



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 369**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00992499 .4**
96 Fecha de presentación : **10.11.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1227843**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.08.2002**

54

Título: **Método y sistema de eliminar el inhibidor de citoquina en pacientes.**

30

Prioridad: **10.11.1999 US 164695 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.04.2011

73

Titular/es: **BIOPHERESIS TECHNOLOGIES, Inc.**
400 Galleria Parkway, Suite 1950
Atlanta, Georgia 30339, US

72

Inventor/es: **Lentz, M. Rigdon**

74

Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 356 369 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antecedentes de la Invención

5 La invención presente se ubica generalmente en el campo de la mejora de una respuesta inmune, y se refiere particularmente a la eliminación de inhibidores de TNF en un paciente, tal como un paciente de cáncer, para promover la inflamación y por ello inducir la remisión del cáncer.

La terapia convencional del cáncer se basa en el uso de medicamentos y/o radiaciones que destruyen las células replicantes, que se espera sea más rápido que el agente destruyendo las células normales del paciente. La cirugía se ha utilizado para reducir la dimensión del tumor, pero ha tenido poco impacto una vez que el tumor ha hecho metástasis. La radiación es únicamente efectiva en un área localizada.

10 Los tratamientos pueden por sí mismos matar al paciente en ausencia de una terapia de mantenimiento. Por ejemplo, en el caso de algunos tipos de cáncer, los trasplantes de médula ósea se han utilizado para mantener al paciente después del tratamiento con niveles de quimioterapia que podrían resultar fatales. Sin embargo no se ha probado su eficacia en el tratamiento de tumores sólidos. Para el tratamiento de cánceres agresivos se han utilizado los "cocteles" de diversos agentes quimio-terapéuticos y las combinaciones de dosis muy altas de quimioterapia con agentes restauradores, por ejemplo, el factor de estimulación de colonias granulocito-macrófago ("GM-CSF"), la eritropoyetina, el factor de estimulación del granulocito de trombopoetina ("G-CSF"), el factor de estimulación de la colonia de macrófagos ("M-CSF") y el factor de células madre ("SCF"), para restaurar los niveles de plaquetas y glóbulos blancos. Aún mediante el uso de terapia restrictiva o de apoyo, los efectos secundarios son severos.

20 Se han probado otros tratamientos en un intento por mejorar la mortalidad y la morbilidad. Se han intentado vacunas para estimular el sistema inmunológico del paciente, pero sin mucho éxito. Se han utilizado citoquinas solas o en combinación, tales como el factor de necrosis del tumor, el interferón gamma y la interleuquina-2 ("IL-2") para eliminar cánceres, pero no han producido su cura. Más recientemente, se han probado compuestos anti-angiogénicos tales como la talidomida, en casos de uso compasivo y han mostrado remisión del tumor. En estudios con animales, los compuestos que inducen un estado pro-coagulante, tales como un inhibidor de proteína C, se han utilizado para causar la remisión del tumor. Los nuevos estudios han mostrado que los inhibidores de los receptores de citoquina, tales como los receptores del factor de necrosis del tumor ("TNFRs") que se liberan de las células tumorales en forma soluble, en altas concentraciones con relación a células normales, pueden restaurar el ataque del sistema inmunológico a las células tumorales (*Jablonska and Peitruska, Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz) 1997, 45_(5,6), 449-453; Chen, et.al., J. Neuropathol, Exp. Neurol. 1997, 56_(5), 541-550*)

30 La Patente E.E.U.U. No. 4 708 713 a Lentz (D1), describe un método alternativo para el tratamiento del cáncer, que implica ultraforesis para eliminar compuestos basados en el peso molecular, lo que promueve un ataque inmunológico a los tumores a partir de los propios glóbulos blancos del paciente.

Selinsky et al (1998) *Immunology* 94:88-93 (D1) describen la inhibición polifacética de mecanismos inmunes antitumorales por el receptor tipo 1 soluble del factor de necrosis tumoral.

35 Gatanaga et al (1990) *Proc Natl Acad Sci (USA)* 87: 8781-84 (D2) describe la purificación y caracterización de un inhibidor (receptor soluble del factor de necrosis tumoral) para factor de necrosis tumoral y linfoxina obtenida de ultrafiltrados de suero de pacientes humanos de cáncer.

A pesar de todos estos esfuerzos, muchos pacientes mueren de cáncer; otros son terriblemente mutilados. Es poco probable que sea efectiva una terapia única para la cura de todo tipo de cánceres.

40 Es por tanto objetivo de la invención presente aportar un sistema para el tratamiento de tumores sólidos.

Como objetivo adicional de la invención presente se aporta un sistema que no involucra quimioterapia sistémica no-selectiva, extremadamente tóxica.

Resumen de la Invención

45 Se ha desarrollado un método para tratar trastornos caracterizados por la producción de receptores solubles de TNF, tales como muchos tipos de cáncer, y ciertas enfermedades tales como VIH, donde la enfermedad inmunosuprime al paciente. Como aquí se describe, la sangre del paciente es pasada a través de una columna que tiene anticuerpos inmovilizados en ella, que ligan y eliminan las moléculas de receptor soluble de TNF. El proceso puede realizarse solamente o en combinación con otras terapias, incluyendo radiación, quimioterapia (local o sistémica, por ejemplo, tratamientos usando agentes alquilantes, doxirubicina, carboplatino, cisplatino, y taxol, y otros medicamentos que pueden ser sinérgicos en efecto con citoquinas "desbloqueadas"; o factores anti-angiogénicos. Se usan anticuerpos que son inmunoreactivos con el receptor-1 del factor de necrosis de tejido ("TNFR-1") y el receptor-2 del factor de necrosis de tejido ("TNFR-2"),

55 El paciente es preferiblemente tratado diariamente durante al menos tres semanas, y realizados ensayos diagnósticos para verificar que ha habido contracción de los tumores, después el régimen de tratamiento se repite según se necesite. La invención es definida por las reivindicaciones.

Descripción Detallada de la Invención

Los mecanismos de eliminación innatos, naturales y específicos para antígenos representan el mejor arsenal para tratar con las células de melanoma *in vitro* y *in vivo*. Es fundamental para estos mecanismos destructores celulares el factor de necrosis de tumor (TNF-), una citoquina inflamatoria producida por macrófagos y células mononucleares más tempranas y TNF-, una citoquina relacionada producida y secretada por linfocitos T asesinos con receptores específicos para antígenos altamente selectivos, Old L.J., Antitumor activity of microbial products and tumor necrosis factor, y Bonavida B. et al., (eds): Tumor Necrosis Factor/Cachecin and Related Cytokines, Basell, Karger, 1988, p 7; Haranaka K., et al, Cytotoxic activity of tumor necrosis factor (TNF) on human cancer cells in Vitro, Jpn. J Exp. Med. 1981; 51: 191; Urban J.L.II, et al, Tumor necrosis factor: A potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83:5233; Philip R., et el., Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, Gamma-interferon and Interleukin-1, Nature 1986; 323:86; Ziegler-Heitbrock H.W., et el., Tumor necrosis factor as effector molecule in monocyte-mediated cytotoxicity, Cancer Res. 1986; 46:5947; y Feinman R., et al., Tumor necrosis factor is a important mediator of tumor cell killing by human monocytes, J Immunol, 1987; 138:365. Derivan de miles de millones de clones, cada uno con su especificidad propia. Así, un clon de estos linfocitos derivados del timo da lugar a asesinos T (linfocitos citotóxicos), u otras clases funcionales, cada una con una especificad del clon padre. Sus mecanismos están relacionados a ambas toxicidades de tumor celular dependiente e independiente de anticuerpos. Los receptores para TNF en células neoplásicas, infectadas por virus, maduras u otras que sean por otra parte objetivo para destrucción pueden ser a la vez una bendición y una maldición. En un papel positivo, permiten la unión de TNF a la superficie para internalización y destrucción de la célula. Desgraciadamente esta hipótesis receptora tiene un doble filo. Ciertas células neoplásicas tales como melanomas activos secretan grandes cantidades de estos receptores (sTNF-R1 y sTNF-R2) que rápidamente captan TNF antes que pueda situarse en la proximidad de la célula. Haranaka K., et al., Cytotoxic activity of tumor necrosis factor (TNF) on human cancer cells in Vitro, Jpn. J Exp. Med. 1981; 51:191; Urban J.L.II, et al, Tumor necrosis factor: A potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83:5233; Philip R., et el., Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, Gamma-interferon and Interleukin-1, Nature 1986; 323:86; Ziegler-Heitbrock H.W., et el., Tumor necrosis factor as effector molecule in monocyte-mediated cytotoxicity, Cancer Res. 1986; 46:5947; y Feinman R., et al., Tumor necrosis factor is a important mediator of tumor cell killing by human monocytes, J Immunol, 1987; 138:365. Este sirve como un mecanismo de defensa en la parte de la célula objetivo que hace ineficaz el sistema inmune del huésped. TNF-R1 y TNF-R2 han sido caracterizados con respecto a pesos moleculares (55 y 75 kD respectivamente), Old L.J., Antitumor activity of microbial products and tumor necrosis factor, y Bonavida B. et al., (eds): Tumor Necrosis Factor/Cachecin and Related Cytokines, Basell, Karger, 1988, p 7; Langkopf F., et el., Soluble tumor necrosis factor receptors as prognostic factors in cancer patients, Lancet 1994; 344:57-58; Howard S.T., et al., Vaccinia virus homologues of the Shope fibroma virus inverted Terminal repeat proteins and a discontinuous ORF related to the tumor necrosis factor receptor family, Virology 1991; 180:633-664; Mathias S. et al., Activation of the Sphingomyelin signalling pathway intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1b, Science 1993; 259:519-522; y Andrews J.S., et al., Characterization of the receptor for tumor necrosis factor (TNF) and linfotoxina LT) on human T lymphocytes; TNF and LT differ in their receptor binding properties and the induction of MHC class I proteins on a human CD4+ T cell hybridoma, J. Immunol. 1990; 144: 2582-2591. Sirven a la vez para infraregular la respuesta inmune en una manera normal y para suprimir demasiado la respuesta inmune como se ha indicado antes respecto a ciertas malignidades. Son particularmente abundantes, y a alto nivel, en pacientes con melanoma.

A. Moléculas receptoras anti-citoquinas

La eliminación o neutralización selectiva de los TNF-R1 y TNF-R2 solubles (que funcionan como inhibidores de la citoquina) puede usarse para promover una respuesta inflamatoria selectiva segura contra un tumor o células infectadas con un patógeno tal como un virus como VIH o parásito. El agente neutralizante es un anticuerpo reactivo con el receptor. Los anticuerpos son reactivos con las formas solubles del receptor. La ventaja de la eliminación o neutralización selectiva es que el mismo efecto beneficioso se obtiene en el tratamiento del trastorno pero el tratamiento es mucho menos caro y seguro ya que no tiene que administrarse plasma o albúmina exógenos al paciente cuando hay una eliminación selectiva, como en el caso de ultraforesis y se evitan los efectos citotóxicos de la radiación y la quimioterapia.

Los receptores son eliminados mediante ligado a un anticuerpo contra el receptor. Los anticuerpos a los receptores pueden ser inmovilizados en un filtro, en una columna, o usando otras técnicas estándar para reacciones de enlace para eliminar proteínas de la sangre o plasma de un paciente, o administrados directamente al paciente en un portador farmacéuticamente aceptable adecuado tal como suero fisiológico. Como aquí se emplea, anticuerpo se refiere a anticuerpo, o fragmentos de anticuerpo (cadena simple, recombinante, o humanizado), inmunoreactivo contra las moléculas receptoras. En la realización más preferida, el anticuerpo es reactivo con el término carboxi de las moléculas receptoras, por ello evita preocupaciones con la transducción de la señal por el receptor estando aún presente en la superficie de la célula.

Puede obtenerse anticuerpos de varias fuentes comerciales tales como Genzyme Pharmaceuticals. Estos están preferentemente humanizados para administración directa a un humano, pero pueden ser de origen animal si se inmovilizan en un dispositivo extracorporal. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los

anticuerpos y el dispositivo deberían esterilizarse y tratarse para eliminar endotoxina y otros materiales no aceptables para administración a un paciente.

Puede generarse anticuerpos a las proteínas receptoras por técnicas estándar, usando proteínas receptoras humanas. Los anticuerpos son normalmente generados por inmunización de un animal usando un adyuvante tal como un adyuvante de Freund en combinación con una cantidad inmunogénica de la proteína administrada durante un período de semanas en intervalos de dos o tres semanas, después aislados del suero, o usados para hacer hibridomas que expresan los anticuerpos en cultivo. Por causa de que los métodos para inmunizar animales producen anticuerpos que no son de origen humano, los anticuerpos podrían provocar un efecto adverso si se administran a humanos. Son bien conocidos métodos para “humanizar” anticuerpos, o generar menos fragmentos inmunogénicos de anticuerpos no-humanos. Un anticuerpo humanizado es uno en el que solamente son de origen no-humano los lugares reconocidos de antígeno, las regiones hipervariables complementariamente determinantes (CDRs), en tanto que todas las regiones marco (FR) de dominios variables son productos de genes humanos. Estos anticuerpos “humanizados” presentan un menos estímulo de rechazo xenográfico cuando se introducen en un receptor humano.

Para llevar a cabo la humanización de un anticuerpo monoclonal de ratón seleccionado, puede usarse el método de injerto CDR descrito por Daugherty, et al (1991) Nucl Acids Res. 19:2471-2476. En resumen, el ADN de región variable de un ScFv anti-idiotípico recombinante de animal seleccionado es secuenciada por el método de Clarkson, T., et al., (1991) Nature 352:624-688. Usando esta secuencia, los CDRs del animal se distinguen de las regiones marco del animal (FR) basadas en posiciones de los CDRs en secuencias conocidas de genes variables de animales. Rabat., H.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed. (U.S. Dept. Health and Human Services, Bethesda, MD, 1987). Una vez identificados los CDRs y FR del animal, los CDRs se injertan en marco humano de región variable de cadena pesada mediante el empleo de oligonucleótidos sintéticos y recombinación de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se construyen codones para los CDRs de cadena pesada del animal, así como el marco humano de región variable de cadena pesada, en cuatro oligonucleótidos (cada uno de 100 bases de longitud). Usando PCR, se forma una secuencia emparrillada de ADN de 400 bases que se codifica para la protección del CDR animal recombinante/FR humano de cadena pesada .

El estímulo inmunogénico presentado por los anticuerpos monoclonales así producidos puede ser disminuido adicionalmente por el uso de “Recombinant Phage Antibody System” (RPAS) de Pharmacia (Pharmacia LKB Biotechnology, Suecia) que generó un fragmento Fv de cadena simple (ScFv) que incorpora el completo dominio ligante de antígeno del anticuerpo. En el RPAS, los genes variables de anticuerpo de cadena pesada y cadena ligera se amplifican separadamente desde el hibridoma mRNA y se clonan en el vector de expresión. Los dominios de cadena pesada y cadena ligera son co-expresados en la misma cadena de polipéptido después de unirse con un ADN de unión corto que codifica un péptido flexible. Este conjunto generó un un fragmento Fv de cadena simple (ScFv) que incorpora el completo dominio ligante de antígeno del anticuerpo. Comparado con el anticuerpo monoclonal intacto, el ScFv recombinante incluye un número considerablemente bajo de epítomos, y por ello presenta un estímulo inmunogénico mucho más débil cuando se inyecta en humanos.

Los anticuerpos pueden formularse en portadores farmacéuticos estándar para administración a pacientes que los necesiten. Estos incluyen suero fisiológico, solución salina tampón de fosfatos, y otros portadores acuosos, y liposomas, microesferas poliméricas y otros dispositivos de administración de liberación controlada, como es bien conocido en la técnica

Los anticuerpos pueden también administrarse con adyuvante, tal como muramil dipéptido u otros materiales aprobados para uso en humanos (puede usarse adyuvante de Freund para administración de anticuerpos a animales).

En la realización preferida, se inmovilizan los anticuerpos a un soporte sólido, tal como la columna SEPHAROSE™ en los ejemplos, usando técnicas estándar tales como bromuro de cianógeno o kits comercialmente disponibles para acoplar proteínas a membranas formados de materiales tales como nitrocelulosa o policarbonato.

El tratamiento se realiza en un período de tiempo hasta que se observa una indicación positiva. Esto se basa normalmente en ensayos de diagnóstico que muestran que ha habido alguna reducción en el tamaño del tumor o que sugiere inflamación del tumor. El paciente se trata con preferencia diariamente durante tres semanas, se realizan ensayos de diagnóstico para verificar que ha habido contracción de los tumores y/o inflamación, y después se repite el régimen de tratamiento.

Puede requerirse la eliminación quirúrgica (o por vacío) de material necrótico antes o durante el tratamiento para evitar toxicidad asociada con alta carga tumoral.

II. Tratamiento con Terapias Adyuvantes

Sería claramente ventajoso originar remisiones completas. En base al presunto mecanismo de que el proceso elimina inhibidores inmunes producidos por los tumores, especialmente inhibidores de citoquinas y otros mediadores inmunes, es posible tratar los pacientes con terapias adyuvantes o de combinación, lo que mejora los resultados conseguidos con los anticuerpos para los receptores TNF. Estos incluyen compuestos anti-angiogénicos, tales como

talidomida, compuestos procoagulantes, citoquinas y otros inmunoestimulantes. Puede también usarse agentes quimioterapéuticos y/o radiación con la ultraforesis con el tratamiento de anticuerpos.

A. Compuestos Anti-angiogénicos

5 Puede utilizarse cualquier compuesto anti-angiogénico. Los ejemplos de estos incluyen el fumagillol O-sustituido y sus derivados, tales como el TNP-470 descrito en las Patentes EE.UU. No. 5 135 919; No. 5 698 586 y No. 5 290 807 a Kishimoto, et al.; angiostatina y endostatina, descritas en las Patentes U.S. 5 290 807, 5 639 725 y 5 733 876 a O'Reilly; talidomida, tal como se describe en las Patentes U.S. Nos. 5 629 327 y 5 712 291 a DAmato; y otros compuestos, tales como el factor anti-invasivo, ácido retinoico y el paclitaxel, descrito en la Patente U.S. 5 716 981 a Hunter, et al., y los inhibidores de la metaloproteínasa descritos en la Patente EE.UU. No. 5 713 491 a Murphy, et al. La talidomida se administra una vez por día oralmente a razón de 200 mg.

B. Compuestos Pro-coagulantes

15 La proteína C es un zimógeno proteico del plasma dependiente de la vitamina K a una serino proteasa. Cuando se activa, se convierte en un potente anticoagulante. La proteína C activada actúa a través de la proteólisis específica de los cofactores pro-coagulantes, el factor VIIIa y el factor Va. Esta actividad requiere de la presencia de otra proteína dependiente de la vitamina K, la proteína S, calcio y una superficie fosfolípida (presumiblemente celular). Tal como se describe en *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 2da Ed., Colman, R.W., et al., p. 263 (J.B. Lippincott, Philadelphia, PA 1987), la proteína C circula en forma de dos cadenas, con la cadena mayor pesada vinculada a la cadena menor ligera, a través de un enlace simple de disulfida. La proteína C se activa a proteína activada C (APC). La trombina es capaz de activar la proteína C mediante el despegamiento específico del enlace de la Arg₁₂-Leu₁₃ en la cadena pesada. In vivo, en presencia de concentraciones fisiológicas de calcio, la velocidad de esta activación se potencia notablemente cuando la trombina se vincula al cofactor celular endotelial trombomodulina. Mastchiner, et al., *Current Advances in Vitamin K Research*, pp. 135-140, John W. Suttie, ed (Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1988) han revisado en mayor detalle el papel de las proteínas dependientes de la Vitamina K en la coagulación.

25 El bloqueo de las sendas anticoagulantes naturales, en particular la senda de la proteína C, utiliza las propiedades naturales pro-coagulantes del tumor para apuntar a los capilares del tumor provocando la trombosis microvascular, lo que lleva a la necrosis hemorrágica del tumor, tal como se describe en la Patente EE.UU. No. 5 147 638 autorizada a Esmon, et al.. Los ejemplos de tales compuestos incluyen la anti-proteína C y la anti-proteína S.

30 C. Citoquinas

La actividad biológica y la efectividad clínica de las citoquinas pro-inflamatorias es aumentada por la ultraforesis en el paciente con cáncer y otros estados de tolerancia inmunológica adquirida. Específicamente, ambas la TNF alfa y la TNF beta, en dosis de entre aproximadamente 100 a 500 microgramos por metro cuadrado de la superficie corporal (M₂BSA), pueden mejorar la reacción inmunológica en tumores agresivos. La activación de monocitos y linfocitos se aumenta mediante la INF-alfa y la INF-beta y gamma. Los receptores antagonistas IL-1 y IL-2 se eliminan mediante la ultraforesis y por tanto regulan la actividad in vivo de estas citoquinas. Recientemente se ha encontrado una glicoproteína 80kD, responsable de la inhibición de la transformación de blastoides en la malignidad avanzada, en enfermedades infecciosas crónicas y en el embarazo, y parece ser la responsable de la pérdida de reacciones hipersensibles demoradas en estas enfermedades, que es eliminada por este proceso. Esto es significativo porque al eliminar este tipo de supresión, las vacunas de todo tipo funcionan mejor. Los regímenes de dosificación de la IFN-alfa y beta son de 3 M unidades por vía subcutánea tres veces por semana hasta 20 M unidades/M₂ BSA diariamente. El interferón gamma se administra en una dosis entre 100 y 1 000 micgms diarios.

D. Agentes Quimioterapéuticos

45 Los agentes quimioterapéuticos preferentes son agentes que actúan en sinergia con las TNF, por ejemplo agentes alquilantes, doxorubicina, carboplatino, cisplatino y tomoxifeno. El tamoxifeno juega un papel no solo en el bloqueo de receptores de estrógeno sino también ciertos receptores del factor de crecimiento tales como el factor derivado de crecimiento epidérmico ("EDGF"), el factor derivado de crecimiento de fibroblastos ("FDGF") y el factor derivado de crecimiento tumoral ("TDGF"). El TDGF-beta y el factor derivado de crecimiento de plaquetas ("PDGF") y por tanto pueden ser complementarios a la inflamación contra los cánceres provocados por la ultraforesis.

50 E. Radiación

La terapia mediante radiación es destructiva con respecto al tejido normal, haciendo que los tumores se eliminen parcialmente debido a un ataque inflamatorio. La ultraforesis permite el uso de dosis pequeñas de radiación para eliminar las células tumorales residuales sin afectar el tejido normal. En un método preferente, se utiliza la ultraforesis como terapia inicial, seguida de radiación a la mitad aproximadamente de las dosis normales. 55 Está bien establecido que el TNF mata las células tumorales generando radicales libres de oxígeno, radicales de hidroxilo e iones haloideos y que la terapia de radiación genera iones de carbono en el tejido. Por tanto la combinación de ambos es más efectiva respecto a la destrucción de las células cancerosas que cada uno individualmente.

III. Ejemplos

Ejemplo 1: Tratamiento de un paciente con ultraforesis teniendo anticuerpos inmovilizados en el filtro.

Materiales y Métodos

5 Se obtuvo anticuerpo monoclonal de R&D Systems, Minneapolis, Mn, y se purificó para administración a un paciente. Este anticuerpo es reactivo con inhibidores de TNF R1 y R2.

10 Se montó un sistema de filtración usando un filtro EVA Flux 4A como filtro primario para eliminar ultrafiltrado conteniendo esos inhibidores de la sangre del paciente de cáncer. A esta solución de reemplazo se añadieron anticuerpo monoclonal en una dosis de 1 mg por litro de ultrafiltrado normal del anticuerpo monoclonal y 1 mg de anticuerpo monoclonal \$2. En este circuito el ultrafiltrado del filtro inicial 4A fue administrado por una bomba separada de sangre a un filtro Kuraray 3 A. El retenido del filtro 3A se descartó después y el ultrafiltrado del filtro 3A se realimentó a la sangre filtrada del filtro 4A como solución de reemplazo. Para hacer el descarte, es decir, el retenido del filtro 3A, se introdujo ultrafiltrado normal con anticuerpo monoclonal añadido al mismo en el intracircuito entre los filtros 4A y 3A.

Resultados

15 La adición de los anticuerpos monoclonales a sueros de cáncer ultrafiltrados que poseen niveles elevados de los inhibidores disminuye el nivel del inhibidor detectable por el Ensayo Elias a cero.

La adición de los anticuerpos monoclonales al fluido de reemplazo después de la ultraforesis condujo a una mayor reducción de ambos el receptor soluble a TNF R1 y R2 en el ultrafiltrado del segundo filtro.

20 El propósito de esto fue probar si o no este anticuerpo monoclonal de ratón podría capturar el inhibidor y ayudar en su eliminación de la sangre ya que el el complejo de anticuerpo y antígeno no podía pasar a través de los poros del filtro 3A y así ser descartado en el retenido del filtro 3A. Esto fue considerablemente más eficaz que la simple técnica de separación y reemplazo con ultrafiltrado normal. Hubo también una respuesta inflamatoria específica del tumor al hacer esto y una velocidad mayor de destrucción del tumor. Estos experimentos indican con fuerza que el anticuerpo monoclonal, preferiblemente humanizado a 97% a 99% de forma humana por sustitución de regiones constantes humanas por regiones constantes humanas en el anticuerpo, preservan su capacidad de captura y neutralización con las regiones variables de ratón del anticuerpo y usan el anticuerpo como el medicamento terapéutico en ensayos clínicos con una alta expectativa de que neutralizaría receptores solubles a TNF y causaría destrucción del tumor en un humano.

30 **Ejemplo 2. Tratamiento de un paciente con mAB a receptores TNF**

Se trató a una paciente con metástasis vaginal de cáncer de colon durante una semana con una infusión de tres horas de anticuerpo monoclonal a receptor 1 TNF y receptor 2 TNF. Esto condujo a una reducción del 75% en el tamaño del tumor en una semana.

Ejemplo 3. Tratamiento de paciente con melanoma

35 Se describe un procedimiento en formato de informe de caso, que utiliza aféresis y cromatografía de afinidad inmunológica para tratar un paciente d melanoma con necesidad a corto plazo y pronóstico de debilitamiento a largo plazo.

40 Estudios previos utilizando ultrafiltración, con cribado selectivo de poro pasando plasma del paciente a través de cartuchos, han mostrado reducción de los niveles de sTNF-R1 y R2. El período d este procedimiento parece ser de suficiente longitud para permitir al TNF rebotar y producir selectivamente apoptosis o desarreglos de membrana de las células de melanoma. Gatanaga., et al., Identification of TNF-LT blocking factor(s) in the serum and ultrafiltrates of human cancer patients, Lymphokine Res. 1990;9:225-9. En lugar de usar cartuchos de ultrafiltrado, este sistema de aféresis se acopló a columnas en paralelo de gel Sepharose®, una de las cuales contenía anti TNF-R1 humano monoclonal y la segunda anti TNF-R2. El concepto de preparaciones de cromatografía de afinidad ha estado disponible técnicamente para separación y purificación de proteínas, y mejorado durante los últimos 30 años, Ey, P.L., et al, Isolation of pure IgG1, IgG2a, e IgG2b, immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose, Immunochemistry 1978; 15: 429-436. Este tipo de dispositivo representa uno de los pocos ejemplos de ligar la producción *in vivo* de inhibidores de TNF a la eliminación y *in vitro* y devolución al paciente del plasma extraído purificado para evitar reducción de fluido.

50 El paciente es un caballero ruso d 55 años con melanoma metastático. El paciente fumaba 2-3 cajetillas de cigarrillos al día durante unos 20 años. Abandonó su hábito hace varios años. También fue un gran bebedor de alcohol en años pasados pero había reducido su ingesta a 1-2 vasos de vino al día. La revisión de su medicación es esta fecha reveló 4 mg de metilprednisolona por la mañana y 4 mg por la tarde. Aparentemente esto estaba siendo tomado como terapia de sustitución para supresión corticosuprarrenal que se graduó iatrogénicamente en el momento de tratamiento de su alveolitis (ver más adelante). Adicionalmente estaba tomando analgésicos

55

narcóticos. De niño sufrió las usuales enfermedades infantiles, niega reumatismo, escarlatina o difteria. De adulto no tuvo enfermedades médicas importantes salvo las antes descritas. No ha tenido operaciones quirúrgicas importantes en el pasado y no tiene alergias conocidas.

5 Su historia de enfermedad actual comenzó en Noviembre de 1995 cuando notó crecimiento de un lunar facial derecho que sangraba y crecía durante un año. Este se trató inicialmente por crioterapia. Volvió a crecer tras dos meses y fue extirpado. La histología fue de un melanoma maligno (nivel Clark desconocido). El desarrollo del escenario fue negativo e incluyó escaneados TC de la cabeza, cuello, pecho y abdomen. Permaneció libre de enfermedad hasta Marzo de 1996 cuando desarrolló adenopatía cervical derecha y submentoniana derecha. El escaner TC preoperatorio de la cabeza, cuello, pecho y abdomen confirmó la adenopatía cervical derecha pero no reveló otros lugares de metástasis. En Junio de 1996 se sometió a una re-excisión con una disección radical de cuello derecho. En este material, se confirmó histológicamente que un ganglio linfático tenía melanoma. El paciente fue tratado con una tanda de Vindesine 3 mg/m² cada tres semanas, Dacarbazine 100 mg/m² cada tres semanas durante cuatro ciclos. Subsiguientemente desarrolló metástasis cutánea en la piel de su hombro derecho, metástasis múltiples a las cicatrices en el cuello anterolateral izquierdo y metástasis axilares múltiples tratadas con quince excisiones subsiguientes de metástasis recurrentes. En Marzo de 1999 se le ofreció una prueba de interleuquina-2 pero en la misma desarrolló toxicidad pulmonar severa que tenía un curso prolongado y se le diagnosticó alveolitis fibrosa isiopática. Se interrumpió la interleuquina-2 y recibió terapia de radiación en su cuello y axila derechos durante seis semanas comenzando en el mes de Mayo de 1999. Desarrolló dolor en la parte baja de la espalda en Agosto de 1999. Los estudios en Octubre de 1999 revelaron metástasis ósea del cuerpo vertebral de T-11 y la subsiguiente RM reveló un proceso destructivo lítico en el proceso transversal derecho y el pedículo de la 11^a vértebra torácica, así como sustitución completa del cuerpo vertebral en T-11. Se apreciaron metástasis adicionales en el cuerpo vertebral de la 9^a vértebra torácica así como en la 10^a. También había afectación de los cuerpos vertebrales L-1 y L-2. Visto otra vez el tumos en Marzo de 2000 reveló crecimiento de forma posterior desde el cuerpo medio de la 11^a vértebra torácica al canal espinal en 7,4 a 7,8 mm con posterior desplazamiento de la médula espinal. El escaneado TC del pecho, abdomen y pelvis reveló múltiples posibles metástasis del hígado pero ninguna otra sugerencia de metástasis viscerales.

10 El paciente fue entonces considerado para un ensayo de UltraPheresis™ en un esfuerzo por reducir receptores solubilizados al factor de necrosis de tumor, ambos sTNF-R1 y sTNF-R2. Como no existían en Moscú instalaciones para la aplicación de esta forma de intercambio semi-selectivo de plasma, se exploró la separación de inhibidores en columna de afinidad. Anticuerpos monoclonales contra sTNF-R1 y R2 entregados al Cardiology Research Center n Moscú para el Dr. Sergei N. Petrovsky, PhD, jefe del grupo para Affinity Sorbents for Medicine, Pocard, Ltd., 3-rd Cherepkovskaya str., 15a, Moscú, 121552, Rusia. Noventa miligramos de anticuerpo monoclonal anti sTNF-R1 y 180 miligramos de anticuerpo monoclonal anti sTNF-R2 se ligaron con Sepharose® estéril usando bromuro de cianógeno en una columna de vidrio descrita previamente para uso en la tecnología lipipack de columna absorbente de colesterol. La particular metodología usada está bien descrita y está disponible comercialmente en Rusia para el desarrollo de estas columnas absorbentes de LDL. Las columnas fueron preparadas bajo condiciones estériles, en una instalación GSIO 9.001. Se sometieron a pruebas de endotoxina, cultivos virales, fúngicos y bacterianos, y se prepararon para uso humano bajo Consentimiento Informado escrito y bajo aprobación del Hospital medical Center del presidente del Kremlin.

15 El 2 Mayo 2000 el examen físico del paciente era el de un hombre bien desarrollado, bien nutrido, que aparentaba la edad que tenía. El examen de su cabeza reveló una distribución y textura normal de cabello. Sus membranas timpánicas y canales auditivos externos estaban limpios. Las pupilas estaban redondas, reactivas a la luz y la acomodación EOM intacta. El examen funduscópico era normal. Tenía in injerto cicatrizado en su mejilla inferior derecha y muchas cicatrices en su cuello anterolateral derecho lo que era coherente con su historial de anterior disección radical de cuello. No había masas patológicas demostrables dentro de la piel, la cicatriz, o gangliospatológicos apreciados sea en los ganglios cervicales o las fosas supraclaviculares bilateralmente. Sus pulmones estaban claros a la auscultación y percusión. Su precordio demostraba un PMI no desplazado, S1 y S2 normal sin extrasístole, murmullo o fricción. Con el brazo derecho extendido había 3+linfedema. La axila derecha se examinó escasamente debido a las múltiples cicatrices en la zona pero no se apreciaron ganglios palpables. Su abdomen era ligeramente obeso. Su hígado y bazo eran normales al examen físico. Su sistema linfático axilar no era apreciable. Los genitales eran los de un hombre maduro sin masa patológica. Las extremidades inferiores no revelaron edema, cianosis o dedos hipocráticos y mostraban movilidad completa. Su examen neurológico incluyó un estado mental normal. Los nervios craneales 2-12 estaban intactos. Sus DTR eran 2+ y simétricas. El examen motor y sensorial fue normal. El examen de su cerebelo no reveló disimetría, disartria o disidiadocokinesia. Estaba básicamente confinado en la cama debido solamente a dolor de espalda, pero era capaz de rodar de izquierda a derecha sin ayuda. Había estado confinado a una silla de ruedas durante los dos meses anteriores debido a dolor de espalda y estaba llevando un aparato de apoyo trasero que se retiró para el examen médico.

20 Sus parámetros de laboratorio incluyeron una hemoglobina de 8,8 g, WBC 2.800 con diferencial normal. Su recuento de plaquetas era 121.000. Su panel metabólico completo no tuvo nada especial y la fosfatasa alcalina era normal.

Un escáner MRI del cuerpo vertebral torácico 11 reveló una masa haciendo presión sobre la médula espinal. Fue hecho durante la semana anterior a la terapia intensiva comenzada en Abril de 2000 y continuando a lo largo de Mayo.

5 En el primer día se insertó una cánula de plástico de calibre 18 en la vena antecubital izquierda. Una segunda se instaló en la vena safena mayor derecha de la pierna. El paciente se conectó a un separador de plasma estándar Cobe Spectra. Se recogieron luego seiscientos cc de plasma y se sustituyeron con 5% de albúmina en suero fisiológico. El plasma del paciente se bombeó luego a la columna uno que contenía 45 mg de anticuerpo monoclonal anti sTNF-R1 y luego se pasó a la columna dos que contenía 90 mg de anticuerpo monoclonal anti sTNF-R2. El material eluado de la columna se analizó luego para averiguar el nivel de cada inhibidor remanente en el plasma y luego se inyectaron 50 cc de ese plasma al paciente al final de la aféresis para buscar cualquier reacción febril o reacción alérgica. Toleró esto sin efecto clínico adverso aparente.

10 Los análisis subsiguientes del plasma del paciente y el eluado de la columna revelaron que la columna fue capaz de capturar esencialmente todo el inhibidor que se le presentó en este volumen de plasma de 600 ml. El paciente permaneció en el hospital esa noche y en la mañana del 4 de Mayo, fue traído nuevamente de la habitación del hospital a la sala de aféresis. Tuvo una tarde cómoda y comió una cena y un desayuno normales. Los IV se instalaron en los mismos lugares. El paciente fue vuelto a unir a la máquina Cobe Spectra y en esta fecha, se recogieron 3 l de plasma y se pasaron a la columna como antes se ha descrito de forma continua hasta que se trataron los 3 litros de plasma.

15 Su nivel de R1 antes del tratamiento era 1500 y después del tratamiento era 1450. Su nivel de R2 antes del tratamiento era 5000 y después del tratamiento era 3800 en esta fecha. Toleró bien de nuevo el procedimiento sin efectos clínicos adversos y sin aumento del dolor de su espalda.

20 En el tercer día el 6 de Mayo, se repitió el tratamiento. Se trataron otra vez tres litros de plasma en la columna de forma idéntica a la descrita. Su R1 pretratamiento era 2300, post-tratamiento 1600. Su R2 pretratamiento era 5200, post-tratamiento 3200. Al final de cada tratamiento las columnas se lavaron con tampón glicina a un pH de 2,5 para eluar al inhibidor ligante de ellas y medirlos cuantitativamente. Se determinó que a estas cantidades de plasma tratado las columnas no estaban saturadas y se eliminaban cantidades significativas de inhibidor.

25 Su cuarto tratamiento fue el 7 de Mayo. Se aumentó a 4 litros de plasma tratado. Se repitieron los procedimientos cada día con escalaciones graduales en la cantidad de plasma tratado hasta un máximo plasma tratado de 8 litros en los días 10, 11, 12, 13 y 14 de Mayo. El 16 de Mayo, se usaron dos columnas en paralelo, aumentando así la cantidad de plasma entregado a cada columna en 30 ml por minuto, para un total de 60 ml de plasma por minuto. Esto resultó en un R1 de pretratamiento de 2600 y un post-tratamiento de 1700, R2 de pretratamiento de 4250 y llegó a post-tratamiento de 2700,

30 Fue a continuación tratado con 8 litros de plasma al día usando el método de la doble columna. El 21 de Mayo se le hizo un escáner CAT repetido de su columna que reveló la completa resolución del tumor. Tres días más tarde, se le repitió un MRI que se comparó con el MRI pretratamiento y confirmó una respuesta completa. Sus médicos así como neurocirujanos siguieron cuidadosamente al paciente en el hospital, y le siguieron con frecuencia diaria preocupándose por sangrado o hinchazón del tumor en sus lugares estrechos y anatómicamente peligrosos pero afortunadamente el paciente disfrutó de una respuesta completa sin aparentes efectos adversos.

35 Para los detalles del tratamiento diario en términos de volúmenes, columnas, velocidades de flujo de sangre y velocidades de flujo de plasma ver Tabla 1.

40 El paciente ha tenido una aparentemente completa respuesta sin efectos adversos significativos. Fue capaz de levantarse y andar tras el cuarto procedimiento. Este caso es coherente con las observaciones de que puede lograrse en el melanoma una respuesta saludable al tumor eliminando receptores solubles de TNF. Esta columna es tan específica que elimina sólo sTNF-R1 y R2 y esa es la única explicación para la respuesta que este hombre ha tenido desde un punto de vista oncológico. Se observó un gran rendimiento de la columna en el tercer día de tratamiento para sTNF-R2 con modulación para los siguientes días de tratamiento a lo largo de este procedimiento de quince días. R1 tuvo un pico en el día 7 de tratamiento con la cantidad eliminada total de 6 millones pg. Esto también se moduló durante el curso de los tratamientos pero nunca se aproximó a la marca de 16 millones pg establecida por sTNF-R2.

45 El examen radiográfico en el día siguiente a su primera serie de quince días de aféresis con extracción de R1 y R2 por columna de afinidad no reveló melanoma y sí una reducción considerable de la lesión en la cuarta vértebra lumbar. Actualmente el paciente sigue activo, con buen apetito, anda normalmente y su dolor de espalda ha mejorado mucho. Tiene expectativas positivas para su segunda serie de tratamientos de aféresis.

50 **Ejemplo 4. Producción de Anticuerpos Policlonales para SNTF R1 y R2; Preparación de Columna para Tratamiento de Pacientes**

55 Se produjeron anticuerpos policlonales en conejos blancos de Nueva Zelanda inyectados con antígeno recombinante, receptor soluble de factor de necrosis de tumores (^αSNTF) R1 y R, inyectados en el conejo en un protocolo estándar de inmunización, luego estimulados. Pueden producirse 200 mg de anticuerpo policlonal contra

5 SNTF R1 y R2, por litro. Los animales serán sangrados mensualmente. 200 mg de anticuerpo pueden unirse de forma segura a 200 mg de gránulos de SEPHAROSE™. El ligado se hace con etanolamina y periodato. El ligado resulta ser excelente. Esta matriz se coloca luego en una columna de 200 mg de policarbonato. Cada etapa se hace en forma aséptica y el producto final es luego esterilizado totalmente con protocolos estándar de radiación y sujeto a ensayos estándar USA para agentes pirógenos e infecciosos.

Esta cantidad de anticuerpo es bastante para eliminar SNTF R1 y SNTF R2 en agua extracelular humana suficiente para reducir el nivel de 10.000pg por ml a debajo de 1.000 pg por ml en dos a tres horas de intercambio de plasma.

10 El uso de las columnas para reducir niveles de inhibidores a menos de 1000 pg/ml en un período de al menos tres semana ha resultado en remisiones de entre 40 y 90% en pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama y melanoma.. Por ello se puede predecir que el tratamiento da como resultado una respuesta inflamatoria específica del tumor bastante consistente y la mayoría de pacientes que tienen los tipos de tumores más comunes, incluyendo de mama, de pulmón de células pequeñas, de colon, de ovario, hepático, melanoma, y carcinoma de células renales así como cánceres de ovario y de endometrio deberían responder al tratamiento. En combinación con anticuerpos contra receptor de factor de crecimiento endotelial vascular y/o receptor de factor de crecimiento epidermal y/o anticuerpos contra factor de crecimiento derivado de fibroblasto y transformando el receptor de factor de crecimiento, sea singularmente o en combinación, se espera que el tratamiento produzca respuestas excelentes en esos tipos de tumores y puede jugar asimismo un papel en la gestión clínica de trastornos hematopoyéticos.

20 Los métodos y sistemas aquí desvelados son útiles para el tratamiento de pacientes con cáncer, trastornos mediados por el sistema inmune, parasitismo crónico, algunas enfermedades virales especialmente enfermedades virales como VIH que causa inmunosupresión, y otros trastornos caracterizados por niveles elevados de receptores de TNF o inhibidores a IL-2, IL-6, interferón gamma, u otras señales pro-inflamatorias así como activación de glóbulos blancos. Un ejemplo demuestra eficacia en el tratamiento de un paciente de cáncer.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo extracorporal a través del cual puede ser circulada sangre o plasma de un paciente antes de ser devuelta al paciente,
dicho dispositivo teniendo inmovilizados en él anticuerpos que se unen selectivamente a moléculas solubles de receptor 1 de TNF y anticuerpos que se unen selectivamente a moléculas solubles de receptor 2 de TNF,
y en el que la unión de los anticuerpos a la molécula soluble de receptor de TNF elimina la molécula soluble de receptor de TNF de la sangre o plasma del paciente.
2. El dispositivo extracorporal de la Reivindicación 1, en el que los anticuerpos y el dispositivo han sido esterilizados y se ha eliminado endotoxina de los anticuerpos y el dispositivo.
3. El dispositivo extracorporal de cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2, en el que el dispositivo es una columna adsorbente que elimina selectivamente dichas moléculas solubles del receptor de citoquina de la sangre o plasma.
4. El dispositivo extracorporal de la Reivindicación 3, en el que la columna puede adsorber los receptores solubles de TNF presentes en 600 ml de plasma.
5. El dispositivo extracorporal de la Reivindicación 3, en el que la columna puede adsorber los receptores solubles de TNF presentes en 4.000 ml de plasma.
6. El dispositivo extracorporal de cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2, en el que el dispositivo comprende un filtro sobre el que se inmovilizan los anticuerpos.
7. El dispositivo extracorporal de cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 que además comprende un filtro o centrifugador primario para separar ultrafiltrado o plasma de la sangre de un paciente.
8. El dispositivo extracorporal de cualquiera de las Reivindicaciones 1-7 que además comprende una cánula y tubos adecuados para conectar el dispositivo al paciente.
9. El dispositivo extracorporal de cualquiera de las Reivindicaciones 1-8, en el que los anticuerpos son anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo o anticuerpos de cadena simple.
10. Uso de anticuerpos que se unen selectivamente a moléculas solubles de receptor 1 de TNF y anticuerpos que se unen selectivamente a moléculas solubles de receptor 2 de TNF, en la fabricación de un dispositivo extracorporal que tiene dichos anticuerpos inmovilizados en él para inducir una respuesta inmune contra tejido transformado, infectado o enfermo en un paciente mediante circulación de sangre o plasma del paciente a través del dispositivo de manera que dichos anticuerpos se unen a las moléculas solubles de receptor de citoquina en la sangre o plasma del paciente, eliminando por ello las moléculas solubles de receptor de TNF de la sangre o plasma del paciente, y devolviendo la sangre o plasma al paciente.
11. El uso de la Reivindicación 10, en el que los anticuerpos y el dispositivo han sido esterilizados y se ha eliminado endotoxina de los anticuerpos y el dispositivo.
12. El uso de cualquiera de las Reivindicaciones 10 u 11, en el que el dispositivo es una columna adsorbente que elimina selectivamente dichas moléculas solubles del receptor de citoquina de la sangre o plasma.
13. El uso de la Reivindicación 12, en el que la columna puede adsorber el receptor soluble de TNF presente en 600 ml de plasma.
14. El uso de la Reivindicación 12, en el que la columna puede adsorber el receptor soluble de TNF presente en 4.000 ml de plasma.
15. El uso de cualquiera de las Reivindicaciones 10 u 11, en el que el dispositivo comprende un filtro sobre el que se inmovilizan los anticuerpos.
16. El uso de cualquiera de las Reivindicaciones 10^a 15, en el que los anticuerpos son anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo o anticuerpos de cadena simple