

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 637**

51 Int. Cl.:

A61M 1/36 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61M 1/34 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08007944 .5**

96 Fecha de presentación: **29.04.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1949915**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **Método y sistema para retirar TNFR1, TNFR2, y IL2R soluble en pacientes**

30 Prioridad:

30.04.2004 US 566741 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

26.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

26.12.2012

73 Titular/es:

**BIOPHERESIS TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
400 GALLERIA PARKWAY, SUITE 1950
ATLANTA, GA 30339, US**

72 Inventor/es:

LENTZ, RIGDON M

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 393 637 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

Método y sistema para retirar TNFR1, TNFR2, Y IL2R soluble en pacientes

Antecedentes de la Invención

Esta solicitud reivindica la prioridad a U.S.S.N. 60/566,741 presentada en Abril 30, 2004.

5 La presente invención de manera general se encuentra en el campo del mejoramiento de una respuesta inmune, y particularmente se relaciona con el retiro de receptores del factor de necrosis de tumor soluble ("sTNFR1", "sTNFR2") y los receptores 2 de interleuquina solubles ("sIL2") en un paciente, tal como un paciente con cáncer, para promover la inflamación y por lo tanto inducir la remisión del cáncer.

10 La terapia de cáncer convencional se basa en el uso de fármacos y/o radiación que mata las células replicantes, es de esperar sea que más rápido que los agentes que matan las células normales del paciente. Se utiliza cirugía para reducir el volumen del tumor, pero tiene poco impacto una vez que el cáncer ha hecho metástasis. La radiación es solo efectiva en un área localizada.

15 Los tratamientos pueden por sí mismos matar al paciente, en la ausencia de la terapia de mantenimiento. Por ejemplo, para algunos tipos de cáncer, también se han utilizado trasplantes de médula ósea para mantener al paciente luego de tratamiento con cantidades de quimioterapia de otra forma fatal. Sin embargo, no se ha probado la eficacia para el tratamiento de tumores sólidos. Los "Cócteles" de diferentes agentes quimioterapéuticos y las combinaciones de muy altas dosis de quimioterapia con agentes restauradores, por ejemplo, el factor estimulante de colonia de macrófago de granulocito ("GM-CSF"), eritropoyetina, factor estimulante de granulocito de trombopoyetina, ("G-CSF"), factor estimulante de la colonia de macrófago ("M-CSF") y factor de citoblasto ("SCF")
20 para restaurar los niveles de glóbulos blancos y plaquetas, se han utilizado para tratar cánceres agresivos. Incluso con terapia de soporte o restrictiva, son severos los efectos colaterales.

25 Se han ensayado otros tratamientos en un intento por mejorar la mortalidad y morbilidad. Se han realizado vacunas para estimular el sistema inmune del paciente, pero no con gran éxito. Se han utilizado diversas citoquinas, solas o en combinación, tal como factor de necrosis de tumor, interferón gama, y interleuquina-2 ("IL-2") para matar cánceres, pero no producen respuestas clínicas significativas. Más recientemente, se han ensayado compuestos anti-angiogénicos tales como talidomida en casos de uso compasivo y provocan remisión del tumor. En estudios de animales, se han utilizado compuestos que inducen un estado procoagulante, tal como un inhibidor de la proteína C, por provocar remisión del tumor.

30 La Patente Estadounidense No. 4,708,713 de Lentz describe un método alternativo para tratar cáncer, que implica ultrafresis para retirar los compuestos con base en el peso molecular, que promueve un ataque inmune sobre los tumores por las propios glóbulos blancos del paciente. La Patente Estadounidense No. 6,620,382 de Lentz describe un método para retirar las moléculas de menos de 120,000 daltons para provocar una respuesta inmune para inducir remisión. Se retiran las moléculas luego de utilizar un filtro con un corte de peso molecular de 120,000 daltons o menos a través del cual circula el plasma, o utilizar una columna de inmunoglobulina, que contiene anticuerpos para
35 sTNFR u otros inhibidores de citoquina. La ultrafresis y retiro selectivo de las citoquinas solubles han demostrado reducción en la masa de tumor en pacientes con cánceres.

El documento WO-01/37873 describe ultrafresis para retirar el receptor 1 TNF soluble y el receptor 2 TNF soluble del plasma de un paciente para tratar el cáncer.

40 Es un objeto de la presente invención proporcionar un método y sistema para el tratamiento de tumores sólidos a través del retiro selectivo de moléculas del receptor de citoquina soluble que produce mayor reducción del tumor.

Resumen de la invención

45 La presente invención se refiere a un dispositivo estéril para el retiro del receptor 1 del factor de necrosis de tumor soluble (sTNFR1), receptor 2 del factor de necrosis de tumor soluble (sTNFR2), y receptor 2 de interleuquina soluble (sIL2R) de sangre o plasma, dicho dispositivo comprende una composición que comprende socios de unión que se unen al receptor 1 del factor de necrosis de tumor soluble (sTNFR1), receptor 2 del factor de necrosis de tumor soluble (sTNFR2), y receptor 2 de interleuquina soluble (sIL2R) inmovilizado en un material polimérico en una columna o filtro.

50 Se ha desarrollado un método, y sistema, para inducir la remisión en enfermedades caracterizado por el exceso de producción de sTNR y interleuquina 2R. El sistema incluye un medio para la separación de la sangre en glóbulos y plasma, tal como una máquina de plasmaféresis, en donde el plasma luego se trata utilizando una columna o filtro que se ha inmovilizado sobre estos socios de unión tales como anticuerpos para sTNFR1, sTNFR2 y sIL2R, o las citoquinas o porciones de las mismas que se unen a estos receptores, hasta que se reducen los niveles de los

receptores de citoquina soluble por debajo de lo normal, y el plasma tratado regresa al paciente. Esta selección de los socios de unión representa una mejora significativa sobre sistemas tempranos que incluye solo los socios de unión sTNFR, y significativamente reduce las opciones previamente discutidas con respecto al amplio rango de otros materiales que pueden ser deseables para el retiro. En la realización preferida, el sistema incluye un filtro que separa los componentes de la sangre del plasma, o filtrado, que luego se pasa a través de una columna que contiene los anticuerpos policlonales para seleccionar receptores solubles de citoquina que se inmovilizan en una columna que contiene un material tal como SEPHAROSE™. El plasma se hace circular a través de la columna hasta que se alcanza la reducción deseada en los niveles de sTNFR1, sTNFR2, y IL2. En el método preferido, los pacientes se tratan tres a cinco veces a la semana durante cuatro semanas, más preferiblemente diariamente. El proceso se puede realizar solo o en combinación con otras terapias, que incluyen radiación, quimioterapia (local o sistémica, por ejemplo, tratamientos utilizando agentes alquilantes, doxirubicina, carboplatino, cisplatino, y taxol).

En la realización preferida, el plasma se trata de tal manera que se alcanzan los niveles normales para hacer circular los receptores de citoquina solubles (denominados aquí como "inhibidores") dentro de la primer hora de tratamiento. Luego se continúa el tratamiento de tal manera que se reducen los niveles por debajo de lo normal y se mantienen menores que los niveles normales durante un periodo de por lo menos cuatro a cinco horas. Se ha demostrado que los estudios clínicos son importantes para controlar el índice de flujo del plasma a través de la columna. Los índices de flujo típicos del plasma a través de la columna están entre 10 y 100 ml/min, preferiblemente entre 50 y 100 ml/min. Esto se basa en una separación de 100 ml de plasma (filtrado)/min para pasar sangre a través del sistema de plasmaféresis en un índice de 300 ml/min a 500 ml/min.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 es una vista en perspectiva de una columna que contiene anticuerpos inmovilizados.

La Figura 2 es una vista esquemática del proceso de ultraféresis.

La Figura 3a es una gráfica de los niveles de sTNFR1 pre y post-tratamiento durante el ciclo del tratamiento y la cantidad de receptor eluido de las columnas después de cada procedimiento (presentado en ng/10), n = 132.

La Figura 3b es una gráfica de los niveles de sTNFR2 pre y post-tratamiento durante el ciclo del tratamiento y la cantidad de receptor eluido de las columnas después de cada procedimiento (presentado en ng/10), (n = 132).

La Figura 3c es una gráfica de los niveles de sIL2R pre y post-tratamiento durante el ciclo completo del tratamiento y la cantidad de receptor retirado de las columnas después de cada procedimiento (presentado en ng/10), (n = 55).

La Figura 4 es una gráfica de TNFR1, sTNFR2, y sIL2R retirados durante los procedimientos con desempeño estable del dispositivo (procedimientos 3 a 12).

La Figura 5a es una gráfica de las Concentraciones de sTNFR1 y sTNFR2 durante terapia (n = 8).

La Figura 5b es una gráfica de las concentraciones sTNFR1 en el plasma filtrado antes y después de pasar a través de la columna de inmunoféresis (n = 59).

La Figura 5c es una gráfica de las concentraciones sTNFR2 en el plasma filtrado antes y después de pasar a través de la columna de inmunoféresis (n = 59).

Descripción Detallada de la invención

I. Sistemas

El sistema para el tratamiento de pacientes que reduce el nivel del receptor factor de necrosis de tumor soluble circulante (sTNFR) 1, sTNFR2, y receptor 2 de interleuquina soluble (sIL-2) incluye:

Un dispositivo tal como un sistema de plasmaféresis para el retiro de la sangre de un paciente;

Medios para separar la sangre en plasma y elementos celulares tal como glóbulos blancos y rojos, tal como un filtro o una centrífuga;

Medios que contienen socios de unión inmovilizados para los receptores de citoquina solubles, sTNFR1, sTNFR2, y sIL-2, que pueden ser una columna o un filtro;

Medios para regresar el plasma y el plasma separado y tratado al paciente, que usualmente consiste de un conjunto de tubos.

A. Sistemas de plasmaféresis

Aunque es posible tratar la sangre completa para retirar los inhibidores del receptor de citoquina soluble, puede ser preferible separar primero los elementos formados y el plasma y tratar el plasma. Esto proporciona pocos problemas

potenciales debido al daño a los glóbulos rojos o la activación de los glóbulos blancos cuando pasan a través de la columna o filtro para el retiro de los inhibidores. Están comercialmente disponibles sistemas para separar la sangre en los componentes celulares y el plasma. Un sistema adecuado es el controlador de profusión de plasma/intercambio de plasma Diapact CCRT B. Braun con el tubo de profusión de plasma. Otros sistemas de tratamiento de sangre extracorpóreos incluyen el sistema de Aféresis Fresenius Hemocare, Sistema Gambo Prisma y los controladores de filtración de sangre Asahi y Kurray y los Sistemas de Inmunoadsorción Exorim.

1. Filtros

En la realización preferida, el plasma se separa mediante un filtro. El filtro puede ser biocompatible, y adecuado para contacto con la sangre, sin provocar la activación excesiva de las plaquetas o la coagulación. Los dispositivos serán normalmente filtros de placas paralelas o filtros de membrana capilar. Estos se pueden adaptar a partir de dispositivos actualmente en uso para diálisis de riñón. Los filtros de membrana capilar tendrán normalmente un área de superficie de entre aproximadamente 0.25 y 1 m² para uso en niños y entre aproximadamente 1 y 3 m² para uso en adultos. Los filtros de placas paralelas tendrán normalmente un área de superficie en el rango de 0.1 y 2 cm²/ml de la sangre que se va a filtrar.

Las membranas de filtro serán normalmente un termoplástico biocompatible o inerte tal como policarbonato, politetrafluoretileno (Teflon[®]), polipropileno, etilen alcohol polivinílico o polisulfona. Es frecuentemente deseable hacer profusas las proteínas en la fracción de bajo peso molecular del plasma, y evitar que abunden proteínas macromoleculares grandes, tal como fibrinógeno, alfa 2 macroglobulina, y macroglobulinas tal como crioglobulinas, sobre el adsorbente. Por lo tanto son deseables las membranas que poseen discriminación de tamizado molecular en estos tamaños moleculares. Dichas membranas tienen idealmente un tamaño de poro normalmente de entre 0.02 y 0.05 micras en un filtro de membrana capilar y de entre 0.04 y 0.08 micras en un filtro de placa paralela. Se prefiere polisulfona para vinil acetato de etileno debido a que es más gentil hacia los glóbulos. El tamaño de poro actual que produce el corte deseado se determina con base en la geometría de flujo de fluido, fuerzas de corte, índices de flujo, y área de superficie. El corte efectivo para un filtro de membrana capilar con un tamaño de poro de 0.03 micras es 150,000 daltons, con un coeficiente de tamizado de entre 10 y 30 %. La membrana de filtro debe ser menor de aproximadamente 25 micras, preferiblemente menor de aproximadamente 10 micras, de espesor. La membrana permeable no debe provocar coagulación de la sangre o de otra forma reaccionar con la sangre.

En una realización preferida en la que solo las moléculas que tienen un peso molecular de aproximadamente 120,000-150,000 daltons o menos se retiran de la sangre, el filtro tiene un coeficiente de tamizado que retira cero % del fibrinógeno; 10-50 % del IgG; 80-100 % del SGOT y LDH (100,000 mw), y 100 % del sTNFR1 (74,000 cuando circula como un dímero o agregado).

Se pueden obtener dispositivos adecuados de Asahi Chemical Company, Japón, y Kuraray Co., Ltd, 1-12-39, Umeda, ite-ku, Osaka 530, Japón. El separador de plasma Kuraray 4A o 5A es el separador de plasma más preferido. Otros filtros preferidos incluyen el filtro de polisulfona Frezenius y los filtros Kuraray 3A y 2A. También se pueden utilizar filtros por etapas, que tienen diferentes tamaños de poro y/o geometrías o áreas de superficie, para proporcionar un retiro "escalonado" de los materiales de la sangre.

El índice de flujo del plasma de estos sistemas depende del índice de flujo de sangre y el filtro. En un índice de flujo de 300 ml de sangre/min (con un rango de entre 150 y 500 ml/min), el sistema de plasmáfesis produce normalmente un índice de flujo de plasma de 100 ml de filtrado (plasma)/min. El rango preferido de índices de flujo está entre 10 y 100 ml/min, con un rango más preferido de entre 50 y 100 ml. 2.

2. Otros Medios de Separación

Alternativamente, aunque no se prefiere en este momento, uno puede utilizar centrifugación diferencial, para proporcionar una separación apropiada de los componentes de la sangre.

3. Otro Sistema de Tratamiento de la Sangre

Alternativamente, la matriz de la columna absorbente se puede construir en su geometría con el fin de acoplar los ligandos de unión de inhibidor en señales microscópicas sobre la superficie del glóbulo con el fin de permitir que las proteínas de plasma entren en contacto con el ligando de unión (anticuerpo o péptido) pero evita que los glóbulos entren en contacto con el ligando de unión. Este sistema permite el retiro de los inhibidores deseados de sangre completa y hace uso de un filtro innecesario.

B. Controles de Proceso y Manipulación de Fluidos

El paciente se conectará normalmente al dispositivo de procesamiento de sangre utilizando un tubo intravenoso estándar y catéter venoso permanente, con conexiones similares a aquellas utilizadas por otros sistemas de tratamiento de sangre extracorpóreos, de tal manera que se puede retirar la sangre y regresar al paciente. El tubo se conecta a una bomba de sangre que controla el índice de flujo de tal manera que en la realización preferida se procesa un volumen de sangre (con base en aproximadamente 7 % del peso corporal total) durante un periodo de aproximadamente 15-20 minutos. Después de pasar a través del filtro de sangre, el filtrado de plasma se dirige a la

columna o filtro de retiro del inhibidor, luego regresa de estos dispositivos al paciente en un sitio de catéter único o un segundo sitio. Se pueden utilizar controles de microprocesador estándar para regular el flujo de sangre, por ejemplo, al supervisar el volumen de los productos de sangre que se retiran, en combinación con los monitores de índice de flujo y velocidad de bomba.

- 5 El sistema completo primero se debe lavar con solución salina y luego se trata con un anticoagulante o agente anticoagulación, tal como heparina de sodio o anticoagulante de dextrosa de citrato ("ACD"), para asegurar que no haya ubicaciones existentes dentro del sistema donde pueda ocurrir la coagulación de la sangre. Más aún, las cantidades pequeñas de anticoagulantes se deben introducir continuamente dentro del torrente sanguíneo dirigido al filtro de sangre para asegurar que no ocurra coagulación durante el proceso de filtración. Todas las superficies del sistema que entran en contacto con la sangre y los fluidos que se infunden dentro del paciente se deben esterilizar o preparar asépticamente antes de comenzar el tratamiento.

C. Columnas o Filtros para el Retiro del Inhibidor

1. Socios de unión

- 15 Se pueden retirar los inhibidores al unir los anticuerpos a los inhibidores o las citoquinas que se unen normalmente a los receptores. El retiro o neutralización selectiva de los receptores de citoquina solubles (que funcionan como inhibidores de la citoquina) se utiliza para promover una respuesta inflamatoria segura, selectiva contra las células autoinmunes, transformadas, o enfermas.

- 20 Los receptores se pueden retirar al unir la citoquina inmovilizada, un epítipo o fragmento de los mismos que se une selectivamente al receptor de citoquina soluble, o un anticuerpo para el receptor. Como se utiliza aquí, el término "se une selectivamente" significa que una molécula se une a un tipo de molécula objetivo, pero no sustancialmente a otros tipos de moléculas. El término "se une específicamente" se utiliza intercambiamente aquí con "se une selectivamente". Como se utiliza aquí, el término "socio de unión" pretende incluir cualquier molécula seleccionada por su capacidad de unirse selectivamente al inhibidor del sistema inmune objetivo. El socio de unión puede ser uno que se une en forma natural al inhibidor del sistema inmune objetivo. Por ejemplo, se puede utilizar el factor de necrosis de tumor alfa o beta como un socio de unión para sTNFR1. Alternativamente, se pueden utilizar otros socios de unión, seleccionados por su capacidad de unirse selectivamente al inhibidor del sistema inmune objetivo. Estos incluyen fragmentos del socio de unión natural, anticuerpo monoclonal o preparaciones policlonales o fragmentos de los mismos, o péptidos sintéticos.

- 30 Los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales, recombinantes, sintéticos o humanizados. También se pueden utilizar fragmentos de anticuerpo o anticuerpos de cadena sencilla que se unen al inhibidor que se va a retirar. Se prefieren los anticuerpos policlonales debido a que estos tienen un rango más amplio de reactividad y no es necesario tener anticuerpos humanos debido a que los anticuerpos se inmovilizan, no se administran al paciente. Típicamente, la cantidad pequeña de lixiviación que se observa no crea un riesgo significativo. Se obtienen los anticuerpos descritos en el siguiente estudio clínico mediante inmunización de los conejos con sTNFR1, sTNFR2 o sIL2R. Los anticuerpos serán normalmente reactivos con las formas solubles e inmovilizadas del receptor, receptor del factor de necrosis de tumor soluble ("sTNF-R") 1 y 2 y receptor de interleuquina-2 soluble ("sIL-2R").

- 40 Los anticuerpos para los receptores se pueden inmovilizar en un filtro, en una columna, o utilizando otras técnicas estándar de reacciones de unión para retirar las proteínas de la sangre o plasma de un paciente, o se administran directamente al paciente en un portador farmacéuticamente aceptable adecuado tal como solución salina. Como se utiliza aquí, el anticuerpo se refiere a un anticuerpo, o fragmento de anticuerpos (cadena sencilla, recombinante, o humanizada), inmunorreactivo con las moléculas del receptor.

- 45 Se pueden obtener anticuerpos a partir de diversas fuentes comerciales tal como Genzyme Pharmaceuticals. Estos son preferiblemente humanizados para administración directa a un humano, pero puede ser de origen animal si se inmoviliza en un dispositivo extracorpóreo. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los anticuerpos y el dispositivo se deben preparar asépticamente de tal manera que no contengan endotoxina u otros materiales no aceptables para administración a un paciente.

- 50 Se pueden generar anticuerpos para las proteínas del receptor mediante técnicas estándar, utilizando proteínas del receptor humano o fragmentos antigénicos de las mismas. Los anticuerpos se generan normalmente mediante la inmunización de un animal, luego se aíslan del suero, o se utilizan para hacer hibridomas que expresan los anticuerpos en el cultivo. Debido a que los métodos para inmunizar animales producen anticuerpos que no son de origen humano, los anticuerpos pueden provocar un efecto adverso si se administra los humanos. Se conocen bien los métodos para "humanizar" los anticuerpos, o generar menos fragmentos inmunogénicos de anticuerpos no humanos. Un anticuerpo humanizado es uno del que solo los sitios reconocidos de antígeno, o regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDR) son de origen no humano, mientras que todas las regiones de estructura (FR) de los dominios variables son productos de genes humanos. Estos anticuerpos "humanizados" presentan un estímulo de rechazo xenográfico menor cuando se introducen a un receptor humano.

Para llevar a cabo la humanización de un anticuerpo monoclonal de ratón seleccionado, se puede utilizar el método de injerto CDR descrito por Daugherty, et al., (1991) Nucl. Acids Res., 19:2471-2476, incorporado aquí como referencia. En resumen, el ADN de región variable de un ScFv anti-idiotípico recombinante de animal seleccionado se secuencia mediante el método de Clackson, T., et al., (1991) Nature, 352:624-688, incorporado aquí como referencia. Utilizando esta secuencia, se distinguen los CDR de animal de regiones de estructura de animal (FR) con base en las ubicaciones de los CDR en las secuencias conocidas de los genes variables de animal. Kabat, H.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed. (U.S. Dept. Health and Human Services, Bethesda, MD, 1987). Una vez se identifican los CDR y FR de animal, los CDR se injertan en la estructura de región variable de cadena pesada humana mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos y recombinación de reacción de cadena polimerasa (PCR). Los codones para los CDR de cadena pesada de animal, así como también la estructura de región variable de cadena pesada humana disponible, se construyen en cuatro (cada uno de 100 bases de largo) oligonucleótidos. Utilizando PCR, una secuencia de ADN injertada de 400 bases se forma de tal manera que codifica la protección FR de cadena pesada humana/ CDR de animal recombinante.

El estímulo inmunogénico presentado por los anticuerpos monoclonales así producidos se puede reducir adicionalmente mediante el uso del "Sistema de Anticuerpo de Fago Recombinante" de Pharmacia (Pharmacia LKB Biotechnology, Suecia) (RPAS), que genera un fragmento Fv de cadena sencilla (ScFv) que incorpora el dominio de unión a antígeno completo del anticuerpo. En el RPAS, se amplifican en forma separada los genes de cadena ligera y pesada variable de anticuerpo del mRNA de hibridoma y se clonan en un vector de expresión. Los dominios de cadena pesada y ligera se co-expresan en la misma cadena de polipéptido después de unirse con un ADN ligador corto que codifica un péptido flexible. Este ensamble genera un fragmento Fv de cadena sencilla (ScFv) que incorpora el dominio de unión a antígeno completo del anticuerpo. Comparado con el anticuerpo monoclonal intacto, el ScFv recombinante incluye un número considerablemente menor de epítopos, y por lo tanto presenta un estímulo inmunogénico más débil cuando se inyecta en los humanos.

La citoquina, tal como TNF o IL-2, se puede inmovilizar y utilizar para retirar el sTNFR y sIL-2. Estos son los socios de unión naturales para los receptores. También se pueden utilizar fragmentos o "epítopos" (fragmentos de péptido de por lo menos cuatro a siete aminoácidos de longitud que pueden provocar y unirse a los anticuerpos para la proteína intacta) de las citoquinas que unen los receptores. Estos se pueden aislar de fuentes naturales o más preferiblemente se preparan utilizando tecnología recombinante estándar. También se pueden preparar péptidos cortos o fragmentos utilizando tecnología sintética estándar. Se conocen bien las secuencias de aminoácidos y las secuencias de genes que codifican la proteína.

2. Sustratos de Inmovilización

En la realización preferida, se hace circular plasma a través de una matriz polimérica inerte, tal como SEPHAROSE™, vendida por Amersham-Biosciences, Upsala, Suecia dentro de una carcasa de policarbonato de grado médico de aproximadamente 325 ml de volumen, suministrado por Tacoma Plastics, como se muestra en la Figura 1. Se pueden utilizar otros materiales equivalentes. Estos se deben producir asépticamente o esterilizar y ser adecuados para conexión utilizando conjuntos de tubos de aféresis estándar. Los materiales típicos incluyen partículas o glóbulos de acrilamida y agarosa.

Están disponibles otras matrices adecuadas, y se pueden formar de acrilamida u otro material polimérico inerte al que se puede unir el anticuerpo. Se utilizan técnicas estándar para el acoplamiento de los anticuerpos al material de gel.

En otra realización, se inmovilizan los socios de unión en membranas de filtro o tubos de diálisis capilar, en donde el plasma pasa adyacente a, o a través de, las membranas a las que se unen los socios de unión. Los filtros adecuados incluyen aquellos discutidos anteriormente con respecto a la separación de los componentes de sangre. Estos pueden ser los mismos filtros, que tienen socios de unión inmovilizados unidos a estos, o se pueden disponer en secuencia, de tal manera que el filtro inicial separa los componentes de la sangre y el filtro posterior retira los inhibidores.

En todavía una tercera realización, los socios de unión inmovilizados se unen a las partículas que se exponen a la sangre o plasma dentro de una malla o reactor que tiene medios de retención. En una realización particularmente preferida, las partículas son altamente irregulares, de tal manera que los socios de unión se unen dentro de las invaginaciones (señales microscópicas), utilizando directamente una técnica tal como acoplamiento de bromuro de cianógeno, o indirectamente a través de un ligador tal como un ligador de polietilenglicol o un par de unión tal como avidina y estreptavidina, que permite que las células pasen sobre las partículas sin riesgo de reacción con los socios de unión vinculados.

3. Columnas y Filtros

Existen tres realizaciones principales del dispositivo para el retiro selectivo de los inhibidores: una columna, un filtro, o un reactor, los cuales contienen socios de unión inmovilizados para los inhibidores. Las columnas o filtros se hacen de un material inerte de grado médico, preferiblemente un termoplástico tal como un policarbonato, polietileno

o polipropileno. Los filtros son iguales a aquellos discutidos anteriormente con respecto a la separación de los componentes de la sangre.

Los socios de unión se pueden unir al material de matriz tal como gránulos para el empaque de la columna o a las membranas de filtro, sobre uno o los dos lados de las membranas.

- 5 La Figura 1 muestra la columna utilizada en estudios clínicos para tratar pacientes con cáncer, como se discute en los siguientes ejemplos. La columna 10 incluye una carcasa 12, filtros 14 en los puertos de consumo 16 y salida 18, y sellos de anillo o 20 en ambos puertos para sellar las tapas 22 en la carcasa de columna 12. Los tapones 24 sellan los puertos en el extremo de la columna.

- 10 El socio de unión inmovilizado se empaqueta en la columna después de esterilización o tratamiento aséptico del material. El acoplamiento del anticuerpo a la matriz utilizando una técnica tal como bromuro de cianógeno reduce significativamente el virus debido al retiro del virus no unido durante lavado o al acoplar el virus al material de matriz, que inactiva el virus unido. Debido a problemas recientes con respecto al potencial para virus de los animales utilizados para hacer los anticuerpos policlonales, tal como los conejos utilizados para hacer los anticuerpos en los siguientes ejemplos, el anticuerpo se une al material de matriz, el material de matriz se pone en una bolsa que luego se rocía para proporcionar el área de superficie expuesta máxima y se trata mediante radiación de rayos e
15 estacionarias (24 c). Esto puede provocar hasta 25 % de pérdida de actividad y las cantidades de anticuerpo se pueden haber aumentado de acuerdo con lo anterior. Otras técnicas de esterilización conocidas que se pueden utilizar, solas o en combinación, incluyen lavar el material de matriz que contiene el socio de unión inmovilizado con glicina a un pH de 2.8 que destruye el virus envuelto (dos a tres reducciones log); irradiación ultravioleta que provoca
20 cuatro a cinco reducciones log de todos los virus con solo aproximadamente 5 % de pérdida de actividad de anticuerpo. El material de matriz asépticamente preparado o esterilizado se transfiere desde la bolsa hasta un puerto estéril en la bolsa directamente en el puerto de columna esterilizado.

- Se esterilizan las carcasas de columna antes de empaque con el anticuerpo inmovilizado, que se hace utilizando condiciones asépticas. Las columnas se llenan con 0.1 % de azida de sodio en solución salina regulada con fosfato
25 ("PBS") como un conservante, aunque se pueden utilizar otros reguladores médicamente equivalentes. Estos se almacenan refrigerados hasta uso.

Las columnas se pueden regenerar al lavar con solución salina estéril normal, elución con 200 mM glicina-HCl pH 2.8, lavar con solución salina estéril normal, luego lavar con PBS. Se pueden utilizar otras soluciones de lavado equivalentes. La columna se lava con múltiples volúmenes de solución salina estéril antes de uso.

30 C. Sistema de Tratamiento

- La Figura 2 es un esquema del sistema de ultrafresis que incluye la columna. La sangre se pasa inicialmente a través de un filtro de plasma 30; el plasma se pasa a través de la columna que contiene socios de unión 32, y luego el plasma tratado se recombina con los glóbulos a 34 para administración al paciente. Las bombas 36 y 38 regulan el índice de flujo a través de la columna 32 y el filtro de separación de plasma 30, respectivamente. Un calentador 40
35 mantiene el control de la temperatura.

II. Método de Tratamiento

- Los pacientes que se van a tratar son aquellos adultos caracterizados por tumores cancerosos, u otras enfermedades caracterizadas por la sobreproducción y niveles elevados de sTNFR1, sTNFR2 y sIL2R, que pueden incluir individuos con enfermedad autoinmune, vírica, parasítica, u otra enfermedad. Los ciclos de tratamiento
40 consisten normalmente de tres o más tratamientos por semana y/o un total de doce o más tratamientos, durante un periodo de hasta cinco semanas. Se pueden repetir los ciclos de tratamiento según se requiera.

- El paciente requiere normalmente un catéter para diálisis u otro dispositivo que permite acceso vascular adecuado para tratamiento. El catéter se conecta al equipo de aféresis, que separa el plasma de los elementos formados. El plasma luego se pasa a través del filtro y se regresa al paciente. El sistema y proceso se describe en la Figura 2. En
45 una realización preferida, el plasma se separa a través de un filtro.

El paciente se trata durante un periodo suficiente para disminuir los niveles de sTNFR1, sTNFR2, y sIL2R circulante. Las metas clínicas están en los rangos de nivel normal bajo para estos receptores, aproximadamente 750 pg/ml para sTNFR1 y 1250 pg/ml para sTNFR2, y menos de aproximadamente 190 pg/ml para sIL-2.

- En una realización, se reducen los niveles a por lo menos 5 % menos que los valores normales; en otra realización, los niveles se reducen a por lo menos 10 % menos que los valores normales. Los niveles circulantes de los inhibidores se elevan frecuentemente significativamente luego del tratamiento, que puede ser debido a propagación de los tumores.

- En la realización preferida, el plasma se trata de tal manera que se logran niveles normales de inhibidores de circulación dentro de la primera hora de tratamiento. El tratamiento luego se continúa de tal manera que se reducen los niveles por debajo de lo normal y se mantienen menores que los niveles normales durante un periodo de por lo
55

menos cuatro a cinco horas. Sin embargo, el grado de reducción en los niveles de los inhibidores se debe equilibrar mediante el tipo de tumor que se va a tratar y la carga tumoral.

Disminuir la concentración de estos receptores induce una respuesta inflamatoria contra las células de tumor. La evidencia de una respuesta inflamatoria incluye fiebre, dolor inflamatorio específico de tumor, inflamación de tumor y necrosis de tumor. Otros problemas que pueden ocurrir incluyen síndrome de lisis de tumor, que se pueden tratar con el manejo médico estándar por los médicos calificados.

Los pacientes se pueden tratar con terapia de combinación. En una realización preferida, el retiro selectivo de los inhibidores se combina con un inmunoestimulante, tal como una vacuna contra antígenos de tumor, una citoquina para estimular el sistema inmune o células dendríticas activas, o compuestos que bloquean los factores tal como factor de crecimiento derivado de fibroblasto (FDGF), TGF beta, o EGRF. También se puede lograr la activación del sistema inmune mediante el retiro selectivo de IL-4 y/o IL-10 para impulsar el mecanismo celular. Otros tratamientos incluyen la administración de hipertermia, radiación o agentes quimioterapéuticos, aunque los últimos dos no se prefieren normalmente debido a que pueden reducir la capacidad del sistema inmune para matar los tumores.

La presente invención se entenderá adicionalmente mediante referencia al siguiente reporte estudio clínico.

Ejemplo 1: Estudio Clínico del tratamiento de pacientes con cáncer con plasmaféresis utilizando Anticuerpos Inmovilizados Anti-TNFR1, Anti- ThTFR2, y Anti-IL-2R en una columna.

La secreción de TNF α y interleuquinas-2 que se unen mediante los receptores específicos a la célula de tumor e inducen la muerte celular mediante apoptosis es la respuesta normal del sistema inmune en su pelea constante contra el crecimiento del cáncer. Sin embargo, la secreción local de altos niveles de receptores solubles para el factor de necrosis de tumor alfa (sTNFR1 y sTNFR2) y interleuquina-2 (sIL2R) se considera es un mecanismo efectivo mediante la célula de tumor para bloquear localmente el ataque y la destrucción por el sistema inmune. El retiro sistémico de estos inhibidores por medio de aféresis extracorpórea con el objetivo de reducir las concentraciones del inhibidor local por debajo del umbral protector del tumor, por lo tanto, se ha considerado es una medición terapéutica potencial para el tratamiento del cáncer.

Aunque este método se ha seguido principalmente en el pasado con el retiro no específico de las proteínas como se define por rangos de peso molecular por medio de un método llamado "Ultraféresis", un método más específico es el uso de anticuerpos inmovilizados para sTNFR1, sTNFR2, y sIL2R en el procedimiento de aféresis. Se ha desarrollado una columna de adsorción de aféresis que contiene anticuerpos específicos unidos a una matriz polimérica que para este método. Dicho dispositivo demostrará su eficacia en la unión del receptor y también debe presentar un perfil de riesgo-beneficio aceptable.

El propósito de este estudio es evaluar la eficacia y seguridad de la nueva columna de Bioféresis para reducir los sTNFR1, sTNFR2, y sIL2R circulantes en el plasma de pacientes con cáncer durante el procedimiento de aféresis.

La Columna IAC122

La columna de inmunoféresis IAC122 es un producto adsorbente inmune estéril diseñado para retirar los inhibidores solubles a las citoquinas pro-inflamatorias de la sangre. Se diseña para ser utilizada en conjunto con los sistemas de tratamiento de sangre extracorpóreos aprobados comercialmente disponibles. (por ejemplo dispositivo Diapact CRRT, B. Braun, Aféresis Fresenius Hemocare, Sistemas de Inmunoadsorción Exorim). El dispositivo está destinado solo a ser vendido sobre la forma de y utilizado solo por los médicos con experiencia en el uso de técnicas de inmunoadsorción. La columna de adsorción inmune pretende retirar las citoquinas pro-inflamatorias solubles que se conocen por ser sobreproducidas en ciertos estados de enfermedad como cánceres, cuando son una causa principal de tolerancia inmune de neo-antígeno asociado con tumor. En la aplicación clínica en los pacientes con cáncer el retiro de estos receptores de desprendimiento/ inhibidores puede producir la inflamación específica de tumor que puede conducir a la destrucción del tumor.

La carcasa de columna es un dispositivo de policarbonato grado médico de 325 ml de volumen (PNS-400146-Fresenius Hemo- Care, INC). La matriz de columna se compone de glóbulos de Sefarosa 4B y anticuerpos de conejo policlonales contra inhibidores de citoquina pro-inflamatorios (receptores solubles para el factor de necrosis de tumor alfa (TNF) e interleuquinas 2 (IL2)). Por lo tanto, los componentes esenciales para fabricación son Sefarosa, comprado como el producto estéril de Amersham-Biosciences (Upsala, Suecia), anticuerpos para los receptores TNF y el receptor IL2 que se esterilizan mediante filtración (Eurogentec, Liege, Bélgica), y una carcasa de policarbonato (Fresenius, St. Walin), esterilizada por autoclave. Los componentes estériles y la técnica aséptica durante la producción, así como también la prueba del producto final de cada columna o lote de producción de columna son importantes para la seguridad de este producto de dispositivo médico. Cada columna se construye bajo condiciones asépticas de acuerdo con el GMP. Cada columna se prueba individualmente para esterilidad y nivel de endotoxina post fabricación. Cada columna se llena con 0.1 % de Azida de Sodio (NaAzide) en PBS y se mantiene entre 4-8° C antes de uso clínico. Se muestra un dibujo del dispositivo en la Figura 1.

El propósito pretendido del dispositivo es servir como una columna de adsorción en procedimientos de aféresis clínica. La columna es parte de un circuito extracorpóreo utilizando una máquina de perfusión de plasma estándar que retira la sangre de los pacientes, separa el plasma mediante filtración, pasa el plasma filtrado a través de la columna de adsorción y luego regresa el plasma combinado y las fracciones celulares al paciente en un sistema de bucle continuo (ver también Figura 2). El material adsorbente en la columna se construye para unir específicamente dos tipos de receptores solubles al Factor de necrosis de tumor α (sTNFR1 y sTNFR2) y también para unir los receptores solubles a las interleuquinas 2 (sIL2R). El objetivo de utilizar estas columnas en el procedimiento de aféresis es retirar aquellos inhibidores de la sangre que se conocen por proteger las células de tumor contra la destrucción mediante el sistema inmune anfitrión.

- 10 Las indicaciones para el uso del dispositivo son condiciones de enfermedad en donde los pacientes pueden tener un beneficio clínico a partir del retiro de sTNFR1, sTNFR2, y sIL2R (por ejemplo cáncer metastásico).

Si se utiliza de acuerdo con las Instrucciones para Uso, no existen contraindicaciones para el uso de este dispositivo.

- 15 Se ha mostrado en estudios clínicos el dispositivo y de laboratorio para retirar efectivamente sTNFR1, sTNFR2 y sIL2R del plasma filtrado. Reducir la concentración de estos receptores durante un procedimiento de aféresis debe resultar en la inducción de una respuesta inflamatoria contra las células de tumor. Por lo tanto, los signos y síntomas de inflamación de tumor se han reportado a partir del estudio clínico (por ejemplo fiebre, dolor inflamatorio específico de tumor, inflamación de tumor, y necrosis de tumor, ver también 5.5. Análisis de Seguridad). El uso prolongado del dispositivo o el tratamiento de tumores grandes (> 500 g) puede en el caso de inducción exitosa de la respuesta inflamatoria conducir a una sobrecarga excesiva de proteínas que resultan de la destrucción del tumor, que puede resultar en un síndrome de lisis de tumor con el riesgo de insuficiencia de riñón, necrosis tubular aguda, síndrome de dificultad aguda respiratoria, coagulación intravascular diseminada, y muerte.

Objetivos del Estudio

- 25 El objetivo principal de este estudio es disminuir los niveles de plasma de sTNF-R1 y sTNF-R2 a los extremos más bajos del rango normal (750 pg / ml para los receptores R1 y 1250 pg /ml para R2 en plasma de citrato) durante el procedimiento. La cantidad de plasma procesado para lograr este nivel de reducción se puede derivar empíricamente para cada paciente pero se estima es una cantidad de plasma aproximadamente equivalente a un volumen extracelular de agua. Esto se calcula utilizando masa corporal (aproximadamente 20 % de masa corporal en kilogramos expresado en litros).

- 30 El objetivo secundario es describir todos los efectos clínicos que resultan de la inmunoabsorción (LA) en pacientes con cáncer metastásico utilizando el sistema de perfusión de plasma Diapact B. Braun con la columna de inmunoafinidad insertada en el circuito de plasma. Otro objetivo secundario es recolectar específicamente la evidencia subjetiva y objetiva de la inflamación de tumor y la necrosis de tumor y/o resolución como se mide por exploración CAT RMN, y o exploraciones óseas o rayos X de lesiones metastásicas óseas de tumores viscerales, o medición directa de los tumores de superficie.

El nivel de suero del receptor soluble sIL2 se registra para documentar los cambios posibles de estos niveles después de tratamientos de aféresis.

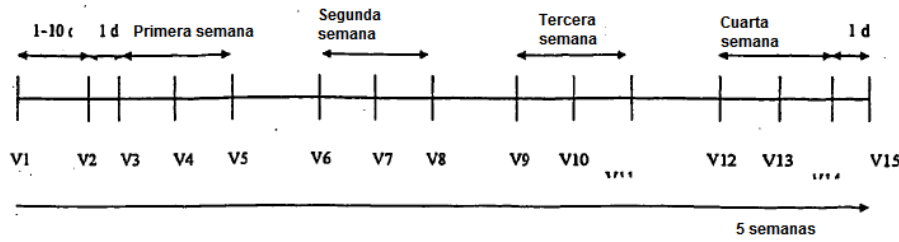
Otro objetivo secundario es evaluar la seguridad de uso del dispositivo al documentar todos los eventos adversos asociados con los procedimientos de tratamiento.

40 Metodología

Este es un estudio de sitio único, abierto no aleatorio para observar y documentar la disminución de las concentraciones de plasma de sTNFR-1 y sTNFR-2 y el posible efecto en la masa de tumor en pacientes con cáncer metastásico. El estudio consiste de un total de veinte tratamientos que tienen lugar dentro de cinco semanas. Aproximadamente 1-10 días después de la visita Inicial (V1), se conduce una Visita de colocación de catéter (V2). Esta visita se sigue por 12 visitas de tratamiento (V3-V14), que tienen lugar dentro de cuatro semanas, tres visitas por semana. La visita Final (V 15) se realiza un día después de la última visita de tratamiento.

- 45 Después de la visita final todos los datos de laboratorio y los datos de evaluación de tumor se da una recomendación médica al paciente por el investigador. En el caso de procedimiento de aféresis muestra cambios positivos contra el tumor, el paciente se da la oportunidad de repetir el tratamiento hasta tres ciclos. Se deja un periodo de uno a tres meses entre dos procedimientos de tratamiento.

Diseño del estudio



V1: Visita de valores iniciales d: día

V2: Colocación de catéter V: visita

V3-V4: Visitas de Tratamiento

5 V15: Visita Final

Eligibilidad e Inscripción

Para ser considerado elegible para participar en el estudio, un paciente ha cumplido los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión

- 10 1. Pacientes con biopsia que prueban cáncer recurrente o metastásico que han fallado en responder a quimioterapia sistémica estándar y / o terapia hormonal.
2. Pacientes con tumor que es medible uni-dimensionalmente.
3. Pacientes con Estado Kamofsky de 70 % o más. (Ver Apéndice A)
4. Pacientes con expectativa de vida mayor de 3 meses.
- 15 5. Edad de los pacientes > 18 años.
6. Pacientes con concentraciones de plasma medibles s1NF -R1 y/o concentraciones TNFR-2 que se pueden medir.
7. Pacientes con la capacidad de entender la naturaleza investigativa del ensayo y con consentimiento informado firmado antes de cualesquier procedimientos de estudio.
- 20 8. Pacientes quienes tienen progresión o recurrencia de enfermedad después de que ha recibido terapia convencional, o ha rechazado estas terapias bajo consentimiento informado.
9. Pacientes que tengan un acompañante (amigo o miembro de la familia) que los acompaña durante cada visita de tratamiento en todos los ciclos de tratamiento de cuatro semanas.

Se puede obtener consentimiento informado por escrito para todos los pacientes.

Criterios de Exclusión

- 25 1. Pacientes con una masa de tumor acumulada aproximada mayor de 1000 gms estimado por exploración CAT o examen físico a discreción del investigador, para reducir el riesgo de síndrome de lisis de tumor.
2. Pacientes con función hepática y renal inadecuada como se evidencia por creatinina en suero mayor que el valor normal o bilirrubina en suero mayor que el valor normal.
3. Pacientes con un resultado positivo, cuando se detecta infección por Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, y VIH.
- 30 4. Pacientes con radiación, quimioterapia, terapia hormonal o inmune anterior dentro de 30 días de la entrada del protocolo.
5. Mujeres que están embarazadas o lactando. Adicionalmente, mujeres en edad fértil que no estén de acuerdo en utilizar un método apropiado de control de la natalidad. Los métodos apropiados para el control de natalidad incluyen, abstinencia, anticonceptivos orales, anticonceptivos hormonales implantables (Norplant), o método de barrera doble (por ejemplo, diafragma más preservativo).
- 35 6. Se excluirán pacientes con una historia de o probados radiográficamente con tumores activos que crecen en el S.N.C a pesar de terapia de radiación.

7. Se excluirán los pacientes con falla cardíaca congestiva.
8. Se excluirán los pacientes con enfermedades infecciosas activas que requieren antibióticos dentro de 30 días de la entrada de protocolo.
9. Se excluirán pacientes con cánceres secundarios co-existentes.
- 5 10. Pacientes quienes no recibieron tratamiento convencional anterior o quienes han rechazado el mismo bajo consentimiento informado.
11. Se excluirán pacientes con hipotensión clínicamente significativa, presión sanguínea sistólica en reposo <100 mmHg.
12. Pacientes con una historia de infarto del miocardio en los últimos 6 meses o con angina no controlable.
- 10 13. Pacientes con hipersensibilidad conocida o alergia a conejos, látex y medio de contraste de rayos x.
14. Se excluirán pacientes con hematocritos menores de 30 %, WRC menor de 2500/pl, y conteo de plaquetas menor de 100,000/pl.
15. Se excluirán pacientes solo con tumor medible en sitios de terapia de radiación previa.
16. Se excluirán pacientes son tumor asociado con vísceras huecas.
- 15 17. Pacientes con hipersensibilidad conocida a heparina.
18. Pacientes quienes participaron en el ensayo tres veces.
19. Paciente con una historia de alergia severa o múltiples alergias.

Se reclutaron 12 pacientes. Tres de estos pacientes completaron un segundo ciclo de tratamiento. Por lo tanto, se pueden evaluar para eficacia 15 ciclos de tratamiento. Las características de los pacientes se dan en la sección de resultados.

Adquisición de Datos

El estudio se conduce en cumplimiento con la declaración de Helsinki, todas las regulaciones legales y éticas, y de acuerdo con las directrices de la Buena Práctica Clínica. Las historias de los pacientes se proporcionan por los mismos pacientes o de su oncólogo tratante. Los datos originales y los resultados de laboratorio originales se ingresan en las Formas de Reporte del Caso por el investigador. Los datos utilizados en este análisis interino se recolectan después de supervisión apropiada por IKFE CRO y clarificación de preguntas. Los datos se ingresan en una base de datos y se analizan descriptivamente como se da adelante.

Métodos Estadísticos

Se analizan los datos proporcionados por el IKFE CRO por medio de los métodos de estadísticas descriptivas, es decir los datos se presentan en tablas y gráficas apropiadas. Una intención del estudio es demostrar la eficacia de las columnas IAC en la reducción de las concentraciones sTNFR1, sTNFR2 y sILR en plasma durante los procedimientos de inmunoféresis. Por lo tanto, los valores medios de los valores del receptor normalmente distribuidos antes e inmediatamente después del procedimiento de estudio se calculan y se comparan por medio de la prueba T de student. Se considera un valor $p < 0.05$ estadísticamente significativo. En algunos casos, se toman muestras adicionales para permitir el establecimiento de las curvas que disminuyen el receptor durante los procedimientos. Los datos nominales (por ejemplo eventos adversos y características del paciente) se enumeran y se presentan en las tablas.

Visita de detección (V1)

Antes de cualquier procedimiento de estudio se obtiene un consentimiento informado por escrito de cada paciente y se asigna un número único de paciente. Para evaluar la elegibilidad del paciente, él o ella se evalúa para criterios de inclusión/exclusión; se toma una historia médica completa y se conducen exámenes físicos y de laboratorio (ver adelante "Variables Clínicas" y "Parámetros Laboratorio"). Se documentan los datos demográficos, la naturaleza de cualesquier condiciones presentes en el tiempo del examen físico, cualesquier condiciones preexistentes, medicaciones concomitantes y tratamientos.

Se conduce una evaluación de tumor mediante Exploración CAT, RMN o medición directa de los tumores de superficie. A los pacientes se les pregunta para proporcionar dichos datos si es posible de su médico tratante. Los parámetros de laboratorio o ECG que se han determinado dentro de 10 días antes de la visita de detección son aceptables a la discreción del investigador para evitar extracciones de sangre innecesarias.

Los pacientes reciben una tarjeta de identificación de paciente y el número de teléfono de rescate las 24 horas al final de la visita.

Visita de colocación de catéter (V2)

- 5 Los pacientes que cumplen con los requerimientos de elegibilidad tienen acceso vascular por medio de la vena subclavia. Los catéteres utilizados son catéteres de acceso vascular de diálisis estándar HEMOACCESS (15 - 20 cm, Hospal, Lyon, Francia)), o equivalentes. Cuando la homeostasis de la colocación del catéter se asegura y cuando se verifica la posición derecha del catéter por rayos X de pecho, idealmente 24 horas después de colocación, se desarrolla el procedimiento de inmunoféresis inicial.

Visitas de tratamiento (V3-V14)*

- 10 Se realiza usualmente un tratamiento de inmunoféresis 3 veces a la semana. Se trata hasta un volumen de agua extracelular calculado (en donde ECWV = 20 % del peso corporal total en kilogramos expresado en litros) se trata diariamente en un esfuerzo para reducir el sTNF-R1 a un rango bajo normal (750 pg/ml en plasma de citrato), y sTNF-R2 a un rango normal (1250 pg/ml en plasma de citrato). Se obtienen niveles 1NF-R1 y TNF-RZ pre y post-tratamiento. Las mediciones adicionales de estos dos parámetros están bajo la discreción del Investigador. El
- 15 objetivo es reducir estos niveles durante los procedimientos durante 3 de 7 horas en todas las cuatro semanas. Se obtienen niveles de suero del receptor sIL2 pre y post-tratamiento cada segunda visita (V3, V5, V7, V9, V 11, V14). Una vez a la semana, se mide un panel de química sanguínea y se realiza una evaluación de tumor mediante investigación clínica. Se documenta toda la información acerca de los Eventos adversos y se revisa el diario de estudio en cada día de tratamiento.
- 20 Un esquema de la configuración del tratamiento de un procedimiento de inmunoféresis utilizando la Máquina Diapact CCRT (BBraun Medizintechnik, Melsungen, Alemania) y el filtro de plasma Evaflux (MPS Medical Product Services GmbH, Braunfels, Alemania) se da en la Figura 2.

Lo siguiente se supervisa durante los tratamientos del paciente. Se pueden realizar mediciones adicionales a discreción del investigador.

- 25 a) Índice cardíaco aproximadamente cada 60 minutos
b) Tiempo de coagulación aproximadamente cada 60 minutos
c) Temperatura aproximadamente cada 60 minutos
d) Índice respiratorio pre y post tratamiento
e) Presión sanguínea aproximadamente cada 60 minutos
- 30 f) Presiones, índices de flujo, volumen de solución de reemplazo y filtrado, y condiciones de alarma (cualquiera que sea) dentro de circuito extracorpóreo, aproximadamente cada 30 minutos.
g) Muestras de sangre para la concentración del inhibidor se extraen al inicio del tratamiento, y al final del tratamiento

- 35 A lo largo del procedimiento, frecuentemente es necesario regenerar la columna. Las columnas se regeneran durante un procedimiento de inmunoféresis después que se han corrido de 9 litros de plasma sobre la columna. Las columnas de 325 mL se lavan con 1 litro de 1 solución salina estéril, se eluyen 1 litro de 200 mM glicina-HCl (pH 2.8), y luego se vuelven a lavar con 1 litro de solución salina estéril antes de volver a iniciar el procedimiento de aféresis. Todas las columnas se regeneran como la etapa final en el procedimiento de aféresis diario. Esta etapa de regeneración final requiere un lavado inicial con 2 litros de solución salina estéril normal, elución con 1 litro de 200
- 40 mM glicina-HCl (pH 2.8), un relavado con 2 litros de solución salina estéril normal, y finalmente un lavado con 1 litro de PBS más 0.01 % de azida de sodio. La columna luego se almacena a 2 a 8 C en PBS más 0.01 % de solución de azida de sodio hasta el siguiente uso. Antes de la aplicación clínica, la columna que contiene PBS más 0.01 % de azida de sodio se enjuaga con 9 volúmenes de columna de solución salina estéril normal.

- 45 Los pacientes se supervisan durante 1 - 3 horas (promedio de 2 horas) después de la terminación del procedimiento de aféresis en la unidad clínica. Se registran los signos vitales y el paciente es visto por el médico antes de ser dado de alta. Antes de que el paciente sea dado de alta después del primer día de tratamiento, se le informa a él o ella y a los miembros de su familia, a quien deben contactar en caso de una emergencia.

- Después de esto el paciente se da de alta para ir a casa con su acompañante. El miembro de la familia anota la temperatura, dolor, y salud general hasta la siguiente visita de tratamiento. Esta información se registra en el diario de un paciente y se reporta y se registra por el médico en la siguiente visita de estudio. Los pacientes reportan todas las complicaciones físicas al personal clínico por teléfono. El médico que atiende es responsable de todos los aspectos de bienestar médicos de los pacientes después del procedimiento y hace todos los esfuerzos para
- 50

documentar todos los efectos del procedimiento si son adversos o no en sus notas de progreso diarias. Las enfermeras, pacientes o sus médicos de familia en la noche registran la temperatura del paciente cada 4 horas en el diario del paciente.

Al final de la visita el paciente experimenta los siguientes exámenes, similares a la visita inicial:

- 5 - examen físico
- evaluación de laboratorio
- parámetros vitales
- retiro del catéter

10 El paciente recibe una carta de su médico principal, cuando se da la orden de una evaluación de tumor (exploración CAT, o RMN o evaluación de tumor mediante examen físico, niveles sTNF-R1 y R2) que se ha conducido luego de cuatro semanas. El paciente y el médico principal se les piden informar al investigador a cerca de los hallazgos de esta evaluación de tumor tan pronto como sea posible.

15 El investigador tiene que analizar todos los datos disponibles (datos de laboratorio, datos de evaluación de tumor) en las siguientes semanas. La determinación de la actividad de tumor se hace al medir la enfermedad objetivamente, utilizando exploraciones CAT, RMN, y medición directa de tumores de superficie. En el caso del procedimiento de aféresis que muestra cualquier signo de efectos positivos en la masa celular del tumor, el paciente se contacta y se le pregunta, si él o ella probablemente iniciaría con un segundo tratamiento de estudio (tercero).

Si el paciente ha completado el procedimiento del estudio, se iniciará seguimiento:

20 a) Los pacientes cuyos tumores no responden regresan a sus médicos para la consideración de otras terapias. El médico que trata o su designado contacta al médico del paciente mensualmente y hace una nota a la gráfica de investigación del paciente para determinar el tiempo de progresión y fecha de muerte.

b) Los pacientes cuyo protocolo de tratamiento se completó exitosamente con una evaluación de por lo menos una respuesta mínima se evalúan durante por lo menos 5 meses para evaluar la durabilidad (definido como el tiempo para la evolución de la enfermedad y supervivencia general) del tratamiento.

25 Mediciones de laboratorio

Se determinan las variables de eficacia (sTNFR-1, sTNFR-2 y sIL-2) del suero del paciente antes y después del procedimiento de tratamiento en el laboratorio central (ikfe Lab) por medio de los siguientes métodos validados por GLP:

30 Inmunoensayos sTNFR1 y sTNFR2 Humanos (R&D Systems Inc., 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA), para la determinación cuantitativa de las concentraciones del receptor 1 & 2 humano del factor de necrosis de tumor soluble (sTNFR1 y sTNFR2) en el sobrenadante de cultivo celular, suero, plasma, y orina.

ELISA del receptor sIL-2 humano (R&D Sistemas Inc., 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA). El ensayo es una enzima de fase sólida amplificada con inmunoensayo de sensibilidad (EASIA) para la determinación de los niveles de los receptores solubles IL-2 en suero humano, plasma o sobrenadante de cultivo celular.

35 Resultados

El estudio se conduce en cumplimiento estricto con la Declaración de Helsinki, regulaciones locales y nacionales legales y éticas, y de conformidad con las directrices de la Buena práctica Clínica.

40 En total, los datos de 12 pacientes y 15 ciclos de tratamiento planeados (180 procedimientos de tratamiento planeados) se incluyen en este análisis. Se realiza análisis de eficacia con los datos de todos los procedimientos de tratamiento completados (150 procedimientos). El análisis de los cambios de sTNFRs durante el tiempo se relaciona con la cantidad de procedimientos de tratamiento consecutivos y es posible con los datos de 11 ciclos de tratamiento completados por protocolo (132 procedimientos de tratamiento). Todos los datos de todos los pacientes se incluyen dentro del análisis de Seguridad y para la evaluación de riesgo beneficio.

45 Los datos demográficos de todos los pacientes se enumeran en la tabla 1. Todos los pacientes excepto uno sufre de cáncer metastásico en etapa final severo y se pretratan con quimioterapia, cirugía, terapia de radiación, o combinaciones de los mismos en su historia.

Tabla 1.: Características de los Pacientes

Pac. No.	Iniciales	Género	Edad	Tipo de Cáncer	Observaciones
1	RK	F	55	Cáncer de Pulmón de Célula No Pequeña	Abandona procedimientos) (5
2	ST	F	41	Cáncer de mama	2 Ciclos
3	CB	M	47	Carcinoma de Célula Renal	2 Ciclos
4	RN	M	54	Carcinoma de Páncreas	Abandona procedimientos) (4
5	DP	M	59	Carcinoma de Célula Escamosa	2 Ciclos
6	RB	F	53	Cáncer de mama	1 Ciclo
7	KK	M	34	Melanoma Maligno	Abandona procedimientos) (9
8	AB	F	34	Cáncer de mama	1 Ciclo
9	NO	F	59	Cáncer de mama	1 Ciclo
10	JD	F	56	Cáncer de mama	1 Ciclo
11	GA	F	46	Cáncer de mama	Abandona procedimiento) (sin
12	MD	F	49	Cáncer de mama	1 Ciclo
Total		8 F/4 M	48.8±8.8		
La enfermedad subyacente es cáncer de mama en 7 casos, un cáncer de pulmón, un cáncer renal, un cáncer de páncreas, un carcinoma de célula epidermoide, y un melanoma maligno. Los resúmenes narrativos de las historias de los pacientes se dan en la sección 5.5. La razón para la terminación temprana son muerte (paciente 1), decisión del paciente (paciente 4), y detección de un criterio de exclusión (pacientes 7 y 11). La información detallada a cerca de los eventos adversos serios en este estudio se da en la sección 5.4.					

Se puede incluir un total de 150 procedimientos en el análisis de eficacia. Las concentraciones de plasma de todos los tres receptores antes y después de todos los procedimientos se da en la Tabla 2. Una representación gráfica de las concentraciones del receptor mediante el número de tratamiento se da en las Figuras 3a-3c. Existe una relación clara entre el número de procedimientos terapéuticos aplicados consecutivamente y el efecto en la disminución de las concentraciones de plasma sTNFR1, sTNFR2, y sIL2R. Aunque la respuesta clínica del tumor en el intento agresivo de disminuir los receptores solubles a un grado significativo en los niveles del receptor post-tratamiento al final del día de tratamiento, no se puede ver dicho efecto en el segundo día de tratamiento. Después del tercer día de tratamiento las concentraciones de plasma se disminuyen consistentemente para todos los receptores hasta el final del ciclo del tratamiento. Las concentraciones promedio del receptor antes y después de tratamiento durante el periodo de desempeño estable (tratamiento 3 a tratamiento 12) se dan en la Tabla 3. No es sorprendente, las células de tumor recuperadas entre los niveles de tratamiento y pretratamiento a los mismos niveles a través de los procedimientos. En total, se pueden evaluar 128 procedimientos de tratamiento completos para este análisis.

Tabla 2. Concentraciones de receptores para todos los procedimientos de tratamiento (n=150)

Receptor	Antes de tratamiento	Después de tratamiento	Valor p
sTNFR1[pg/ml]	1919±828	1346±1033	p<0.001
sTNFR2 [pg/ml]	3074±1151	1870±1291	p<0.001
sIL2R[pg/ml]	4745±1692	2611±1766	p<0.001

Tabla 3. Concentraciones de receptores en los procedimientos de tratamiento 3 a 12 (n= 128)

Receptor	Antes de tratamiento	Después de tratamiento	Valor p	%
sTNFR1 [pg/ml]	1948±853	1023±466	p<0.001	-47.5
sTNFR2 [pg/ml]	3153±1153	1479±894	p<0.001	-53.1
sIL2R [pg/ml]	4845±2711	1219±998	p<0.001	-74.8

5 La cantidad de receptores retirados del plasma del paciente es dependiente del volumen de plasma filtrado. Por razones médicas (el desarrollo de la respuesta inflamatoria con síntomas correspondientes), se lleva a cabo el tratamiento inicial y con bajo índice de flujo de plasma y volúmenes. En la última fase de tratamiento, se pueden lograr volúmenes de plasma de hasta 18 l. Después de cada 9 l de plasma filtrado, se realiza la regeneración de las columnas. El material unido se eluye de las columnas mediante regulador de glicina-HCl (ph 2.8). La fracción combinada de estas soluciones de limpieza para cada paciente y procedimiento se analizan adicionalmente
10 mediante inmunoensayo para calcular la cantidad general de los receptores retirados. La cantidad de receptores retirados de las columnas mediante la regeneración después de cada procedimiento de tratamiento se da en la Tabla 4 y en las Figuras 3a-3c.

Tabla 4: Cálculo de las cantidades de receptor retiradas mediante el ciclo de tratamiento y volumen de filtración de plasma logrado

Procedimiento No	Volumen de plasma [l]	sTNFR1 retirado [ng]	sTNFR2 retirado [ng]	sIL2R retirado [ng]
1	4.12±5.31	2950	1335	6997
2	4.95±3.20	6755	2044	-
3	9.59±5.97	6453	2811	12058
4	11.68±5.35	6403	3099	-
5	12.56±5.19	6436	2786	10927
6	13.11±4.88	5714	2400	-
7	14.56±3.61	7439	3009	10499
8	15.31±3.19	7314	3683	-

(continuación)

Procedimiento No	Volumen de plasma [l]	sTNFR1 retirado [ng]	sTNFR2 retirado [ng]	sIL2R retirado [ng]
9	15.47±3.24	5894	2810	10368
10	15.64±3.12	5474	2273	-
11	15.11±4.54	6807	2368	-
12	14.56±4.45	6815	2864	-
Media±DE	12.22±4.02	6204±1184	2623±594	10170±1984

El análisis muestra que la capacidad de las columnas para retirar los tres inhibidores para TNF- α y IL-2 permanece estable y no declina durante el ciclo de los tratamientos. Debido a la dependencia del número de procedimiento del receptor que disminuye el efecto, se realiza un análisis adicional para evaluar la eficacia de las columnas durante los periodos de retiro del receptor estable (es decir durante los procedimientos 3 a 12). Se asumen que el sistema inmune logra un tipo de estabilización en su pelea contra las células de tumor. Este análisis se puede realizar con todos los datos de procedimiento adecuados (n = 122 para sTNFR1 y sTNFR2, y n = 51 para sIL2R).

Durante el periodo de estabilización del sistema inmune (procedimientos 3 a 12), las columnas son capaces de disminuir la cantidad de receptores significativamente mediante 44 % para sTNFR1, 52 % para sTNFR2, y 77 % para sIL2R. Ver Figura 4. Además de las muestras recolectadas como se da en el protocolo, se toman muestras adicionales durante los ocho procedimientos para evaluar las cinéticas de la reducción de sTNFR1 y sTNFR2 en el plasma del paciente durante el curso de tiempo inicial de los procedimientos del tratamiento. Para ambos receptores se puede mostrar una reducción estable en correlación con el volumen de plasma filtrado. Los resultados se dan en la Figura 5a.

También se toman muestras del plasma filtrado en la máquina antes del plasma que ingresa la columna de adsorción e inmediatamente después de esto. Los resultados de estas investigaciones se dan en las Figuras 5b y 5c. Se puede mostrar que ambos sTNFR se unen efectivamente durante el procedimiento de inmunoféresis, que conduce a una reducción constante durante el tiempo en el plasma de los pacientes. Incluso después de grandes cantidades de plasma filtrado que pasa través de la columna de adsorción, todavía se mantiene la eficacia significativa en la unión del receptor. Sin embargo, se concluye de estos resultados que se recomienda la regeneración de columna después de 9 de plasma filtrado para aumentar la eficacia del procedimiento.

Como se puede esperar por la naturaleza de las enfermedades severas subyacentes, se documentan numerosos eventos adversos durante el estudio. Los eventos adversos se pueden relacionar parcialmente con la terapia y la mayor parte de estos eventos son indicadores de la eficacia clínica del procedimiento de tratamiento de estudio para inducir una respuesta inmune (por ejemplo, fiebre, agitación etc.). La mayoría de eventos adversos generales, sin embargo, se relaciona con los cánceres subyacentes que requieren la medicación del dolor y otros fármacos para facilitar la carga de los pacientes. En total, se observan 244 eventos adversos (AE) y 3 eventos adversos serios (SAE) que incluyen dos casos de muerte. En total, se ven cuatro caídas en el estudio (pacientes 1, 4, 7, 11). Las razones para la caída son muerte (pacientes 1), la decisión de los pacientes seguido por muerte rápida (paciente 4), desarrollo de metástasis del sistema nervioso central (paciente 7), y no cumplimiento con los criterios de inclusión (creatinina > 1.1 mg/l, paciente 11).

Todas las concentraciones del receptor (sTNFR1, sTNFR2, y sIL2R) se reducen significativamente durante el procedimiento de aféresis al involucrar la nueva columna de inmunoféresis IAC122 (mediante 44 %, 52 %, y 77 %, respectivamente). Las columnas prueban ser más confiables en su desempeño durante el ciclo completo de los tratamientos. La regeneración frecuente de las columnas durante y después de los procedimientos de tratamiento no resulta en una pérdida de capacidad de retiro del receptor. No se ha retirado la columna por razones de ineficacia u otros problemas técnicos. En todos los pacientes, la reducción del receptor conduce a síntomas clínicos de inflamación y se han recolectado algunas indicaciones que pueden conducir a una mejora en la enfermedad subyacente.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo estéril para el retiro del receptor 1 del factor de necrosis de tumor soluble (sTNFR1), receptor 2 del factor de necrosis de tumor soluble (sTNFR2), y receptor 2 de interleuquina soluble (sIL2R) de sangre o plasma, dicho dispositivo comprende una composición que comprende socios de unión que se unen al receptor 1 del factor de necrosis de tumor soluble (sTNFR1), receptor 2 del factor de necrosis de tumor soluble (sTNFR2), y receptor 2 de interleuquina soluble (sIL2R) inmovilizado en un material polimérico en una columna o filtro.
5
2. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el socio de unión se selecciona del grupo que consiste de
 - a.) anticuerpo monoclonal o policlonal que se une a un sTNFR1, sTNFR2, o sIL2R;
 - b.) fragmento de anticuerpo (anticuerpo de cadena sencilla, recombinante, o humanizado) que se une a un sTNFR1, sTNFR2, o sIL2R;
 - c.) citoquina que se une a un sTNFR1, sTNFR2, o sIL2R;
 - d.) fragmento de citoquina que se une a un sTNFR1, sTNFR2, o sIL2R; y
 - e.) péptido sintético que se une a un sTNFR1, sTNFR2, o sIL2R.
10
3. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el material polimérico se selecciona del grupo que consiste de
 - a.) una columna;
 - b.) gránulos para el empaque de una columna;
 - c.) un filtro;
 - d.) una membrana de filtro, sobre uno o los dos lados de la membrana;
 - e.) un tubo para diálisis capilar;
 - f.) una matriz; y
 - g.) un reactor.
15
4. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente medios para separar la sangre en el plasma o el ultrafiltrado.
20
5. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el material polimérico que tiene socios de unión inmovilizados sobre este se ha tratado para reducir el virus viable o infeccioso.
25
6. El dispositivo de la reivindicación 5, en donde el material se ha tratado mediante esterilización de rayos e para inactivar o entrecruzar partículas de virus o componentes de los mismos.

FIG. 1

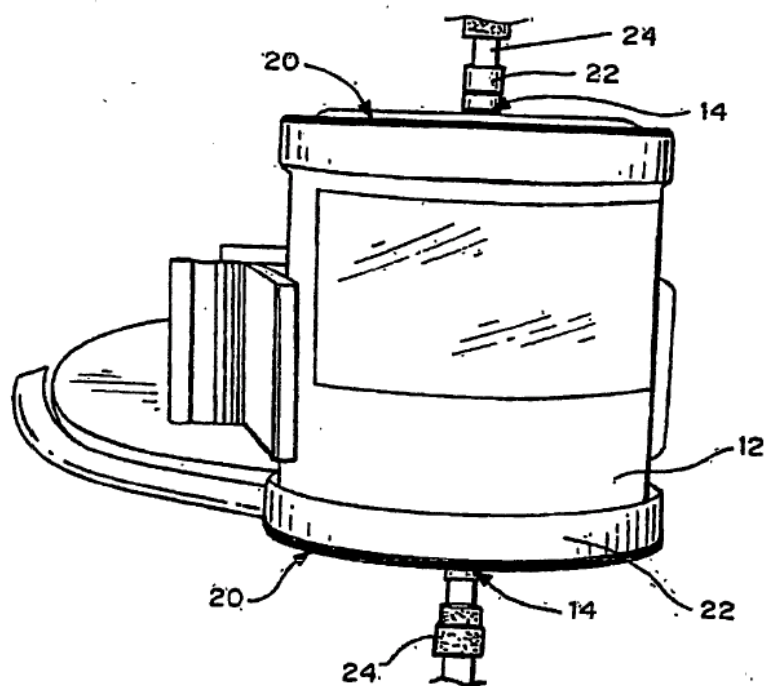
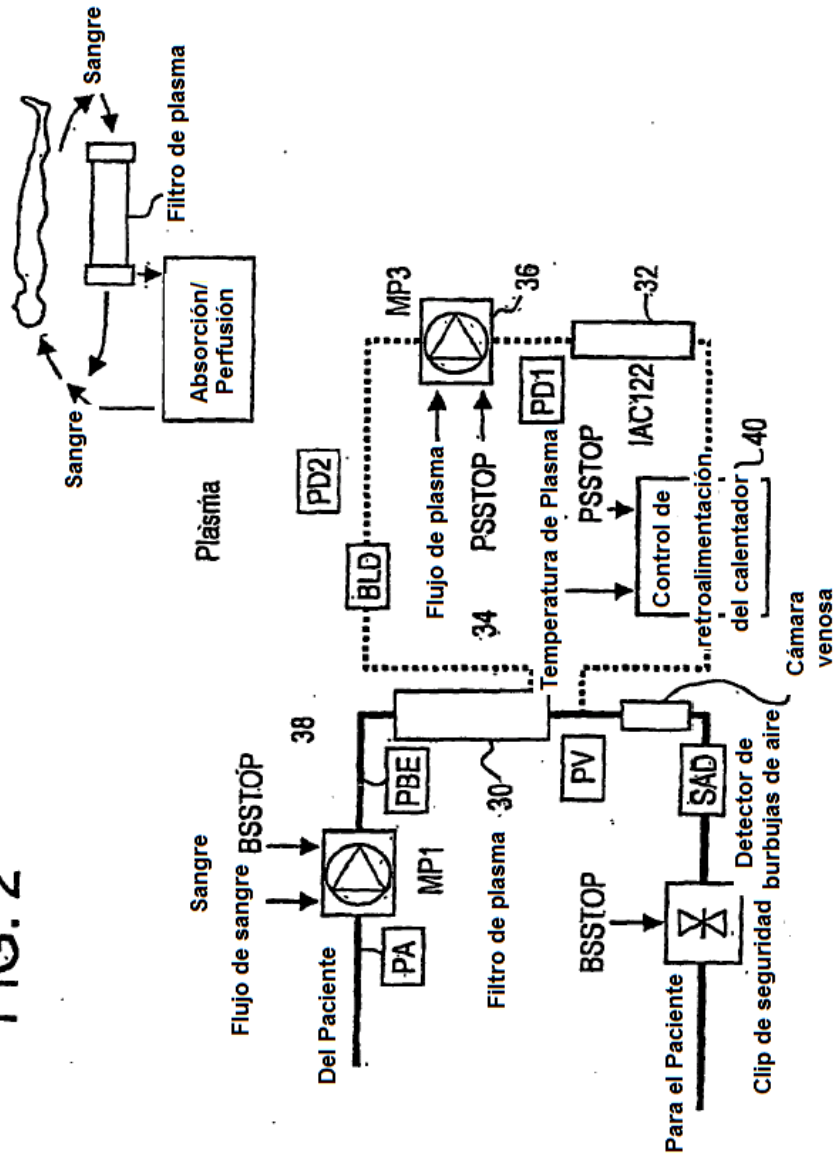
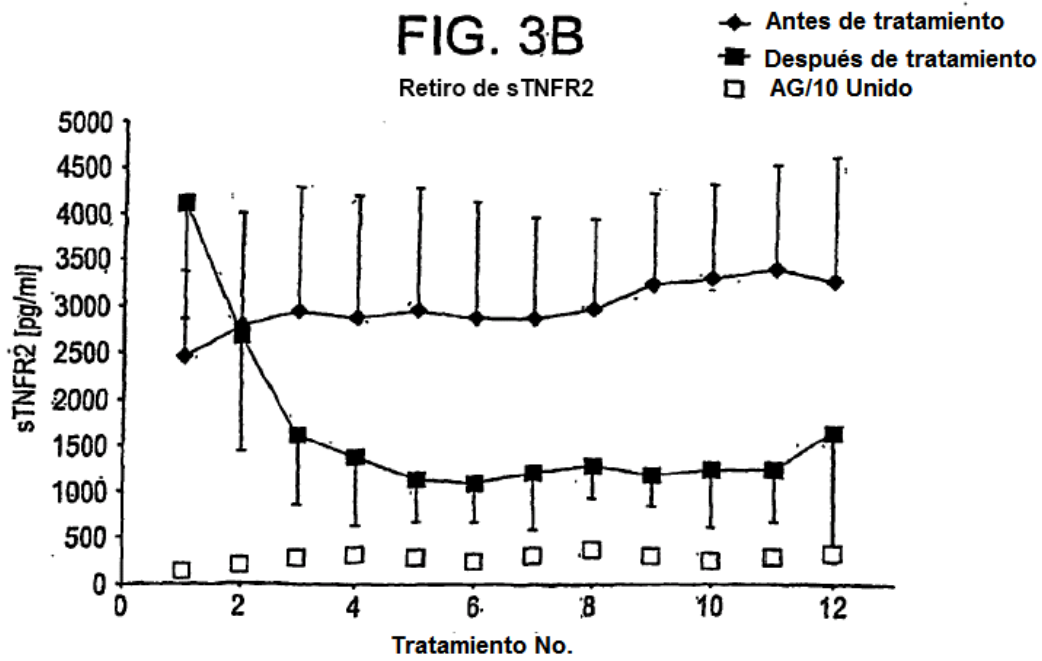
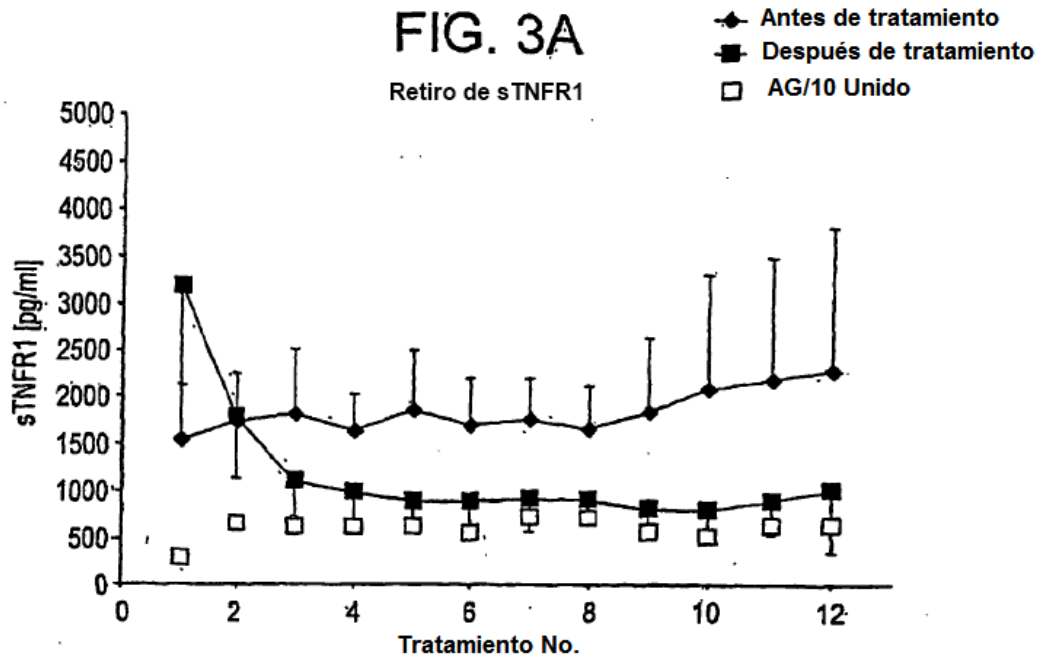


FIG. 2





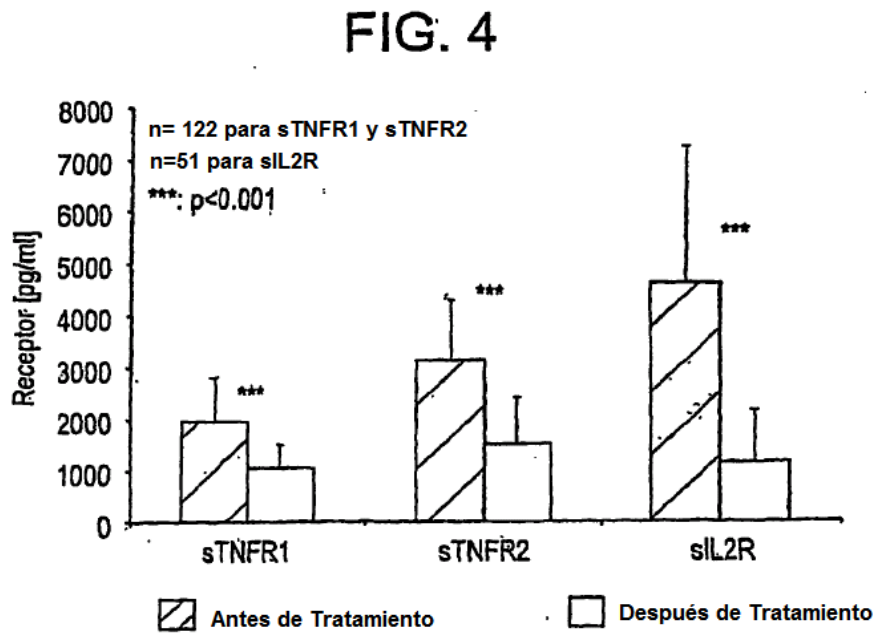
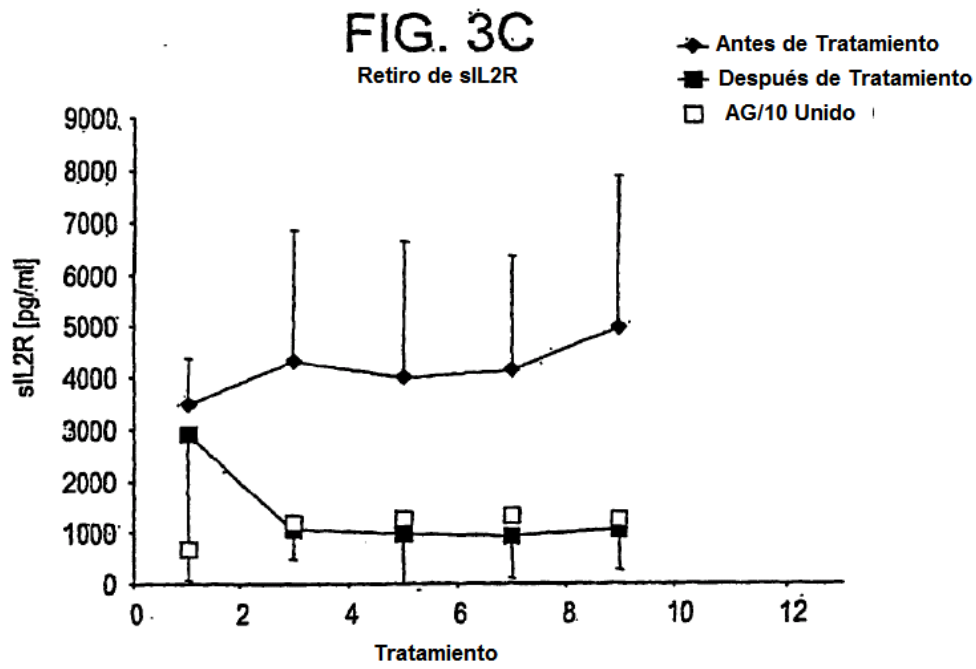


FIG. 5A

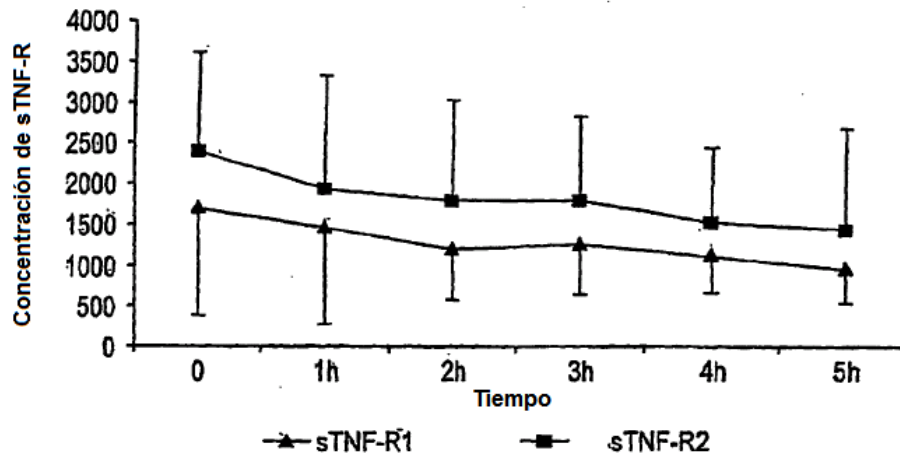


FIG. 5B

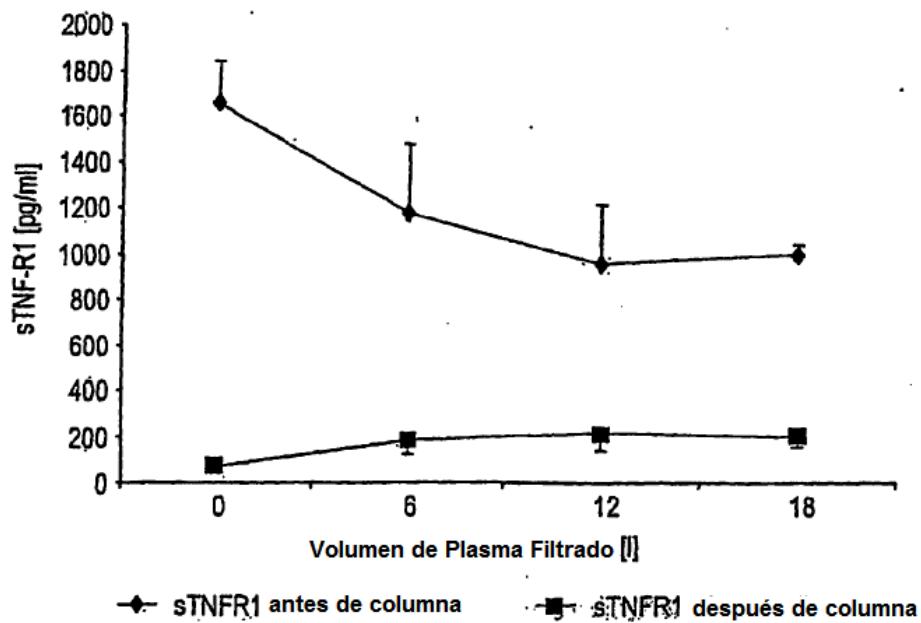


FIG. 5C

