-96450); el anticuerpo 2H7 murino y 2H7 quimérico (patente de EE.UU. n° 5.677.180, incorporada expresamente en la presente memoria como referencia); 2H7 humanizado; Ofatumumab, una IgG1 completamente humanizada hacia un epítipo nuevo en CD20 huMax-CD20 (Genmab, Dinamarca; documento WO2004/035607); AME-133 (Applied Molecular Evolution); el anticuerpo A20 o las variantes del mismo, tales como el anticuerpo A20 quimérico o humanizado (cA20, hA20, respectivamente) (documento US 2003/0219433, Immunomedics); y los anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1 B3, B-CI o NU-B2 disponibles del International Leukocyte Typing Workshop (Valentine et al, En: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)). Además, los anticuerpos adecuados son, p.ej., Ocrelizumab, un anticuerpo anti-CD20 completamente humanizado de Biogen Idec/Genentech/Roche, el anticuerpo GA101, un anticuerpo anti-CD20 humanizado de tercera generación de Biogen Idec/Genentech/Roche.

Además, BLX-301 de Biolex Therapeutics, un anticuerpo anti-CD20 humanizado con una glicosilación optimizada o Veltuzumab (hA20) de Immunomedics o DXL625 de Inexus Biotechnology, son anticuerpos anti-CD20 humanizados que son adecuados.

Las expresiones "rituximab" o "RITUXAN®" o "mabthera" se refieren en la presente memoria a los anticuerpos monoclonales quiméricos murinos/humanos genéticamente modificados dirigidos hacia el antígeno CD20 y denominados "C2B8" en la patente de EE.UU. n° 5.736.137, incorporados expresamente en la presente memoria como referencia, lo que incluye los fragmentos de los mismos que conservan la capacidad de unirse a CD20. Simplemente para los fines de la presente memoria y a menos que se indique de otra manera, "2H7 humanizado" se refiere a un anticuerpo humanizado que se une a CD20 humano, o a un fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que el anticuerpo es eficaz para disminuir las células B de primate in vivo.

La expresión "cantidad eficaz" del agente de disminución de células B o antagonista del anticuerpo anti-CD20 o fragmento de anticuerpo de unión a CD20 del mismo, se refiere a una cantidad del agente de disminución de células B o antagonista que es eficaz para tratar el SFC. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD20 para el tratamiento del

síndrome de fatiga crónica/encefalomielitis miálgica se administra en el intervalo de 10 mg a 5000 mg por dosis. Por ejemplo, la dosis puede estar en el intervalo de 100 a 1000 mg/m², en particular, 500 mg/m² en forma de una infusión única para Rituximab. En general, la dosis para Metotrexato está en el intervalo de 5 mg a 30 mg por semana.

- 5 En una realización, se usa una combinación de un anticuerpo anti-CD20 y que representa una entidad biológica de un agente de disminución de células B y Metotrexato, que representa una entidad química de un agente de disminución de células B, para tratar el síndrome de fatiga crónica o la encefalomielitis miálgica. La administración de estas entidades se puede llevar a cabo de manera simultánea, por separado o de manera secuencial. Por ejemplo, en un primer régimen, se administra el anticuerpo o Metotrexato al sujeto, mientras en un segundo régimen se administra el otro agente.

10 La composición que comprende el agente de disminución de células B, el anticuerpo anti-CD20 o el fragmento de anticuerpo de unión a CD20 del mismo, se formulará, dosificará, y administrará de una manera coherente con las buenas prácticas médicas. Los factores de consideración en este contexto incluyen la etapa de la enfermedad o trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del sujeto individual, el sitio de administración del agente, el método de administración, el calendario de administración, y otros factores conocidos para los médicos de cabecera. La cantidad eficaz del agente de disminución de células B, como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo a administrar, se controlará mediante tales consideraciones. Como proposición general, la cantidad eficaz del antagonista administrado de manera parenteral por dosis estará en el intervalo de alrededor de 20 mg/m² a alrededor de 10.000 mg/m² de cuerpo del sujeto, en una o más dosis. Los regímenes de dosis ejemplares para los anticuerpos intactos incluyen 375 mg/m² semanalmente x 4; 1000 mg x 2 (p.ej. en los días 1 y 15); o 1 gramo x 3. El anticuerpo para la administración a un sujeto a una única dosis terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo es de 50 a 2000 mg/m² o múltiples dosis terapéuticamente eficaces de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a CD20 del mismo de 50 a 2000 mg/m². Como se indicó anteriormente, sin embargo, estas cantidades propuestas de anticuerpo están sometidas a un amplio criterio terapéutico. El factor clave en la selección de una dosis y calendario adecuados es el resultado obtenido, como se indicó anteriormente. El antagonista de agente de disminución de células B, como el anticuerpo, se administra mediante cualquier medio adecuado, que incluye la administración parenteral, tópica, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal, y/o intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. También se considera la administración intratecal. Además, el antagonista de agente de disminución de células B, como el anticuerpo, se puede administrar de manera adecuada mediante infusión pulsátil, p.ej., con dosis decrecientes del antagonista. Preferiblemente, la dosificación se administra mediante inyecciones intravenosas.

15 Los métodos para generar tales antagonistas de disminución de células B se describirán en la presente memoria. El antígeno a usar para la producción o el cribado de el/los antagonista(s) puede ser, p.ej., una forma soluble de CD20 o una porción del mismo, que contiene el epítipo deseado. De manera alternativa, o además, se pueden usar células que expresan CD20 en su superficie celular para generar, o cribar, el/los antagonista(s). Otras formas de CD20 útiles para generar antagonistas serán evidentes para los expertos en la técnica.

20 Aunque el antagonista es un anticuerpo como se define en reivindicación 1, en la presente memoria se contemplan antagonistas distintos de los anticuerpos. Por ejemplo, el antagonista puede comprender un antagonista de molécula pequeña. Se pueden cribar bibliotecas de moléculas pequeñas frente a CD20 para identificar una molécula pequeña que se una a ese antígeno. De manera alternativa, las moléculas pequeñas se pueden cribar en general con respecto a su actividad de disminución de células B mediante técnicas conocidas. La molécula pequeña se puede cribar adicionalmente con respecto a sus propiedades antagonistas. El antagonista también puede ser un péptido generado mediante un diseño racional o mediante expresión en fagos (véase, p.ej., el documento WO98/35036 publicado el 13 de agosto de 1998). La molécula de elección puede ser una "molécula mimética de CDR" o un análogo de anticuerpo diseñado basado en las CDRs de un anticuerpo. Aunque tales péptidos pueden ser antagonistas por sí mismos, el péptido se puede fusionar opcionalmente con un agente citotóxico para añadir o aumentar las propiedades antagonistas del péptido. A continuación se proporciona una descripción sobre las técnicas ejemplares para la producción de los antagonistas de anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención.

(i) Anticuerpos policlonales

25 Los anticuerpos policlonales se generan preferiblemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que sea inmunógena en la especie a inmunizar, p.ej., hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja mediante el uso de un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación por medio de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (por medio de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂, o R1N=C=NR, en el que R y R1 son grupos alquilo diferentes.

30 Los animales se inmunizan hacia el antígeno, conjugados inmunógenos, o derivados combinando, p.ej., 100 µg o 5 µg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo

de Freund e inyectando la disolución de manera intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde, se administra una dosis de refuerzo a los animales con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde, se extrae sangre a los animales y se ensaya en el suero el título de anticuerpos. Se administran dosis de refuerzo a los animales hasta que el título se estabiliza. Preferiblemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o por medio de un reactivo de entrecruzamiento diferente. También se pueden producir conjugados en un cultivo de células recombinantes en forma de fusiones de proteínas. Además, se usan de manera adecuada agentes agregantes tales como alumbre para aumentar la respuesta inmunitaria.

10 (ii) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por las posibles variantes que surgen durante la producción del anticuerpo monoclonal, y tales variantes están presentes en general en cantidades menores. Así, el adjetivo "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos o policlonales. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante el uso del método de hibridomas descrito por primera vez por Kohler et al, *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (patente de EE.UU. nº 4.816.567).

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencía fácilmente mediante el uso de procedimientos convencionales (p.ej., mediante el uso de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse de manera específica a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra manera una proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias del ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra et al, *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992). En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas en fagos de anticuerpos generadas mediante el uso de las técnicas descritas en McCafferty et al, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson et al, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, mediante el uso de bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (intervalo nM) mediante reordenación aleatoria de cadenas (Marks et al, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como mediante infección combinatoria y recombinación in vivo como estrategia para la construcción de bibliotecas en fagos muy grandes (Waterhouse et al, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Así, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridomas de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante con los dominios constantes de las cadenas pesadas y ligeras humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. nº 4.816.567; Morrison, et al, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o uniendo de manera covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina todo o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es una inmunoglobulina. En general, tales polipéptidos que no son una inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación con el antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con el antígeno que tiene especificidad hacia un antígeno y otro sitio de combinación con el antígeno que tiene especificidad hacia un antígeno diferente.

45 (iii) Anticuerpos humanizados

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en la técnica. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo residuos "importados", que se toman en general de un dominio variable "importado". La humanización se puede llevar a cabo básicamente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de las regiones hipervariables por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por lo tanto, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. nº 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana, en la práctica, los anticuerpos humanizados son en general anticuerpos humanos en los que ciertos residuos de las regiones hipervariables y posiblemente ciertos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos de los anticuerpos de roedores. La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usar en la producción de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado "Best-Fit", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba con respecto a la biblioteca completa de secuencias de dominios variables humanos conocidos. La secuencia humana que es la más cercana a la de roedor se acepta entonces como la región estructural (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método usa una región

estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de las cadenas ligeras o pesadas. Se puede usar la misma región estructural para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al, J. Immunol, 151:2623 (1993)). Además es importante que los anticuerpos se humanicen con la retención de una afinidad elevada hacia el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales mediante el uso de modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulinas tridimensionales están disponibles de manera habitual, y son conocidos para los expertos en la técnica. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y representan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar los residuos de FR y combinarlos a partir de las secuencias receptoras e importadas de manera que se consigue una característica deseada para el anticuerpo, tal como una afinidad incrementada por el/los antígeno(s) objetivo(s). En general, los residuos de las regiones hipervariables están implicados directamente y sustancialmente en influir en la unión al antígeno.

(iv) Anticuerpos humanos

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, actualmente es posible producir animales transgénicos (p.ej., ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos sin la producción de inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región que une las cadenas pesadas de anticuerpos (J11) en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la colección de genes de inmunoglobulinas de la línea germinal humana en tales ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, p.ej., Jakobovits et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al, Year in Immuno., 7:33 (1993); y las patentes de EE.UU. n.ºs 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807. De manera alternativa, se puede usar la tecnología de expresión en fagos (McCafferty et al, Nature 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro, a partir de repertorios de genes de dominios variables (V) de inmunoglobulinas de donantes sin inmunizar. Según esta técnica, se clonan los genes de los dominios variables V de los anticuerpos en el marco de lectura en el gen de la proteína de revestimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan en forma de fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. Así, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La expresión en fagos se puede llevar a cabo en una diversidad de formatos; para su revisión véase, p.ej., Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la expresión en fagos. Clackson et al, Nature, 352:624-628 (1991) aisló una colección diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos sin inmunizar, y se pueden aislar anticuerpos hacia una colección variada de antígenos (que incluyen auto-antígenos) básicamente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), o Griffith et al, EMBOJ. 12:725-734 (1993). Véanse, además, las patentes de EE.UU. n.ºs 5.565.332 y 5.573.905. También se pueden generar anticuerpos humanos mediante células B activadas in vitro (véanse las patentes de EE.UU. n.ºs 5.567.610 y 5.229.275).

(v) Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron por medio de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, p.ej., Morimoto et al, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) y Brennan et al, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir en la actualidad directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las bibliotecas de anticuerpos en fagos discutidas anteriormente. De manera alternativa, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH a partir de E. coli y acoplarlas químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otra aproximación, se pueden aislar fragmentos F(ab')₂ directamente a partir del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el profesional experto. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena simple (scFv). Véase el documento WO 93/16185; patente de EE.UU. n.º 5.571.894; y patente de EE.UU. n.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", p.ej., como se describió en la patente de EE.UU. 5.641.870, por ejemplo. Tales fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser mono-específicos o biespecíficos.

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los agentes de disminución de células B, como anticuerpos u otros antagonistas usados de acuerdo con la presente invención, se preparan para el almacenamiento mezclando un anticuerpo o un fragmento del mismo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables son atóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicocola, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; carbohidratos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (p.ej. complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilen glicol (PEG).

Las formulaciones ejemplares de anticuerpos anti-CD20 se describen en el documento WO98/56418, expresamente incorporado en la presente memoria como referencia. Esta publicación describe una formulación líquida multidosis que comprende 40 mg/mL de rituximab, acetato 25 mM, trehalosa 150 mM, 0,9% de alcohol bencilico, 0,02% de polisorbato 20 a pH 5,0 que tiene un tiempo de conservación mínimo de dos años de almacenamiento a 2-8 °C. Otra formulación anti-CD20 de interés comprende 10 mg/mL de rituximab en 9,0 mg/mL de cloruro sódico, 7,35 mg/mL de citrato sódico dihidrato, 0,7 mg/mL de polisorbato 80, y agua estéril para inyección, pH 6,5. Las formulaciones liofilizadas adaptadas para la administración subcutánea se describen en la pat. de EE.UU. nº 6.267.958 (Andya et al). Tales formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir con un diluyente adecuado a una concentración de proteína elevada, y la formulación reconstituida se puede administrar de manera subcutánea al mamífero a tratar en la presente memoria. También se contemplan las formas cristalizadas del anticuerpo o antagonista. Véase, por ejemplo, el documento US 2002/0136719A1.

Los ingredientes activos se pueden atrapar también en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980). Se pueden preparar preparaciones de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, y cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, p.ej. películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (pat. de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -L-glutamato de etilo, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPO™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico). Las formulaciones a usar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril.

Ejemplos

En el Departamento de Oncología y Física Médica, Hospital Universitario de Haukeland, se observó una mejora sintomática sorprendente tras la quimioterapia citotóxica en una paciente de 43 años con SFC estable (comienzo en 1997, precedido por una infección por Epstein-Barr). Desarrolló la enfermedad de Hodgkin en 2003, y se le trató con quimioterapia y radiación. Tuvo una recidiva del linfoma en 2004, y se trató con quimioterapia. Al contrario de lo esperado (los pacientes de SFC en general toleran mal todos los tipos de fármacos y estrés), la paciente experimentó una disminución notable de los síntomas de SFC durante y después de esta quimioterapia. No se interpretó que los cambios estuvieran relacionados con la actividad del linfoma, y los efectos duraron aproximadamente 5 meses después del inicio de la quimioterapia, con una recidiva gradual de síntomas similares a SFC. Además de los efectos citotóxicos, los agentes quimioterápicos también habían proporcionado un efecto inmunomodulador. Se supone que los efectos sobre los síntomas de SFC están mediados principalmente a través del fármaco Metotrexato administrado durante la quimioterapia.

Cuando se revisa la bibliografía sobre SFC en un intento de entender lo que la paciente experimentó durante y después de la quimioterapia del cáncer, la conclusión fue que la modificación del sistema inmunitario pareció una explicación probable de la mejora notable, pero transitoria, experimentada en los síntomas. Puede ser que la activación crónica de las células B observada en los pacientes de SFC sea importante para los síntomas y también para los cambios fisiológicos informados, tales como las alteraciones de la circulación sanguínea en el sistema nervioso central, y los informes sobre la infiltración de linfocitos en el tejido cerebral, las raíces de los nervios espinales o el músculo cardíaco.

Los posibles modos de acción de la disminución de células B podrían darse en varios puntos, tales como las

interacciones con el sistema de células T, por lo que se modificarían los procesos inflamatorios, e influyendo en los niveles de agentes pleiotrópicos importantes en la homeostasis inmunitaria, tales como los neuropéptidos vasoactivos. Estos tienen un amplio rango de actividades en el sistema nervioso central.

5 Teniendo en cuenta estos datos existentes, junto con la mejora inesperada de la fatiga y el dolor en la paciente de SFC tras una terapia citotóxica inmunomoduladora, se supone que la disminución de células B como concepto podría permitir el tratamiento de SFC.

10 En la actualidad, la consecución de la disminución de células B se consigue más fácilmente mediante el uso del anticuerpo anti-CD20 monoclonal Rituximab. Sin embargo, se supone que también los anticuerpos anti-CD20 de nueva generación tienen al menos un efecto similar sobre los síntomas de SFC, debido a una supuesta disminución de células B más potente alcanzada.

Paciente piloto 1:

15 Como primer paciente piloto, la mujer anteriormente mencionada recibió 500 mg/m² de Rituximab en forma de una infusión única tras informarse de la naturaleza experimental del procedimiento y de los riesgos implicados. Antes del tratamiento, tenía un SFC estable con una fatiga notable y no era capaz de trabajar fuera de casa o hacer labores domésticas. Usaba una silla de ruedas eléctrica para moverse en el exterior. Comenzando entre cinco y seis semanas tras la infusión, experimentó una mejora notable de los síntomas, con mucha menos fatiga, dolor muscular decreciente, quemazón cutánea decreciente, y cefaleas en descenso, acompañado por una necesidad decreciente de analgésicos opioides. Debido al descenso de la fatiga, pudo dar paseos largos, reanudó sus aficiones y fue capaz de hacer tareas domésticas y cuidar de sus hijos. También informó de una mejora notable de la función cognitiva, retuvo la capacidad de concentrarse, y de nuevo fue capaz de leer y, p.ej., trabajar con ordenadores. El efecto tras la primera infusión duró hasta 14 semanas tras la infusión de Rituximab, después descendió, con una recidiva gradual, pero no completa, de los síntomas de SFC.

25 Cinco meses tras la primera infusión de Rituximab, de nuevo tuvo síntomas de SFC estables e incapacitantes. Recibió una nueva infusión única de Rituximab a la misma dosis. Después de 6 semanas, experimentó de nuevo una recuperación gradual e importante de todos los síntomas de SFC (fatiga, dolor, síntomas cognitivos), con un efecto importante sobre la calidad de vida. Tras la segunda infusión (también en forma de una infusión única a una dosis baja de 500 mg/m²), el efecto terapéutico duró hasta 16 semanas, con un empeoramiento lento y gradual de los síntomas a continuación.

30 Entonces se decidió comenzar un tratamiento con Metotrexato oral a dosis bajas semanalmente a las 18 semanas tras la segunda infusión de Rituximab, comenzando con 7,5 mg por semana, e incrementando la dosis a 12,5 mg por semana durante los dos meses siguientes. Desde las 12 semanas tras el inicio de Mtx semanal, de nuevo ha experimentado una recuperación gradual y moderada de los síntomas de SFC. Actualmente ha usado Mtx durante 22 semanas, e interpreta la mejora como moderada y significativa, pero en la actualidad no tan pronunciada y rápida como tras el tratamiento con Rituximab. Sin embargo, todavía experimenta una mejora gradual de su estado. El desarrollo de los síntomas de SFC se muestra en la Figura 1.

35 Paciente piloto 2:

40 Es un hombre de 42 años, y desarrolló SFC tras una infección por Epstein-Barr hace 8 años. Tenía una fatiga notable, y no era capaz de llevar a cabo ningún trabajo desde que desarrolló la enfermedad. Se veía limitado a sentarse en una silla la mayoría de los días. Tras un ejercicio suave tenía problemas importantes de agotamiento, dolor muscular creciente y cefaleas. También tenía sensación de fiebre, sudoración y diarrea. Tenía alteraciones cognitivas graves. Aunque previamente era un ingeniero informático experimentado, era incapaz de usar un ordenador o leer de manera coherente más de 1-2 páginas de un libro.

45 Se le administró una infusión única de 500 mg/m² de Rituximab. El primer síntoma en mejorar (3 semanas tras la infusión) fue la diarrea de larga duración. Comenzando 6 semanas tras la infusión, experimentó una respuesta notable con una mejora drástica de la fatiga, el dolor, y los síntomas cognitivos y autónomos. Fue capaz de desarrollar trabajos manuales y utilizar videojuegos y leer. Tras la dosis relativamente baja (infusión única de 1000 mg), el efecto fue más notorio hasta 12 semanas, y a continuación descendió gradualmente. Él y su familia describieron la mejora clínica como significativa, y produjo un gran impacto sobre la calidad de vida de toda la familia.

50 Cinco meses tras la primera infusión de Rituximab, se le ha vuelto a tratar con dos infusiones de 1000 mg de Rituximab con una separación de dos semanas. Como tras el primer tratamiento, comenzó a recuperarse primero de la diarrea (tras 3 semanas). Después, tras 6 semanas, informó de menos síntomas cognitivos, y algunos días más tarde la fatiga comenzó a mejorar.

55 La infusión doble de Rituximab proporcionó una mejora clara de los síntomas de SFC, más notoria 16 semanas tras la infusión. A continuación, ha experimentado un incremento muy lento y gradual de los síntomas. Sin embargo, 5 meses tras la infusión, todavía tiene una respuesta clínica (todavía está mejor que antes del tratamiento) (Figura 1). En la actualidad ha iniciado un tratamiento oral semanal con Metotrexato a dosis bajas.

Paciente piloto 3:

Es una estudiante de 22 años, que desarrolló SFC tras una mononucleosis hace 7 años. Inicialmente, tuvo el cuadro clínico completo con fatiga notable, con dolor que incluía cefaleas, alteraciones cognitivas y síntomas autónomos. Durante los últimos cuatro años, sin embargo, experimentó cierta mejora, pero todavía siguió teniendo una fatiga intensa, una necesidad excesiva de sueño y diarrea. Tuvo alteraciones cognitivas moderadas y dolor muscular moderado.

Se le administró una infusión única de 500 mg/m² de Rituximab. Esta paciente también experimentó una mejora de la diarrea 3 semanas tras la infusión. Seis semanas tras la infusión, observó cierta mejora del dolor muscular. Los primeros cinco meses también tuvo una mejora ligera de la fatiga, pero transitoria y de duración más corta que en los otros pacientes.

Sin embargo, a partir de los 6 meses desde la infusión, experimentó una respuesta clínica importante de todos los síntomas de SFC, hasta un nivel elevado de funcionalidad que no había experimentado en los últimos 7 años. Comenzó a estudiar a tiempo completo, y pudo leer sin problemas, y también observó una mejora notable de la memoria a corto plazo. Esta mejora drástica ha durado 4 ½ meses. Las semanas siguientes experimentó una recidiva gradual de los síntomas de SFC. Actualmente ha recibido nuevas infusiones de Rituximab (dos infusiones de 500 mg/m², administradas con una separación de dos semanas).

Metotrexato (Mtx) es un agente terapéutico con propiedades inmunomoduladoras conocidas (pero no bien comprendidas). Administrado de manera oral en un calendario semanal para la artritis reumatoide, uno de los efectos del fármaco es una disminución moderada de las células B, que es similar mecanísticamente pero no tan pronunciada como el efecto de Rituximab (Edwards et al. NEJM, 2004. Efficacy of B-Cell Targeting Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis). Para uno de los tres pacientes piloto (paciente 1), se trató semanalmente con Metotrexato durante las últimas 22 semanas, también con una respuesta clínica significativa y moderada sobre los síntomas de SFC, comenzando a las 10 semanas tras iniciar el tratamiento con Mtx.

En conclusión, se ha observado una respuesta clínica importante tras el tratamiento con Rituximab en los tres pacientes piloto, y en dos de estos con respuestas clínicas repetidas también tras un segundo tratamiento con Rituximab.

El tercero tuvo una mejora limitada de los síntomas de SFC a partir de 6 semanas tras la infusión de Rituximab. Sin embargo, de 6 a 10 ½ meses tras la infusión, tuvo una respuesta clínica importante en todos los síntomas relacionados con SFC que duró hasta ahora (10 ½ meses tras la infusión). Después tuvo una recidiva gradual, y ahora ha recibido un nuevo tratamiento con Rituximab (dos infusiones, es decir, en las semanas 47 y 49 tras su primer tratamiento con Rituximab).

Los cinco tratamientos de los tres pacientes dieron como resultado una mejora de los síntomas principales de notable a moderada. Para estos tres pacientes, la cinética de la mejora de los síntomas ha sido muy similar, pero con una respuesta importante tardía y de larga duración en la paciente 3, como se muestra en la Figura 1. El intervalo es compatible con la degradación y semivida conocidas de ciertas proteínas que pueden ser producidas por los linfocitos B. La reaparición de los síntomas tras el tratamiento con Rituximab es compatible con la maduración de los linfocitos B de células pre-plasmáticas a partir de células madre tras la lisis de las células B dirigida hacia el antígeno CD20, que está mediada a través de la citotoxicidad dirigida por el complemento (CDC) y por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Se ha demostrado que estas células B inmaduras tienen capacidad de producción de proteínas, entre ellas la producción de anticuerpos.

REIVINDICACIONES

1. Un agente de disminución de células B para el uso en el tratamiento del síndrome de fatiga crónica y la encefalomiелitis miálgica, por el cual el agente de disminución de células B es un anticuerpo anti-CD20 de disminución de células B o un fragmento de anticuerpo de unión a CD20 del mismo.
- 5 2. El anticuerpo anti-CD20 de disminución de células B o un fragmento de anticuerpo de unión a CD20 para el uso según la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de unión a CD20 del mismo.
3. El agente de disminución de células B para el uso según la reivindicación 1, que es un anticuerpo anti-CD20 humanizado o un fragmento de anticuerpo de unión a CD20 del mismo.
- 10 4. El agente de disminución de células B para el uso según la reivindicación 1, que es un fragmento de unión al antígeno seleccionado del grupo que consiste en F(ab')₂, F(ab'), Fab, Fv y sFv.
5. El agente de disminución de células B para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se selecciona de los anticuerpos humanizados Rituximab, Ofatumumab, Ocrelizumab, GA101 o Veltuzumab.
- 15 6. Un agente de disminución de células B para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la cantidad del anticuerpo anti-CD20 de disminución de células B está en el intervalo de 10 mg a 5000 mg por dosis.
- 20 7. El agente de disminución de células B para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo anti-CD20 de disminución de células B o el fragmento de anticuerpo de unión a CD20 del mismo es para la administración a un sujeto a una única dosis terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo de 50 a 2000 mg/m², o múltiples dosis terapéuticamente eficaces de dicho anticuerpo anti-CD20 o fragmento de anticuerpo de unión a CD20 del mismo de 50 a 2000 mg/m².
8. El agente de disminución de células B para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 mediante la administración de una o dos infusiones dos veces en dos semanas de dicho agente de disminución de células B.
- 25 9. El agente de disminución de células B para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por la administración de una combinación de un anticuerpo anti-CD20 de disminución de células B o un fragmento de anticuerpo de unión a CD20 del mismo con Metotrexato de manera simultánea, por separado o de manera secuencial a un sujeto que padece síndrome de fatiga crónica o encefalomiелitis miálgica.

