

COMPOSICIONES LIOFILIZADAS QUE COMPRENEN RITUXIMAB

La presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas estables muy concentradas de un anticuerpo anti-CD20
5 farmacéuticamente activo o una mezcla de tales moléculas de anticuerpo para la inyección subcutánea. Tales formulaciones, además de cantidades muy altas de anticuerpo anti-CD20 o mezclas del mismo, contienen un agente tampón, un estabilizador o una mezcla de dos o más agentes estabilizadores, un ten-
10 sioactivo no iónico y una cantidad eficaz por lo menos de una enzima hialuronidasa. La invención se refiere también a un proceso para la fabricación de dicha formulación y a los usos de tal formulación.

Antecedentes de la invención

15 El uso farmacéutico de anticuerpos ha ido en aumento en los últimos años. En muchos casos, tales 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
20 del anticuerpo, en particular por su solubilidad y estabilidad en una formulación líquido apropiada 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 solu-
25 ción final que va a inyectarse [Shire, S.J., Shahrokh, Z. y col., "Challenges in the development of high protein concentration formulations", J. Pharm. Sci. 93(6), 1390-1402, 2004; Roskos, L.K., Davis C.G. y col., "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
5 la(s) enzimas(s) glucosaminoglucanasa(s) con el fin de aumentar el espacio intersticial en el que puede inyectarse la formulación de anticuerpo [WO 2006/091871].

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

El RITUXAN[®]/MABTHERA[®] (rituximab) es un anticuerpo quimérico que se fija sobre el 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 en
15 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
20 a 6,5. Una formulación líquida alternativa del rituximab, idónea para la administración i.v., se ha descrito en la patente US-6,991,790.

La HERCEPTINA[™] (trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor 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 L-histidina clorhidrato 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.

5 La AVASTINA™ (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.

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 la inyección subcutánea. La ventaja de inyecciones subcutáneas es que permite al médico practicante realizarlas en el paciente con una intervención bastante corta. Además, el paciente puede practicar para 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.

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

El 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 la aplicación subcutánea (concentración: 50 mg de anticuerpo/ml volumen de inyección).

5 El 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, sucrosa, histidina y histidina clorhidrato monohidratado y polisorbato 20), que tienen que
10 reconstituirse con agua para la inyección subcutánea, formándose una dosis inyectable de 125 mg/ml.

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

 La inyección parenteral de fármacos en la hipodermis se limita en general a volúmenes inferiores a 2 ml, debido a su
20 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
25 percepción de dolor.

 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 diferente de agregación. Se sospecha que los agregados provocan inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas por lo 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.

Los anticuerpos tienen una estructura general muy similar, pero tales 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.

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 tales moléculas de anticuerpo, con preferencia para la inyección subcutánea.

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:

- aprox. de 20 a 350 mg/ml de anticuerpo anti-CD20;

- aprox. de 1 a 100 mM de un agente tampón que proporcione un pH de $5,5 \pm 2,0$;

- aprox. de 1 a 500 mM de un estabilizador o una mezcla de dos o más estabilizadores, en la que opcionalmente la metionina se emplea como estabilizador secundario, con preferen-

5 cia en una concentración de 5 a 25 mM;

- del 0,01 al 0,1 % de un tensioactivo no iónico; y

- con preferencia una cantidad eficaz por lo menos de una enzima hialuronidasa.

10 Descripción detallada de la invención

El término "anticuerpo" se emplea aquí en el sentido más amplio y abarca específicamente los anticuerpos de longitud completa, los anticuerpos de ingeniería genética, por ejemplo los anticuerpos monoclonales o los anticuerpos recombinantes,

15 los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (p.ej. los anticuerpos biespecíficos) formados por lo menos a partir de dos anticuerpos de longitud completa, los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanizados, los anticuerpos totalmente humanos, y así como los fragmentos de tales anti-

20 cueros, en el supuesto de que posean la actividad biológica deseada.

El término "anticuerpo monoclonal" se emplea aquí para indicar un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anti-

25 cueros individuales que forman parte de la población son idénticos y/o se fijan sobre el mismo epítope, 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 (epítopes), cada anticuerpo monoclonal se dirige
5 contra un solo determinante del 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 de anticuerpos sustancialmente
10 homogénea 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 con arreglo a la presente invención pueden obtenerse por el método del hibridoma descrito en primer lugar por Köhler y col., Nature 256, 495, 1975, o puede obtenerse por métodos de DNA re-
15 combinante (véase, p.ej., la patente US nº 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse también de las bibliotecas de anticuerpos fagos aplicando las técnicas descritas por Clarkson y col., Nature 352, 624-628, 1991 y Marks y
20 col., J. Mol. Biol. 222, 581-597, 1991. Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" se emplean aquí para indicar una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición de aminoácidos. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" indica an-
25 ticuerpos 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 forma de ejecución, los anticuerpos monoclonales humanos se producen

con una hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, p.ej. un ratón transgénico, que tiene un genoma que contiene un transgén de cadena larga humana y un transgén de cadena corta humana, fusionados en una
5 célula immortalizada. El término "anticuerpos monoclonales" incluye aquí específicamente a los llamados anticuerpos quiméricos, en los que una porción de la cadena larga y/o corta es idéntica con u homóloga con las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes
10 a un grupo o subgrupo concreto de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico con u homólogo con las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otro grupo o subgrupo de anticuerpos, así como los fragmentos de tales anticuerpos, en
15 el supuesto de que posean la actividad biológica deseada (patente US nº 4,816,567; y Morrison y col., 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, deri-
20 vadas de un primate no humano (p.ej. 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 por lo menos la porción de fijación sobre el antígeno o la región variable
25 de los mismos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen a los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; los 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 a un cadena VH, a saber, son capaces de unirse a una cadena VL que se fija
5 sobre un antígeno. 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 manera acorde con la invención después de haberse combinado con el o los dominios constantes apropiados de
10 anticuerpo.

Un "anticuerpo de longitud completa" es uno que contiene una región variable de fijación sobre el antígeno así como un dominio constante de cadena corta (CL) y dominios constantes de cadena larga CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden
15 ser dominios constantes de secuencia nativa (p.ej. dominios constantes de secuencia nativa humana) o varias de secuencias de aminoácidos de los mismos. Con preferencia, el anticuerpo de longitud completa tiene una o más funciones efectoras.

Un anticuerpo "variante de secuencia de aminoácidos" es
20 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 por lo menos aprox. una homología del 70% con la especie principal del anticuerpo, y con preferencia, tendrán por lo menos aprox.
25 una homología del 80%, con mayor preferencia por lo menos aprox. una homología del 90% con la especie principal del anticuerpo. Las variantes de las secuencias de aminoácidos presentan sustituciones, deleciones y/o adiciones en ciertas po-

siciones 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 (p.ej. variantes de anticuerpo desaminado),
5 la variante básica, el anticuerpo con una extensión líder en el extremo amino (p.ej. VHS) en una o en las dos cadenas cortas de la misma, el anticuerpo que tiene un resto lisina en el extremo C de una o de las dos cadenas largas del mismo, etc., e incluye las combinaciones de las variaciones de las secuen-
10 cias de aminoácidos de las cadenas largas y/o cortas. 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
15 glucosilación con respecto a la especie principal de anticuerpo.

Un anticuerpo "variante de glucosilación" es en este caso un anticuerpo que tiene uno o más restos hidrato de carbono unidos al mismo, que difieren de uno o más restos hidrato de
20 carbono unidos a la especie principal de anticuerpo. Los ejemplos de variantes de glucosilación de esta invención incluye 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 hidra-
25 to de carbono unidos a una o dos cadenas cortas del mismo, al anticuerpo que no lleva hidratos de carbono unidos a una o dos cadenas largas del anticuerpo, etc., y combinaciones de las alteraciones de glucosilación. El término "variante de gluco-
.

silación" 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 fijación sobre Clq; citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); la unión al receptor de Fc; la citotoxicidad de mediación celular dependiente de anticuerpo (ADCC); la fagocitosis; la regulación decreciente de receptores de superficie celular (p.ej. el receptor de células B; BCR), etc.

En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas largas, 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), p.ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena larga que corresponden a los diferentes grupos de anticuerpos se denominan α [alfa], δ [delta], ϵ [epsilon], γ [gamma] y μ [mu], respectivamente. Se conocen perfectamente las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de los diferentes grupos de inmunoglobulinas.

En esta descripción, "actividad biológica" de un anticuerpo monoclonal indica la capacidad del anticuerpo de 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 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 forma preferida de ejecución, una CDR murina se injerta a la región estructural 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 dador), por ejemplo de ratón, rata, conejo o un primate no humano que tenga la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región estructural (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 dador. Estas modificaciones se realizan para seguir refinando las prestaciones del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado contendrá sustancialmente todos los dominios variables, pero por lo 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 por lo
5 menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por ejemplo la de una inmunoglobulina humana (véase, p.ej., Riechmann, L. y col., Nature 332, 323-327, 1988; y Neuberger, M.S. y col., Nature 314, 268-270, 1985).

El término "anticuerpo quimérico" indica un anticuerpo
10 monoclonal que contiene una región variable, es decir, una región de fijación, de una fuente o especie y por lo menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, que se obtiene habitualmente por técnicas de DNA recombinante. Son especialmente preferidos los anti-
15 cueros quiméricos que tienen una región variable murina y una región constante humana. Tales anticuerpos quiméricos murino/humanos son el producto de genes de inmunoglobulina expresada que contienen segmentos de DNA que codifican a las regiones variables de inmunoglobulina murina y segmentos de
20 DNA que codifican a las regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de "anticuerpos quiméricos" abarcados por la presente invención son aquellas, en las que la clase o subclase se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original. Tales anticuerpos "quiméricos" se
25 denominan también "anticuerpos de clase modificada". Los métodos para la obtención de anticuerpos quiméricos incluyen las técnicas convencionales de DNA recombinante y las técnicas de transfección genética, ahora ya bien conocidas en la

técnica (véase, p.ej. Morrison, S.L. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855, 1984; US-5,202,238 y US-5,204,244).

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

El término "anticuerpo humano recombinante" se emplea
15 aquí 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 hospedante, por ejemplo una célula NS0 o CHO o de un animal (p.ej. un ratón), que es transgénico de los genes de la inmunoglobulina humana o
20 anticuerpos expresados empleando vectores de expresión recombinantes transfectados en una célula hospedante. Los anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana en forma reordenada. Los anticuerpos humanos recom-
25 binantes según 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 emplea aquí, "se une específicamente" o "se une específicamente a" indica un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD20. Con preferencia, la afinidad de fijación tiene un valor KD de 10^{-9} moles/l o más bajo (p.ej. 10^{-10} moles/l), con preferencia un valor KD de 10^{-10} moles/l o inferior (p.ej. 10^{-12} moles/l). La afinidad de unión se determina por un ensayo estándar de fijación, por ejemplo la técnica de resonancia de plasmón de superficie (BIAcore®).

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

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

La "región variable" (región variable de una cadena corta (VL), región variable de una cadena larga (VH)) tal como se emplea aquí indica cualquier par de cadenas corta y larga que intervienen directamente en la fijación del anticuerpo sobre el antígeno. Los dominios de cadenas cortas y largas humanas variables tienen la misma estructura general y cada dominio contiene cuatro regiones estructurales (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de

complementariedad, CDR). Las regiones estructurales adoptan una conformación de hoja β y las CDR pueden formar bucles que conectan con la estructura de hoja β . Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por regiones
5 estructurales y, junto con las CDR de la otra cadena, forman un sitio de fijación de antígeno. Las regiones de cadena larga y corta CDR3 del anticuerpo desempeñan un papel especialmente importante en la especificidad de fijación/ afinidad de los anticuerpos según la invención y por ello constituyen
10 otro objeto de la invención.

Los términos "región hipervariable" o "porción de un anticuerpo que se fija sobre el antígeno" se emplean aquí para indicar los restos de aminoácido de un anticuerpo que son los que producen la fijación sobre el antígeno. La región
15 hipervariable consta de restos aminoácido de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones de "estructura" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable distintas de los restos de región hipervariable ya definidas antes. Por consiguiente, las cadenas cortas y largas de un
20 anticuerpo contienen, entre los extremos N y C, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. En especial, la CDR3 de la cadena larga es la región que más contribuye a la fijación sobre el antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat y col., *Sequences of*
25 *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 de la CD20 humana, que se expresan de modo natural por parte las células o se expresan en células transfectadas con el gen CD20. La fijación de un anticuerpo de la invención sobre el antígeno CD20 media en la muerte de las células que expresan al CD20 (p.ej., una célula tumoral), ya que inactivan al CD20. La muerte de las células que expresan al CD20 puede ocurrir por uno o más de los mecanismos siguientes: la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), la inducción de la muerte celular y/o apoptosis, la 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" según la invención es un anticuerpo que se fija específicamente sobre el antígeno CD20. En función de las propiedades de fijación y de las actividades biológicas de los anticuerpos anti-CD20 con respecto al antígeno CD20, cabe distinguir dos tipos de anticuerpos anti-CD20 (anticuerpos anti-CD20 de tipo I y tipo II) según Cragg, M.S. y col., Blood 103, 2738-2743, 2004; y Cragg, M.S. y col., Blood 101, 1045-1052, 2003, ver tabla 1.

25 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
epítoto CD20 de tipo I	epítoto CD20 de tipo II
localizan la CD20 en balsas lípidas	no localizan la CD20 en balsas lípidas
mayor CDC (si es isotipo IgG1)	menor CDC (si es isotipo IgG1)
actividad de ADCC (si es isotipo IgG1)	actividad de ADCC (si es isotipo IgG1)
plena capacidad de fijación	capacidad reducida de fijación
agregación homotípica	agregación homotípica más fuerte
inducción de apóptosis después de unión cruzada	fuerte inducción de muerte celular sin unión cruzada

Una propiedad esencial de los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y de tipo II es su modo de fijación. Por consiguiente, los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y de tipo II pueden clasificarse por la proporción de sus capacidad de fijación sobre la CD20 en células Raji (ATCC n° CCL-86) de dichos anticuerpos anti-CD20 comparadas con las del rituximab.

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

Los anticuerpos anti-CD20 de tipo I tienen una proporción de capacidades de fijación sobre la CD20 en células Raji (ATCC n° CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 comparado con el rituximab de 0,8 a 1,2, con preferencia de 0,9 a 1,1. Los ejemplos de tales anticuerpos anti-CD20 de tipo I incluyen p.ej. al rituximab, en EP 2000149B1 (Anderson y col., ver p.ej. las figuras 4 y 5), 1F5 IgG2a (ECACC, hibridoma; Press

y col., Blood 69/2, 584-591, 1987), HI47 IgG3 (ECACC, hibridoma), 2C6 IgG1 (publicado en WO 2005/103081), 2F2 IgG1 u ofatumumab (publicado en WO 2004/035607 y WO 2005/103081). Con preferencia, el anticuerpo anti-CD20 de tipo I es un anticuerpo monoclonal que se fija sobre el mismo epítopo que el rituximab.

Los anticuerpos anti-CD20 de tipo II tienen una proporción de capacidades de fijación sobre el CD20 en células Raji (ATCC-No. CCL-86) de dicho anticuerpo anti-CD20 comparado con el rituximab de 0,3 a 0,6, con preferencia de 0,35 a 0,55, con mayor preferencia de 0,4 a 0,5. Los ejemplos de tales anticuerpos anti-CD20 de tipo II incluyen p.ej. al tositumomab (B1 IgG2a), al anticuerpo IgG1 de B-Ly1 humanizado (un anticuerpo IgG1 quimérico humanizado, descrito en WO 2005/044859), 11B8 IgG1 (descrito en WO 2004/035607) y AT80 IgG1. Con preferencia, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II es un anticuerpo monoclonal que se fija sobre el mismo epítopo que el anticuerpo B-Ly1 humanizado (descrito en WO 2005/044859).

La "proporción de las capacidades de fijación sobre la CD20 en células Raji (ATCC n° CCL-86) de anticuerpos anti-CD20 comparada con el rituximab" se determina por medición directa de la inmunofluorescencia (se mide la intensidad media de fluorescencia (MFI)) empleando dicho anticuerpo anti-CD20 conjugado con Cy5 y el rituximab conjugado con Cy5 en un FACSArray (Becton Dickinson) con células Raji (ATCC n° CCL-86) y se calcula del modo siguiente:

proporción de capacidades de fijación al CD20 en células Raji (ATCC n° CCL-86) =

MFI (Cy5-anticuerpo anti-CD20) Cy5-proporción marcado (Cy5-rituximab)

----- x -----

5 MFI (Cy5-rituximab) Cy5-proporción marcado (Cy5-anticuerpo anti-CD20)

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

10 De modo típico, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo I tiene una proporción de capacidades de fijación sobre la CD20 en células Raji (ATCC n° CCL-86) de dicho primer anticuerpo anti-CD20 comparado con el rituximab de 0,8 a 1,2, con preferencia de 0,9 a 1,1.

15 De modo típico, dicho anticuerpo anti-CD20 de tipo II tiene una proporción de capacidades de fijación sobre la CD20 en células Raji (ATCC n° CCL-86) de dicho segundo anticuerpo anti-CD20 comparado con el rituximab de 0,3 a 0,6, con preferencia de 0,35 a 0,55, con mayor preferencia de 0,4 a 0,5.

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

Se entiende por "anticuerpo que tiene una mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)" aquel anticuerpo, término ya definido antes, que tiene una mayor ADCC determinada por cualquier método idóneo conocido por los ex-

pertos 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
5 del anticuerpo que se fija sobre el antígeno;

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

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

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

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

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

anticuerpo que abarcan la totalidad del anterior intervalo de concentraciones;

v) para los controles de liberación máxima (MR), 3 hoyos adicionales de la placa, que contienen las células diana
5 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
10 hoyos adicionales de la placa, que contienen a las células diana marcadas, reciben 50 microlitros de medio RPMI de cultivo celular en lugar de la solución de anticuerpo (ver anterior apartado iv);

vii) después se centrifuga la placa de microvaloración
15 de 96 hoyos a 50 x g durante 1 minuto y se incuba a 4°C durante 1 hora;

viii) se añaden 50 microlitros de la suspensión PBMC (ver anterior apartado i) a cada hoyo, obteniéndose una proporción de efector:células diana de 25:1 y se introducen las
20 placas en un incubador en una atmósfera con un 5% de CO₂ a 37°C durante 4 horas;

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

25 x) se calcula el porcentaje de lisis específica de cada concentración de anticuerpos según la fórmula $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, en la que ER es la radiactividad media cuantificada (ver anterior apartado ix) de dicha concentración de anti-

cuerpo, MR es la radiactividad media cuantificada (ver anterior apartado ix) para los controles MR (ver anterior apartado v) y SR es la radiactividad media cuantificada (ver anterior apartado ix) para los controles SR (ver anterior apartado vi);

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

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

El término "citotoxicidad dependiente de complemento" (CDC) indica la lisis de células tumorales humanas diana por acción del anticuerpo según la invención en presencia de un complemento. La CDC se mide con preferencia por tratamiento

de una preparación de células que expresan la CD20 con un anticuerpo anti-CD20 según la invención, en presencia de un complemento. Se encuentra CDC si en una concentración de 100 nM el anticuerpo induce la lisis (muerte celular) del 20% o
5 más de las células tumorales después de 4 horas. El ensayo se lleva a cabo con preferencia con células tumorales marcadas con Cr⁵¹ o Eu y se mide el Cr⁵¹ o Eu liberados. Los controles incluyen la incubación de las células tumorales diana con un complemento, pero sin el anticuerpo.

10 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
15 sí. Con preferencia, tanto los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y como los de tipo II son anticuerpos del isotipo IgG1.

El anticuerpo "rituximab" es un anticuerpo monoclonal quimérico humano, de ingeniería genética, que contiene el dominio constante murino gamma 1, dirigido contra el antígeno
20 CD20 humano. Este anticuerpo quimérico contiene los dominios constantes gamma 1 humanos y se identifica con el nombre "C2B8" en EP 2000149B1 (Anderson y col.). El rituximab ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes que tienen
25 linfoma no de Hodgkin de células B, positivo de CD20, recurrente o refractario, de bajo grado o folicular. Los estudios del mecanismo de acción "in vitro" ponen de manifiesto que el rituximab presenta citotoxicidad dependiente de complemento humano (CDC) (Reff y col., Blood 83(2), 435-445, 1994). Des-

pliega además una actividad significativa en ensayos que miden la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

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

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

encadenar reacciones inmunes no deseadas (Jenkins y col., Nature Biotechnol. 14, 975-81, 1996).

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

.

Todos los anticuerpos contienen estructuras de hidrato de carbono en posiciones conservadas de las regiones constantes de cadena larga, cada isotipo posee un ordenamiento distinto de estructuras de hidrato de carbono unidas a N, lo
5 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
10 oligosacáridos complejos de alto contenido en manosa, de ramificaciones múltiples y también biantenarios. De modo típico existe un procesado heterogéneo de estructuras de núcleo oligosacárido unidas a un sitio particular de glucosilación, de modo que incluso los anticuerpos monoclonales existen en glu-
15 coformas múltiples. De igual manera se ha demostrado que ocurren diferencias importantes en la glucosilación de anticuerpos entre líneas celulares e incluso se han observado diferencias menores en una línea celular determinada que se haya cultivado en condiciones diferentes (Lifely, M.R. y col.,
20 Glycobiology 5(8), 813-22, 1995).

Una manera de obtener incrementos grandes de potencia, manteniendo un proceso de producción sencillo y evitando potencialmente efectos secundarios indeseables, consiste en ampliar las funciones efectoras naturales, mediadas por células,
25 las, de los anticuerpos monoclonales por ingeniería de su componente oligosacárido, tal como se describe en Umaña, P. y col., Nature Biotechnol. 17, 176-180, 1999 y US-6,602,684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos más utilizados

en la inmunoterapia contra el cáncer, son glucoproteínas que tienen un sitio de glucosilación unido a N conservado, en el Asn297 de cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos a Asn297 están enterrados entre dos dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipéptido y su presencia es esencial para que el anticuerpo pueda medir en funciones efectoras, como son la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Lifely, M.R. y col., *Glycobiology* 5, 813-822, 1995; Jefferis, R. y col., *Immunol. Rev.* 163, 59-76, 1998; Wright, A. y Morrison, S.L., *Trends Biotechnol.* 15, 26-32, 1997).

Se ha demostrado previamente que la sobreexpresión de la $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I11 ("GnTIII1"), 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. y col., *Nature Biotechnol.* 17, 176-180, 1999; y WO 99/154342, cuyos contenidos se incorporan a la presente en su totalidad como referencias). El anticuerpo chCE7 pertenece a un grupo grande de anticuerpos monoclonales no conjugados que tienen una gran afinidad y especificidad tumorales, pero tienen una potencia insuficiente para ser útiles en sentido clínico cuando se produce en líneas celulares industriales estándar que carecen de la enzima GnTIII (Umaña, P. y col., *Nature Biotechnol.* 17, 176-180, 1999). Este estudio fue el primero en demostrar que se podrían obtener grandes incre-

mentos 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 fucosilados bisectados, por encima de los niveles encontrados en los anticuerpos de origen natural.

El término "expresión del antígeno CD20" indica un nivel significativo de expresión del antígeno CD20 en una célula, con preferencia en la superficie de una célula T o B, con mayor preferencia una célula B, de un tumor y de un cáncer, respectivamente, con preferencia un tumor no sólido. Los pacientes que tienen un "cáncer que expresa al CD20" pueden determinarse por ensayos estándar ya conocidos de la técnica.

La "expresión del antígeno CD20" indica también con preferencia un nivel significativo del antígeno CD20 en una célula, con preferencia en la superficie de una célula T o B, con mayor preferencia de una célula B, en una enfermedad autoinmune. La expresión del antígeno CD20 se mide p.ej. aplicando una detección inmunohistoquímica (IHC), FACS o una detección basada en la PCR del mRNA correspondiente.

El término "cáncer que expresa al CD20" tal como se emplea aquí indica con preferencia los linfomas (con preferencia linfoma no de Hodgkin de células B (NHL)) y leucemias linfocíticas. Tales linfomas y leucemias linfocíticas incluyen p.ej. (a) los linfomas foliculares, (b) linfomas de células pequeñas no divididas/linfoma de Burkitt (incluyendo el linfoma endémico de Burkitt, el linfoma esporádico de Burkitt

y los linfomas no de Burkitt), (c) los linfomas de zonas marginales (incluido el linfoma de extranodal de zona marginal de células B (linfomas de tejido linfático asociado a mucosa, MALT), el linfoma nodal de zona marginal de células B y el
5 linfoma esplénico de zona marginal), (d) linfoma de células de manto (MCL), (e) linfoma de células grandes (incluido el linfoma difuso de células B grandes (DLCL), el linfoma difuso de células grandes, el linfoma inmunoblástico, el linfoma primario mediastinal de células B, el linfoma angiocéntrico-
10 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 neo-
15 plasmas de células plasmáticas, el mieloma de células plasmática, el mieloma múltiple, el plasmacitoma y (j) la enfermedad de Hodgkin.

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

.

Tal como se emplea aquí, "enfermedad autoinmune" indica una enfermedad o trastorno que surge de o está dirigido contra los tejidos propios del individuo. Los ejemplos de enfermedades y trastornos autoinmunes incluyen, pero no se limitan a: la artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriática), la psoriasis, la dermatitis, la polimiositis/dermatomiositis, la necrólisis epidérmica tóxica, el escleroderma sistémico y la esclerosis, las respuestas asociadas con la enfermedad del intestino inflamatorio, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el síndrome del distrés respiratorio, el síndrome del distrés respiratorio del adulto (ARDS), la meningitis, la encefalitis, la uveítis, la colitis, la glomerulonefritis, los estados patológicos alérgicos, el eccema, el asma, los estados patológicos que implican la infiltración de células T y las respuestas inflamatorias crónicas, la aterosclerosis, la miocarditis autoinmune, la deficiencia de adhesión de leucocitos, el lupus eritematoso sistémico (SLE), la diabetes de inicio juvenil, la esclerosis múltiple, la encefalomiелitis alérgica, las respuestas inmunes asociadas a una hipersensibilidad aguda o retardada mediadas por citoquinas y linfocitos T, la tuberculosis, la sarcoidosis, la granulomatosis, incluida la granulomatosis de Wegener, la agranulocitosis, la vasculitis (incluida la ANCA), la anemia aplásica, la anemia de Diamond Blackfan, la anemia hemolítica inmune, incluida la anemia hemolítica autoinmune (AIHA), la anemia perniciosa, la aplasia de glóbulos rojos pura (PRCA), la deficiencia del factor VIII, la hemofilia A, la neutropenia autoinmune, la

pancitopenia, la leucopenia, las enfermedades que implican
diapédesis de leucocitos, los trastornos inflamatorios del
sistema nervioso central (SNC), el síndrome de lesiones orgá-
nicas múltiples, la miastenia grave, las enfermedades media-
5 das por complejos de antígeno-anticuerpo, las enfermedades de
membrana de base antiglomerular, el síndrome de anticuerpo
anti-fosfolípido, la neuritis alérgica, la enfermedad de Be-
chet, el síndrome de Castleman, el síndrome de Goodpasture,
el síndrome miasténico de Lambert-Eaton, el síndrome de Rey-
10 naud, el síndrome de Sjorgen, el síndrome de Stevens Johnson,
el penfigoide vesicular, el pénfigo, las poliendocrinopatías
autoinmunes, las nefropatías, las polineuropatías de IgM o la
neuropatía mediada por la IgM, la púrpura trombocitopénica
idiopática (ITP), la púrpura trombocitopénica trombótica
15 (TTP), la trombocitopenia autoinmune, la enfermedad autoinmu-
ne de testículos y ovarios, incluidas la orquitis y la oofor-
itis autoinmunes, el hipotiroidismo primario, las enfermeda-
des endocrinas autoinmunes, incluido la tiroiditis autoinmu-
ne, la tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), la ti-
20 roiditis subaguda, el hipotiroidismo idiopático, la enferme-
dad de Addison, la enfermedad de Grave, los síndromes poli-
glandulares autoinmunes (o síndromes de endocrinopatía poli-
glandular I), la diabetes de tipo I, también llamada diabetes
mellitus dependiente de la insulina (IDDM), el síndrome de
25 Sheehan, la hepatitis autoinmune, la neumonitis intersticial
linfoide (VIH), la bronquiolitis obliterans (no trasplante)
frente al NSIP, el síndrome de Guillain-Barre, la vasculitis
de vasos grandes (incluida la polimialgia reumática y la ar-

teritis de células gigantes (arteritis de Takayasu), la vasculitis de vasos medios (incluida la enfermedad de Kawasaki y la poliarteritis nodosa), la espondilitis anquilosante, la enfermedad de Berger (nefropatía de IgA), la glomerulonefritis progresiva rápida, la cirrosis biliar primaria, la esprue celiaca (enteropatía del gluten), la crioglobulinemia, la esclerosis lateral amitrófica (ALS), la enfermedad de la arteria coronaria, etc.

Un "agente inhibidor del crecimiento" se emplea aquí para indicar un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, en especial la célula cancerosa que expresa al 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 DNA, 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 .

tulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and anti-neoplastic drugs", cuyos autores son Murakami y col. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), en especial la p. 13.

"Tratamiento" indica tanto el tratamiento terapéutico
5 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 este caso es tanto la persona, a la que se ha diagnosticado que tiene la
10 enfermedad, como la persona que está predispuesta o es susceptible de contraer la enfermedad.

El término "agente citotóxico" se emplea aquí para indicar una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o provoca la destrucción de dichas células. El término
15 incluye a los isótopos radiactivos (p.ej. 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
20 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 (CYTOXANTM); 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, trietilenofosfora-

mida, trietilenotiofosforamida y trimetilolmelamina; las acetogeninas (en especial la bullatacina y la bullatacinona); el delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARENOLTM); la beta-lapachona; el lapachol; las colchicinas; el ácido betulínico;

5 una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecan (HYCAMTINTM), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSARTM), la acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); la briostatina; la callistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); la podofilotoxina; el

10 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-TM1); la eleuterobina; la pancratistatina; una sarcodictina; la espongistatina; las mostazas nitrogenadas,

15 como el clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, mecloretamina-óxido clorhidrato, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfa[pi]nida, mostaza de uracilo; las nitrosureas como la carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y

20 ranirmustina; los antibióticos del tipo enedina (p.ej., caliqueamicina, en especial la caliqueamicina-gamma 11 y caliqueamicina-omega 11 (véase, p.ej., Angew, Chemie Intl. Ed. Engl., 33, 183-186, 1994); dinemicina, incluida la dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y los

25 cromóforos afines de antibióticos de la cromoproteína enedina), las aclacinomisinas, la actinomicina, la autramicina, la azaserina, las bleomicinas, la cactinornicina, la carabicina, la carminomicina, la carzinofilina, las cromomicinas, la dac-

.

tinomicina, 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 in-
5 yectable (DOXIL™), la doxorubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET™), la doxorubicina liposómica peglilada (CAELYX™) y la desoxidoxorrubicina), la epirubicina, la esorrubicina, la idarrubicina, la marcelomicina, las mitomicinas como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomi-
10 cinas, 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 capecita-
15 bina (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, tiamiprina, tioguanina; los análogos de pirimidina como la ancitabina,
20 azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; los anti-adrenales como la aminoglutetimida, mitotano, trilostano; los rellenos de ácido fólico, como el ácido frolínico; la aceglatona; los glucósidos de aldofosfamida; el ácido aminolevulínico;
25 co; el eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiumrea; lentinan; lonidainina; maitanosinoides, como la maitansi-

na 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
5 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;
10 la gacitosina; los arabinósidos ("Ara-C"); la tiotepa; los taxoides, p.ej. 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
15 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;
20 da; 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 bexaroteno (TARGRETINA™); los bisfosfonatos por ejemplo el
25 clodronato (por ejemplo, BONEFOS™ u OSTAC™), el etidronato (DIDROCAL™), NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA™), el alendronato (FOSAMAJX™), el pamidronato (AREDIA™), 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 (p.ej., LURTOTECAN™); el
5 rmRH (p.ej., ABARELIX™); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); la perifosina, inhibidor de COX-2 (p.ej. celecoxib o etoricoxib), el inhibidor de proteosoma (p.ej. PS341); el bortezomib (VELCADE™); CCI-779; el tipifarnib (R1 1577); orafenib, ABT510; el inhibidor de Bcl-2 como el oblimersen
10 sódico (GENASENSE™); el pixantrona; los inhibidores del EGFR (ver la definición que sigue); los inhibidores de tirosinaquinasa (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
20 los anteriores, por ejemplo el CHOP, un abreviatura de la terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona (que opcionalmente puede incluir también interferon-A (CHVP/interferón-A); el FOLFOX, una abrevitura del regimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINA™) combinado
25 con 5-FU y leucovorina; el CVP (ciclofosfamida, vincristina y prednisolona); el MCP (mitozantrona, 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
5 sanguíneos. El factor antiangiogénico puede ser, por ejemplo una molécula pequeña o un anticuerpo que se une al factor de crecimiento o al receptor del factor de crecimiento que interviene en el fomento de la angiogénesis. El factor antiangiogénico preferido es en este contexto un anticuerpo que se une al
10 factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), por ejemplo el bevacizumab (AVASTINA™).

El término "citoquina" es un término genérico de las proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de
15 tales citoquinas son las linfoquinas, las monoquinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citoquinas las hormonas del crecimiento, por ejemplo la hormona del crecimiento humano, la hormona de crecimiento humano N-metionilo y las hormonas de crecimiento bovino, las hormonas
20 del paratiroides, la tiroxina, la insulina, la proinsulina, la relaxina; la prorrelaxina, las hormonas de glucoproteínas, por ejemplo las hormonas estimuladoras de folículo (FSH), las hormonas estimuladoras del tiroides (TSH), las hormonas luteinizantes (LH), el factor de crecimiento hepático; el factor de
25 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 crecimien-

to endotelial vascular, la integrina, la trombopoyetina (TPO), los factores de crecimiento nervioso, por ejemplo el NGF- β , el factor de crecimiento plaquetario; los factores de crecimiento de transformación (TGFs), por ejemplo el TGF- α y el TGF- β , los
5 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
10 to 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- α o TNF- β , y otros factores polipeptídicos, incluidos el LIF y un ligando de kit (KL). Tal como se emplea aquí, el término
15 citoquina incluye a las proteínas de fuentes naturales o procedentes de cultivos celulares recombinantes y los equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencias naturales.

El término "cantidad eficaz" indica la cantidad que proporciona el efecto deseado. En el caso del ingrediente de una
20 formulación, como pueda ser la enzima hialuronidasa según 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
25 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 células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, frenar en cierta medida y con preferencia detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos colindantes; inhibir (es decir, frenar en cierta medida y con preferencia 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 progresión de la supervivencia libre, traduciendo 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.

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. Tales formulaciones son estériles.

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

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, p.ej. entre 2 y 8°C. Con preferencia, 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 con preferencia después de congelar (p.ej. a -20°C) y descongelar la formulación, por ejemplo 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 evaluación de la formación de agregados (empleando por ejemplo la cromatografía de exclusión de tamaños, 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 fijación sobre el antígeno; etc. La inestabilidad puede implicar uno o más hechos como los siguientes: agregación, desamidación (p.ej. desamidación de la Asn), oxidación (p.ej. oxidación de la Met), isomerización (p.ej. isomerización de la Asp), grapo/hidrólisis/fragmentación (p.ej. fragmentación de la región

bisagra), formación de succinimida, cisteína(s) desaparecida(s), etc.

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos empleados con arreglo a la presente invención se preparan para el almacenaje mezclando opcionalmente un anticuerpo que tenga el grado deseado de pureza con los vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a 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 aquí para indicar un agente tensioactivo farmacéuticamente aceptable. En la formulación de la invención, la cantidad de tensioactivo se describe como porcentaje expresado en peso/volumen. La unidad empleada con mayor frecuencia de peso/volumen es el mg/ml. Los tensioactivos farmacéuticamente aceptables incluyen a los ésteres polietileno-sorbita-ácidos grasos (Tween), los polietilen-polipropilen-glicoles, los poli(óxido de etileno)-estearatos, los éteres de alquilo de poli(óxido de etileno), p.ej. 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 TweenTM 80). Los copolímeros de polietileno-polipropileno más apropiados son los suministrados con los nombres de Pluronic[®] F68 o PoloxamerTM 188. Los polioxietileno-estearatos preferidos son los
5 suministrados con el nombre comercial de MyrjTM. Los éteres de alquilo de poli(óxido de etileno) más apropiados son los que suministran con el nombre de BrijTM. Los éteres de alquilfenol-poli(óxido de etileno) más apropiados son los que suministran con el nombre comercial de Triton X.

10 El término "tampón" se emplea aquí para indicar un tampón farmacéuticamente aceptable. Tal como se emplea aquí, 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 áci-
15 do/base. Los tampones farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se limitan a: tampones citrato, tampones gluconato, tampones succinato, tampones acetato, tampones glicilglicina, otros tampones ácidos orgánicos y tampones fosfato.

Se entiende por "isotónico" que la formulación de interés
20 rés 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.

25 El término "agentes isotónicos" se emplea aquí para indicar agentes isotónicos farmacéuticamente aceptables. Los agentes isotónicos se emplean para obtener una formulación isotónica. Una formulación isotónica es un líquido o un lí-
.

quido reconstituido a partir de una forma sólida, p.ej. una forma liofilizada e indica una solución que tiene la misma tonicidad que otra solución con la que se compara, por ejemplo una solución salina fisiológica y el suero sanguíneo. Los
5 agentes isotónicos idóneos incluyen, pero no se limitan a: sales, incluidos pero sin limitarse a ellos: el cloruro sódico (NaCl) o el cloruro potásico, los azúcares, incluidos pero sin limitarse a ellos: la glucosa, la sucrosa, la trehalosa o la glicerina y cualquier componente del grupo de los aminoácidos,
10 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 aquí en relación con la formulación según la invención indica una formulación que es
15 líquida a una temperatura por lo menos de 2 a 8°C.

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

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

El término "aminoácido" se emplea aquí para indicar un aminoácido en una cantidad de 1 a 100 mg/ml, que comprende

pero no se limita a: arginina, glicina, ornitina, glutamina, asparagina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, isoleucina, leucina, alanina, fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, serina, prolina.

5 Un "sacárido" abarca aquí 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 a la glucosa, sucrosa, trehalosa, 10 lactosa, fructosa, maltosa, dextrano, glicerina, dextrano, eritrita, glicerina, arabita, silita, sorbita, manita, melibiosa, melezitosa, rafinosa, manotriosa, estaquiosa, maltosa, lactulosa, maltulosa, glucita, maltita, lactita, isomaltulosa, etc. Se incluyen también dentro de la invención la glucosami- 15 na, N-metilglucosamina (también llamada "meglumina"), galactosamina y ácido neuramínico y las combinaciones de los sacáridos según la invención. Aquí, el sacárido preferido es un disacárido no reductor, por ejemplo la trehalosa o la sucrosa. El sacárido más preferido según la presente invención es la 20 trehalosa.

El término "estabilizador" indica estabilizadores 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. 25

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
5 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
10 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
15 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
20 farmacéuticas estables, muy concentradas, de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo o una mezcla de tales moléculas de anticuerpo para la inyección subcutánea. Tales formulaciones, además de cantidades muy elevadas de anticuerpo anti-CD20 o mezclas de los mismos, contienen un agente tampón,
25 un estabilizador o una mezcla de dos o más estabilizadores, un tensioactivo no iónico y con preferencia una cantidad eficaz por lo menos de 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
5 negativamente en la viabilidad del proceso (p.ej. los pasos de bombeo y de filtración) de las formulaciones de anticuerpos y de la administración (p.ej. aptitud para la administración con jeringuilla). Con la adición de los excipientes se logra en algunos casos disminuir las viscosidades elevadas. El control
10 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
15 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
20 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. y col., J. Pharm. Sci. 97(10), 4347-4366, 2008].

En un primer aspecto, la presente invención proporciona
25 una formulación farmacéutica estable, muy concentrada, de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo o una mezcla de tales moléculas de anticuerpo para la aplicación parenteral. Con preferencia, 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, intrasinovial, 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:

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

La formulación farmacéutica estable, muy concentrada, de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo de la presen-

te 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
5 concentración de proteína dentro de la formulación reconstituida que se sitúa aprox. entre 2 y 40 veces mayor que la concentración de proteína en la mezcla antes del paso de la liofilización.

La concentración preferida de anticuerpo anti-CD20 se
10 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 aprox. 120 mg/ml.

La concentración preferida del agente tampón se sitúa entre 1 y 50 mM, con mayor preferencia entre 10 y 30 mM; la
15 concentración especialmente preferida es aprox. 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 ácido acético y un tampón ácido cítrico. El tampón ácido acético según la invención es con
20 preferencia de aprox. 10 mM a 30 mM y con preferencia especial de aprox. 20 mM. El tampón ácido cítrico según la invención se sitúa con preferencia aprox. entre 10 mM y 30 mM y con preferencia especial en aprox. 20 mM.

Con independencia del tampón utilizado, el pH se ajustará en un valor comprendido aprox. entre 4,5 y 7,0 y con preferencia aprox. entre 5,5 y 6,5, también con preferencia 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
25 .

técnica o empleando mezclas adecuadas de componentes tampón o por ambos métodos.

El o los estabilizadores (que se emplean como sinónimos con el término "agente estabilizador" en la presente descripción de patente) se elige(n) con preferencia entre el grupo formado por una sal, un hidrato de carbono, un sacárido y aminoácidos(s), con mayor preferencia un hidrato de carbono o un sacárido, con mayor preferencia un azúcar admitido por las autoridades como aditivo o excipiente apropiado para formulaciones farmacéuticas, elegido con preferencia especial entre el grupo formado por la α,α -trehalosa dihidratada, NaCl y metionina. La concentración preferida del estabilizador se sitúa entre 15 y 250 mM, o con mayor preferencia entre 150 y 250 mM. Es especialmente preferida una concentración de aprox. 210 mM.

La formulación puede contener un estabilizador secundario, en cuyo caso este estabilizador secundario será con preferencia la metionina, con preferencia en una concentración de 5 a 25 mM, con mayor preferencia en una concentración de 5 a 15 mM. La concentración especialmente preferida de la metionina es aprox. de 10 mM.

El tensioactivo no iónico es con preferencia un polisorbato, se elige con mayor preferencia 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 con preferencia entre el 0,02 y el 0,06 % (p/v), con preferencia especial en aprox. el 0,06 % (p/v).

.

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

La concentración de la enzima hialuronidasa dependerá de la enzima hialuronidasa concreta que se emplee para la preparación de la formulación según 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 con preferencia entre aprox. 1.000 y 16.000 U/ml, con lo cual dicha cantidad equivale aprox. 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 aprox. entre 1.500 y 12.000 U/ml. Es especialmente preferida una concentración situada aprox. entre 2.000 U/ml y aprox. 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, p.ej. 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.

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

Se proporciona una formulación farmacéutica estable de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo que contiene de aprox. 30 mg/ml a 350 mg/ml, por ejemplo de 30 mg/ml a 100 mg/ml (incluidos aprox. 30 mg/ml, aprox. 50 mg/ml o aprox. 100 mg/ml); de aprox. 1 a 100 mM de un agente tampón (p.ej. acetato sódico) que ajuste el pH a $5,5 \pm 2,0$ (p.ej. pH 5,3); aprox. de 15 a 250 mM de un estabilizador o una mezcla de dos o más estabilizadores (incluida la trehalosa, p.ej. aprox. un 8 % de trehalosa dihidratada); aprox. del 0,01 al 0,1 % (p/v) de un tensioactivo no iónico; y opcionalmente una cantidad eficaz por lo menos de una enzima hialuronidasa (p.ej. la rHuPH20), con preferencia en una cantidad de aprox. 1.500/ml a aprox. 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 SHA-SEGP 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 la 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, con preferencia en zonas muy próximas entre sí. Es posible además inyectar los agentes terapéuticos presentes en la formulación según la presente invención en forma de inyecciones sucesivas, p.ej. 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 estabilizadores y el tensioactivo no iónico, en las concentraciones especificadas en las reivindicaciones que siguen, pero
5 excluyendo la enzima hialuronidasa. La enzima hialuronidasa puede aportarse después, p.ej. en el tampón 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 forma preferida de ejecución se aporta el anticuerpo anti-CD20 con el agente tampón, el o los estabili-
10 zadores 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 hialu-
15 ronidasa 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 hia-
20 luronidasa 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
25 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 tam-

bién 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 por lo 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, según la presente invención. Tal formulación puede constar de un anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo o una mezcla de tales 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 con preferencia 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. El anticuerpo anti-CD20 terapéutico de mayor éxito es el rituximab suministrado por Genentech Inc. y F. Hoffmann-La Roche Ltd. con los nombres comerciales de MABTHERA™ o
5 RITUXAN™.

El anticuerpo anti-CD20 aquí definido se elige con preferencia entre el grupo del rituximab (véase p.ej. la patente US-7,381,560 y la EP-2000149B1 de Anderson y col., véanse p.ej. las figuras 4 y 5). El anticuerpo anti-CD20 más preferido es el rituximab. El término "rituximab" incluye 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 US-7,381,560 y en el documento EP-2000149B1.
10
15

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.
20

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
25

peso molecular de megadaltones, que después se degrada localmente, en la linfa y en el hígado, por acción de las hialuronidasas liosómicas 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. y col., "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 proteoglucanos (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
5 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
10 (coord.), Plenum Press, Nueva York, 1991; pp. 1384-1386; Bertrand y col., Int. J. Cancer 52, 1-6, 1992; Knudson y col., FASEB J. 7, 1233-1241, 1993]. Además, los niveles de hialuronano guardan relación con la agresividad de los tumores [Ozello y col., Cancer Res. 20, 600-604, 1960; Takeuchi y
15 col., Cancer Res. 36, 2133-2139, 1976; Kimata y col., 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
20 ejemplo en la homeostasis de proteínas en agua y en plasma [Laurent, T.C. y col., 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
25 desempeña un papel importante en la regulación, desarrollo y diferenciación celulares [Laurent y col., 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 (p.ej. 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 y col., 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 HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 y PH20/SPAM1. La HYALP1 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 HYAL1 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 HYAL1 y la HYAL2 carecen en general de actividad catalítica en pH neutro (es decir, pH 7). Por ejemplo, la HYAL1 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 glucosilfosfatidilinositol, por ejemplo la HYAL2 humana y la PH20 humana [Danilovitch-Miagkova y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(8), 4580-4585, 2003; Phelps y col., *Science* 240(4860), 1780-1782, 1988] y las que son generalmente solubles, por ejemplo la HYAL1 humana [Frost, I.G. y col., "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 5 tiene una unión muy floja con la membrana plasmática y no está anclada mediante un anclaje sensible a fosfolipasa [Lalancette y col., 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 es- 10 pecies 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-DNA humanos que no introducirían un 15 anclaje lípido en el polipéptido han conducido a una enzima catalíticamente inactiva o a una enzima insoluble [Arming y col., 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 20 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 y col., 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.

25 Tal como se ha indicado antes y con arreglo a las enseñanzas del documento WO 2006/091871 y de la patente US-7,767,429 se pueden introducir pequeñas cantidades de glucoproteínas hialuronidasas solubles (SHASEGPs) en una formula-

ción 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 conductan-
5 cia 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
10 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
15 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*, respectivamen-
20 te, 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
25 cabo de 24 - 48 horas de la administración [Bywaters, G.L. y col., "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
5 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, p.ej. un anticuerpo terapéutico (peso molecular aproximado: 150 kDa) tiene que atravesar por tanto la matriz intersticial antes de alcanzar los
10 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
15 [Bookbinder, L.H. y col., "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
20 utilizado clínicamente durante más de 60 años, primariamente para aumentar la dispersión y la absorción de otros fármacos administrados simultáneamente y para la hipodermocclisis (inyección/infusión SC de grandes volúmenes de líquidos) [Frost G.I., "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling
25 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 transglycosilative
5 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;
10 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,
15 Boca Raton, FL; 1991, pp. 249-265; Harris, E.N. y col., "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):
20 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
25 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 hipersensibili-

dad 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 la 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
- 10 - 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 espongiformes transmisibles.

Las glucoproteínas hialuronidasas solubles (SHASEGP), un proceso de obtención de las mismas y su utilización en composiciones farmacéuticas se han descrito en 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.

rable y cumple todos los requisitos necesarios para la aprobación por parte de las autoridades sanitarias.

Se cree que la enzima hialuronidasa de la formulación según la presente invención intensifica la entrega del anticuerpo anti-CD20 a la circulación sistémica, p.ej. 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 hidrolización 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 según 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
5 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
10 en la integridad molecular del anticuerpo anti-CD20 en la formulación farmacéutica estable aquí descrita. Además, la enzima hialuronidasa modifica simplemente la aportación del anticuerpo anti-CD20 a la circulación sistémica, pero no posee otras
15 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 re-
20 comendadas de la formulación farmacéutica estable según 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-
25 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, con

preferencia especial 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 delección 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 transglycosilative 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, p.ej. el 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 según la presente invención, se obtiene con preferencia por la tecnología de DNA 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 según la presente invención es con preferencia una enzima humana, con preferencia especial la rHuPH20.

La secuencia de aminoácidos de la rHuPH20 (HYLENEX™) es bien conocida y está disponible con el n° de registro CAS 75971-58-7. Su peso molecular aproximado es de 61 kDa (véase también la patente US-7,767,429).

Se han realizado múltiples comparaciones estructurales y funcionales entre la hialuronidasa de mamíferos de fuentes naturales y los clones de cDNA de la PH-20 de humanos y de otros mamíferos. El gen de la PH-20 es el gen empleado para el
5 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.
10 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
15 son equivalentes.

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

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

25 La formulación farmacéutica estable según la invención está esencialmente libre de partículas visibles (inspección visual). Las partículas subvisibles (medidas por oscurecimiento

to luminoso) deberían cumplir con preferencia 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 $\rightarrow 600$

5 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, con preferencia un cáncer o una enfermedad no maligna, en un sujeto, 10 que consiste en administrar la formulación aquí descrita a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar dicha enfermedad o trastorno. Con preferencia, el anticuerpo anti-CD20 se administra simultáneamente, de modo concomitante o sucesivo, con un agente quimioterapéutico.

15 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 (p.ej. un cáncer (preferido) o una enfermedad no maligna) en un sujeto, que consiste en administrar la formulación aquí descrita a 20 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 según la presente invención que es capaz de fijarse sobre las 25 células afectadas. El cáncer es con preferencia un cáncer que expresa la CD20. La enfermedad no maligna que puede tratarse con la composición según la presente invención es con preferencia una enfermedad autoinmune aquí definida. Con preferen-

cia, 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
5 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 según 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 con
10 preferencia en el compartimento vascular a través de los líquidos linfáticos de drenaje [Supersaxo, A. y col., "Effect of Molecular Weight on the Lymphatic Absorption de 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
15 frecuencia/intensidad de infusión reducidas.
20

Para la producción de la formulación subcutánea del anticuerpo anti-CD20 (con preferencia el rituximab) según la invención se requieren concentraciones elevadas de anticuerpo (aprox. 120 mg/ml) en el paso final de purificación del proceso de fabricación. Por ello se añade un paso adicional de pro-
25 ceso (ultrafiltración/diafiltración) al proceso convencional de fabricación del anticuerpo anti-CD20, con preferencia el rituximab. La formulación farmacéutica estable y muy concen-

trada del anticuerpo anti-CD20 según 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
5 concentración elevada.

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

El término "aprox." se emplea en la presente descripción
10 de patente para indicar que el valor específico nombrado puede variar dentro de cierta medida, p.ej. indica que se incluyen en el valor nombrado las variaciones comprendidas dentro del intervalo ± 10 %, con preferencia ± 5 %, con preferencia especial ± 2 %.

15 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, p.ej. un isótopo radiactivo, y fijar el anticuerpo sobre las células
20 del paciente de modo que se puedan evaluar, p.ej. 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
25 varias enfermedades y trastornos no malignos, que incluyen por ejemplo las enfermedades autoinmunes aquí definidas; la endometriosis; el escleroderma; la restenosis; los pólipos, por ejemplo los pólipos de colon, los pólipos nasales o los póli-

pos 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;

5 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;

10 cos; 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

15 edad; las patologías óseas, como son la osteoartritis, las ricketsias y la osteoporosis; los daños posteriores a un episodio esquémico cerebral; las enfermedades fibróticas y edémicas, por ejemplo la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar, la carcoidosis, la troiditis, el síndrome de hiperviscosidad

20 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-

25 Barre; la enfermedad de injerto contra hospedante o rechazo del trasplante; la enfermedad de Paget; la inflamación ósea o articular; el envejecimiento por exposición al sol (causado p.ej. 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;

5 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

10 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 (p.ej. la enfermedad de Alzheimer, la demencia derivada del SIDA, la enfermedad de Parkinson,

15 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

20 T; la estenosis pilórica hipertrófica infantil; el síndrome obstructivo urinario; la artritis psoriática; y la tiroiditis de Hashimoto. Las indicaciones no malignas preferidas para la terapia son las aquí mencionadas.

Cuando la indicación es el cáncer, el paciente puede

25 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, con preferencia 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
5 antes o después de la administración de la formulación del anticuerpo según la presente invención. En esta forma de ejecución, el lapso de tiempo entre por lo menos una administración del agente quimioterapéutico y por lo menos una administración de la formulación del anticuerpo según la presente
10 invención se elige con preferencia aproximadamente de 1 mes o menos y con preferencia especial de 2 semanas o menos. Como alternativa, el agente quimioterapéutico y la formulación de anticuerpo según la presente invención se administran de modo concurrente al paciente, en una sola formulación o en formulaciones separadas.
15

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
20 al aditivo en el paciente.
25

Con preferencia, el anticuerpo en la formulación administrada es un anticuerpo tal cual. Sin embargo, el anticuerpo administrado puede combinarse con un agente citotóxico. Con

preferencia, el inmunoconjugado y/o el antígeno al que está
unido está/están internalizados en la célula, obteniéndose una
eficacia terapéutica mayor del inmunoconjugado en el extermi-
nio de las células cancerosas, sobre las que se fija. En una
5 forma preferida de ejecución, el agente citotóxico se dirige
contra o interfiere en el ácido nucleico de la célula cancero-
sa. Los ejemplos de estos agentes citotóxicos incluyen a los
maitanosinoides, las calioheamicinas, las ribonucleasas y las
endonucleasas de DNA. Los inmunoconjugados preferidos son los
10 inmunoconjugados de rituximab-maitanosinoide similares al
trastuzumab-DM1 (T-DM1) descritos en WO 2003/037992, con mayor
preferencia el inmunoconjugado T-MCC-DM1.

Para la aplicación subcutánea, la formulación puede ad-
ministrarse con un dispositivo apropiado, por ejemplo una je-
15 ringuilla (pero sin limitarse a ella); un dispositivo de in-
yección (p.ej. el dispositivo INJECT-EASE™ y GENJECT™); una
bomba de infusión (p.ej. Accu-Chek™); una pluma inyectora (por
ejemplo la GENPEN™; un dispositivo sin jeringuilla (p.ej.
MEDDECTOR™ y BIOJECTOR™); o mediante un sistema de administra-
20 ción de parche subcutáneo.

La cantidad a administrar de dicha formulación de anti-
cuerpo 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
25 salud del paciente a tratar y de la severidad de la enfermedad
o estado patológico a tratar. Es también importante en el mo-
mento de determinar correctamente la dosis el curso de la en-
fermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventi-
.

vos 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, aprox. de 1 µg/kg a 50 mg/kg (p.ej. 0,1-20 mg/kg) de dicho anticuerpo anti-CD20 es una dosis inicial a probar para la administración al paciente.

10 La dosis preferida de dicho anticuerpo anti-CD20 se situará en el intervalo comprendido entre aprox. 0,05 mg/kg y aprox. 30 mg/kg de peso corporal. Por lo tanto, se podrá administrar al paciente una o más dosis de aprox. 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, p.ej. 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. En base a los estudios clínicos (ver también los ejemplos 3 y 4 de ilustración no limitante del rituximab), la dosis preferida se
25 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 aprox. 375 mg/m²,
.

aprox. 625 mg/m² y aprox. 800 mg/m². Son también preferidas las dosis fijas de dicho anticuerpo anti-CD20.

En una forma de ejecución, las dosis fijas para el caso de linfomas de células B, con preferencia el linfoma no de Hodgkin, son las siguientes. Son preferidos de aprox. 1200 mg a 1800 mg de dicho anticuerpo anti-CD20 por dosis. Son más preferidas las dosis elegidas entre el grupo formado por aprox. 1300 mg, aprox. 1500 mg, aprox. 1600 mg y aprox. 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, con preferencia pacientes de linfoma no de Hodgkin, situada en torno a 1400 mg de dicho anticuerpo anti-CD20 (p.ej. el 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).

En otra forma de ejecución, las dosis fijas para los pacientes de leucemia, con preferencia 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 forma de ejecución, la dosis fija para los pacientes de leucemia,

con preferencia los pacientes de CLL, se sitúa en unos 1870 mg de dicho anticuerpo anti-CD20 (p.ej. el rituximab) por dosis.

En otra forma de ejecución 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 (p.ej. el rituximab) por dosis.

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).

La formulación farmacéutica estable del anticuerpo anti-CD20 farmacéuticamente activo según la invención se administra con preferencia en forma de inyección subcutánea, repitiéndose con preferencia la administración varias veces a intervalos de 3 semanas (q3w). Con preferencia especial, el volumen total de líquido inyectado se administra en un período de tiempo de 1 a 10 minutos, con preferencia de 2 a 6 minutos, con preferencia .

especial de 3 ± 1 minutos. Con preferencia especial, se administran 2 ml/minuto, es decir, por ejemplo aprox. 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 según la presente invención llevará asociada con mucha probabilidad una frecuencia y/o intensidad reducidas de las reacciones derivadas de la infusión.

En una forma preferida de ejecución, el medicamento es útil para prevenir o reducir la metástasis o la posterior diseminación en dicho paciente, que sufre un cáncer que expresa la 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 forma preferida de ejecución, el medicamento es útil para aumentar el índice de respuesta en un grupo de pacientes.

En el contexto de esta invención pueden utilizarse uno o más agentes inhibidores del crecimiento, citotóxicos, quimio-

terapéuticos, anti-angiogénicos, anti-cancerosos o citoquinas o compuestos que intensifican los efectos de estos agentes en el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 del cáncer que expresa la CD20. Con preferencia se emplea un tratamiento con el
5 anticuerpo anti-CD20 sin agentes citotóxicos, ni quimioterapéuticos ni anti-cancerosos adicionales, y sin compuestos que intensifiquen los efectos de estos agentes.

Tales agentes incluyen, por ejemplo: agentes alquilantes o agentes que tienen acción alquilante, por ejemplo la ciclo-
10 fosfamida (CTX; p.ej. Cytosan[®]), clorambucilo (CHL; p.ej. Leukeran[®]), cisplatino (CisP; p.ej. Platinol[®]), busulfano (p.ej. Mileran[®]), melfalan, carmustina (BCNU), estreptozotocina, tri-etilenomelamina (TEM), mitomicina C y similares; anti-metabolitos, por ejemplo el metotrexato (MTX), etoposido
15 (VP16; p.ej. Vepesid[®]), 6-mercaptopurina (6MP), 6-tioguanina (6TG), citarabina (Ara-C), 5-fluoruracilo (5-FU), capecitabina (p.ej. Xeloda[®]), dacarbazina (DTIC) y similares; antibióticos, por ejemplo la actinomicina D, doxorubicina (DXR; p.ej. Adriamicina[®]), daunorrubicina (daunomicina), bleomicina, mi-
20 tramicina 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 (p.ej. Taxol[®]) y los derivados de paclitaxel; los agentes citostáticos, glucocorticoides como la dexametasona (DEX; 25 p.ej. Decadron[®]) y los corticosteroides tales como la prednisona; inhibidores enzimáticos nucleósidos, por ejemplo la hidroxiurea, 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 (p.ej. Ethyol®), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, lomustina
5 (CCNU), doxorubicina lipo (p.ej. Doxil®), gemcitabina (p.ej. Gemzar®), daunorubicina lipo (p.ej. Daunoxome®), procarbazona, mitomicina, docetaxel (p.ej. Taxotere®), aldesleucina, carboplatino, oxaliplatino, cladribina, camptotecina, CPT 11 (irinotecan), 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), floxuridina,
10 fludarabina, ifosfamida, idarrubicina, mesna, interferon beta, interferon alfa, mitoxantrona, topotecan, leuprolida, megestrol, melfalan, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, tamoxifeno, teniposido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza
15 de uracilo, vinorelbina, clorambucilo. Con preferencia, el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 se realiza sin tales agentes adicionales.

El uso de los agentes citotóxicos y anticancerosos antes descritos y de los fármacos anticancerosos antiproliferativos
20 específicos de su diana, por ejemplo los inhibidores de las proteína-quinasa, en los regímenes quimioterapéuticos está en general bien caracterizado en las técnicas de terapia del cáncer y su emplea estará sometido a las mismas consideraciones de tolerancia de seguimiento y de eficacia y para el control
25 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 histocul-

tivo. En general, la dosis se reducirá por comparación con la cantidad que se emplea en ausencia de otros agentes adicionales.

Las dosis típicas de agente citotóxico eficaz pueden situarse dentro de los intervalos recomendados por el fabricante y cuando proceda por las respuestas "in vitro" o las respuestas obtenidas en modelos animales, pudiendo reducirse hasta en aprox. 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.

En el contexto de esta 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 esta 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.

vos. Con preferencia se emplea el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 sin radiación ionizante.

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 aprox. 1,8 - 2,0 Gy, durante 5 días por semana. En una forma preferida de ejecución de esta 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, opcio-

nalmente 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 no se limitan a 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 citoquina, 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 forma de ejecución 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 (p.ej. 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.

(p.ej. 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 según la presente invención es con preferencia 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 según 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. Todas las citas de la bibliografía técnica y de patentes se incorporan a la presente como referencias.

Ejemplos

Las formulaciones de anticuerpo anti-CD20 para la administración subcutánea según 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 el 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 EP-B-2000149, en un cultivo celular a partir del banco de células originales (master cell bank). Se recolecta el anticuerpo monoclonal rituxi-
5 mab 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/
10 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
15 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 aproximada-
20 mente 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
25 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
5 realiza un paso de filtración de virus y se concentra el material filtrado de la partida.

Los demás excipientes de la formulación según 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.
10

Las formulaciones líquidas de producto farmacológico para la administración subcutánea según 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 aprox. 200 mg/ml. Una vez finalizada la operación de diafiltración se añaden los excipientes
15 (p.ej. 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 aprox. 120 mg/ml.
20

Todas las formulaciones se filtran en condiciones estériles a través de filtros de baja fijación 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
25

tapas de aluminio corrugado de tipo "alucrimp". El volumen envasado es de aprox. 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
5 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;
- 10 2) cromatografía de exclusión de tamaños (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.

15 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 aprox. 0,5 mg/ml con el correspondiente tampón de formulación. Se
20 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
25 dilución, que se ha determinado a partir de las masas pesadas y las densidades de la muestra tal cual y el tampón de dilu-

ción. 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 de tamaños (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 el 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.

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

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

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.

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

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 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.

condi- ciones de almace- naje	tiempo de alma- cenaje	concen- tración de proteína (mg/ml)	HPLC - exclusión de tamaños			HPLC - intercambio iónico		turbidez (FTU)	partículas visibles	activi- dad enzi- mática (U/ml)
			HMW (%)	monó- mero (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	inicial	127	1,6	98,4	0,0	26	62	4,9	libre de partículas	12619
agita- ción 5°C	1 semana	125	1,5	98,4	0,0	n.d.	n.d.	4,3	libre de partículas	12507
agita- ción 25°C	1 semana	123	1,5	98,4	0,1	n.d.	n.d.	4,3	libre de partículas	12923
conge- lación/ des- conge- lación	(5 ciclos)	124	1,5	98,4	0,0	n.d.	n.d.	4,4	esencial- mente libre de partículas	12394
5°C	7 sema- nas	125	1,5	98,4	0,0	26	63	5,0	esencial- mente libre de partículas	10030
	19 sema- nas	123	1,5	98,5	0,1	26	62	4,7	libre de partículas	15324
	26 sema- nas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.
25°C	7 sema- nas	n.d.	1,6	97,7	0,7	25	62	4,9	libre de partículas	13099
	19 sema- nas	n.d.	1,6	97,2	1,2	24	61	5,1	libre de partículas	13031
	26 sema- nas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.
40°C	7 sema- nas	n.d.	2,6	94,8	2,6	17	60	28,7	libre de partículas	n.d.
	19 sema- nas	n.d.	3,6	90,5	6,0	9	56	51,9	libre de partículas	n.d.

5 n.d. = no determinado

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.

condi- ciones de alma- cenaje	tiempo de alma- cenaje	concen- tración de proteína (mg/ml)	HPLC - exclusión de tamaños			HPLC - intercambio iónico			turbidez (FTU)	partículas visibles	activi- dad enzi- mática (U/ml)
			HMW (%)	monó- mero (%)	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
agita- ción 5°C	1 sema- na	122	1,8	98,2	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	35,6	libre de partículas	9324
agita- ción 25°C	1 sema- na	125	2,3	97,7	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	35,7	libre de partículas	n.a.
conge- lación/ des- conge- lación	(5 ciclos)	126	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	34,5	libre de partículas	11270
5°C	7 sema- nas	124	1,8	98,2	0,0	3	24	63	38,5	esencial- mente libre de partículas	12854
	19 sema- nas	118	1,7	98,2	0,1	3	26	62	37,6	libre de partículas	11202
	26 sema- nas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		libre de partículas	n.d.
25°C	7 sema- nas	n.d.	1,9	97,4	0,7	2	24	63	40,2	esencial- mente libre de partículas	11645
	19 sema- nas	n.d.	2,1	96,9	1,1	3	24	60	36,9	libre de partículas	14233
	26 sema- nas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		libre de partículas	n.d.
40°C	7 sema- nas	n.d.	3,1	94,3	2,6	5	19	58	101,0	esencial- mente libre de partículas	n.d.
	19 sema- nas	n.d.	4,8	89,4	5,8	7	12	52	385,0	libre de partículas	n.d.

5 n.d. = no determinada

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.

condi- ciones de alma- cenaje	tiempo de alma- cenaje	concen- tración de proteína (mg/ml)	HPLC - exclusión de tamaños			HPLC - intercambio iónico			turbidez (FTU)	partículas visibles	activi- dad enzi- mática (U/ml)
			HMW (%)	monó- mero (%)	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
agita- ción 5°C	1 sema- na	128	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	30,3	libre de partículas	10936
agita- ción 25°C	1 sema- na	127	1,9	98,0	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	29,7	libre de partículas	12595
conge- lación/ des- conge- lación	(5 ciclos)	127	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	32,0	libre de partículas	11442
5°C	7 sema- nas	124	1,8	98,2	0,0	3	24	63	33,8	libre de partículas	11723
	19 sema- nas	122	1,7	98,2	0,1	3	26	62	30,8	libre de partículas	12180
	26 sema- nas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.
25°C	7 sema- nas	n.d.	2,0	97,3	0,7	3	25	62	30,8	libre de partículas	12328
	19 sema- nas	n.d.	2,1	96,9	1,1	4	24	60	31,4	libre de partículas	12017
	26 sema- nas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	libre de partículas	n.d.
40°C	7 sema- nas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5	20	58	84,8	libre de partículas	n.d.
	19 sema- nas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7	11	50	295,0	libre de partículas	n.d.

5 n.d. = no determinada

Ejemplo 3

Tratamiento de pacientes con la formulación

Los regímenes en los que se administra el 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 el 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 el 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 el 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 por lo 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 el 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, el 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 pa-
5 ciente se sitúa entre 4,4 y 15,0 ml. El volumen promedio in-
yectado por unidad de tiempo es de 2 ml/min. Las concentracio-
nes 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
10 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
15 estándar de rituximab i.v. de 375 mg/m².

Conclusión: el rituximab subcutáneo puede administrarse
de modo rápido, confortable y seguro, lográndose una exposi-
ción del suero comparable a la de la formulación intravenosa
aprobada para pacientes Fl durante el tratamiento de manteni-
20 miento. La experiencia del paciente es favorable. Estos resul-
tados animaron a seguir probando el 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.

25 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 con arreglo al ejemplo 1, formulación A) en combinación con CHOP o CVP, o
5 bien (b) el 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
10 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
15 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, opcional-
20 mente en combinación con la quimioterapia (incluido el CHOP o el CVP).