

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 065**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2005 E 05738161 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 1874821**

54 Título: **Combinación de anticuerpos con glucocorticoides para el tratamiento del cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.08.2013

73 Titular/es:

**TRION PHARMA GMBH (100.0%)
FRANKFURTER RING 193A
80807 MUNCHEN, DE**

72 Inventor/es:

**LINDHOFER, HORST y
HEISS, MARKUS, M.**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 417 065 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

Combinación de anticuerpos con glucocorticoides para el tratamiento del cáncer.

La presente invención se refiere a la utilización de glucocorticoides para la producción de medicamentos que reducen o eliminan los efectos secundarios no deseados que se producen durante el tratamiento de enfermedades con anticuerpos inmunoestimuladores debido a la liberación no específica de citoquinas, así como a una composición farmacéutica que contiene al menos un anticuerpo inmunoestimulador y al menos un glucocorticoide.

Los procedimientos inmunoterapéuticos tienen un papel cada vez más importante en el tratamiento de enfermedades difíciles o poco controlables, en particular en el cáncer e infecciones. Preferentemente se utilizan anticuerpos como medios inmunoestimuladores (véase Glennie y Johnson (2000), *Immunology Today* 21(8): 403-410). En particular, la eficacia de este tipo de anticuerpos inmunoestimuladores se basa en la posibilidad de unión específica a antígenos definidos. Sin embargo, hasta la fecha, un importante problema de la lucha contra enfermedades como el cáncer y las infecciones con anticuerpos inmunoestimuladores estriba en los graves efectos secundarios provocados por la administración de este tipo de anticuerpos, observándose principalmente una fuerte indisposición, vómitos, reacciones alérgicas, hipotonía, taquicardia, fiebre alta e incluso fallo circulatorio u orgánico mortal, en la mayoría de los casos debido a un SIRS (inglés: "systemic inflammatory response syndrome" - síndrome de respuesta inflamatoria sistémica).

En la mayoría de los casos, estos fuertes efectos secundarios de los anticuerpos inmunoestimuladores se relacionan con la liberación no específica de citoquinas provocada por los anticuerpos, que es la causa de gran parte de los efectos secundarios clínicos arriba mencionados. La magnitud de la liberación de citoquinas, que depende de la cantidad administrada y de la velocidad de administración del anticuerpo inmunoestimulador, limita la dosis tolerable del anticuerpo inmunoestimulador correspondiente en la aplicación clínica.

Los glucocorticoides son conocidos desde hace tiempo como principios activos antiinflamatorios e inmunosupresores altamente eficaces. Un mecanismo relacionado con el efecto inmunosupresor de los glucocorticoides es su efecto reductor de la transcripción de citoquinas (véase, por ejemplo, Blotta y col. (1997) *J. Immunol.* 158: 5589 a 5595; Ballow y Nelson (1997) *JAMA* 278 (22), capítulo 24: 2008 a 2017). En los últimos años se han hecho progresos en la investigación del efecto inmunosupresor de los glucocorticoides, en particular en relación con el desarrollo de células T y su función, descritos de forma resumida, por ejemplo, en Ashwell y Vacchio (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18: 309 a 345. En el desarrollo de terapias inmunosupresoras eficaces, en particular para evitar rechazos (agudos) de trasplantes, se utilizan preferentemente glucocorticoides en combinación con otros agentes inmunosupresores. Por ejemplo, Herbelin y col. (*Transplantation* (2000) 68 (5): 616 a 622) informan de una mejora de la terapia inmunosupresora aguda con el anticuerpo anti-CD3 OKT3 por administración previa de glucocorticoides, gracias a la reducción de la producción de TNF- α , IL-2 e IFN- γ provocada por éstos. Sin embargo, en el estado actual de la técnica, la administración de glucocorticoides en relación con la estimulación del sistema inmunológico mediante terapias con anticuerpos, por ejemplo con anticuerpos trifuncionales (ACtr), es totalmente desconocida. Hasta la fecha, los glucocorticoides se administran cuando el objetivo terapéutico es la inmunosupresión.

Por ello, la presente invención tiene por objetivo proponer un nuevo sistema para reducir en la mayor medida posible los efectos secundarios de los anticuerpos con actividad inmunoestimuladora.

Este objetivo se resuelve mediante las formas de realización de la presente invención caracterizadas en las reivindicaciones.

En particular, de acuerdo con la invención se propone la utilización de uno o más glucocorticoides en la producción de un medicamento para reducir la liberación no específica de citoquinas durante el tratamiento de enfermedades con uno o más anticuerpos inmunoestimuladores, según las reivindicaciones.

Esta novedosa indicación de los glucocorticoides en relación con la terapia con anticuerpos para la inmunoestimulación en caso de ciertas enfermedades, en particular cáncer, se basa en la sorprendente constatación de que la combinación de anticuerpos inmunoestimuladores de especificidad definida junto con los glucocorticoides conduce a reducir la liberación no específica de citoquinas por las células inmunológicas, sin que ello influya negativamente en el efecto de los anticuerpos inmunoestimuladores dirigido contra el o los antígenos definidos. Principalmente en relación con la utilización de anticuerpos para la inmunoestimulación (por ejemplo contra células tumorales), la combinación de anticuerpos con glucocorticoides conduce a una modulación de la actividad inmunológica resultante: la actividad inmunológica del o de los anticuerpos dirigida contra el o los antígenos definidos se mantienen en gran medida inalterada, mientras que los efectos no específicos que se producen con la administración de anticuerpos inmunoestimuladores independientemente de la unión con el antígeno o los antígenos diana, como la liberación no específica de citoquinas anteriormente descrita, se reducen de forma significativa.

Gracias a la combinación de glucocorticoides (esto es uno o más glucocorticoides) con uno o más anticuerpos inmunoestimuladores se obtienen diversas ventajas en comparación con las terapias inmunoestimuladoras

conocidas del estado actual de la técnica, que amplían considerablemente la aplicabilidad clínica de los anticuerpos en la terapia inmunológica:

1. Con una misma dosificación y un efecto específico en gran medida inalterado (es decir contra el antígeno o los antígenos diana), los efectos secundarios no deseados provocados se reducen considerablemente (como se ha indicado más arriba) debido a que disminuye la liberación de citoquinas.
2. La reducción de los efectos secundarios no deseados permite aumentar considerablemente la dosificación del anticuerpo o los anticuerpos a administrar. De este modo, la combinación con glucocorticoides posibilita un aumento considerable del efecto con el aumento de la dosis de anticuerpo.
3. Sorprendentemente, los glucocorticoides a utilizar según la invención sólo reducen la liberación no específica de citoquinas independiente de la unión del antígeno diana (sistémica). Por consiguiente, la liberación de citoquinas sólo se produce en el lugar de la unión con el antígeno (por ejemplo en el lugar de unión y destrucción intencionada de células tumorales). Así, gracias a este efecto, además de la nueva posibilidad de mayor dosificación arriba descrita, el efecto del anticuerpo inmunoestimulador se focaliza en el lugar de la unión de antígeno sin que influya en las citoquinas liberadas de forma sintética.

En el sentido de la presente invención, el concepto "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, quiméricos, humanizados, pudiendo todos ellos estar presentes en forma combinada o soluble, así como también fragmentos de los anticuerpos arriba mencionados. Además de los fragmentos de anticuerpos según la invención de forma aislada, también se pueden presentar anticuerpos según la invención en forma recombinante como proteínas de fusión con otros componentes (proteínicos). Los fragmentos como tales o los fragmentos de anticuerpos según la invención como componentes de proteínas de fusión se obtienen habitualmente por métodos de disociación enzimática, síntesis de proteínas o métodos de recombinación usuales para los especialistas. De acuerdo con la invención se trata de un anticuerpo trifuncional (ACtr).

Los anticuerpos quiméricos según la invención son moléculas de acuerdo con las reivindicaciones y que contienen diferentes componentes, derivándose éstos de diferentes tipos de animales (por ejemplo anticuerpos que presentan una región variable derivada un anticuerpo monoclonal de ratón y una región constante de una inmunoglobulina humana). Por un lado, los anticuerpos quiméricos según las reivindicaciones se utilizan preferentemente para reducir la inmunogenicidad durante el uso y, por otro lado, para aumentar los rendimientos de producción. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales murinos tienen mayores rendimientos en líneas celulares de hibridoma, pero también conducen a una mayor inmunogenicidad en humanos, de modo que, preferentemente, se utilizan anticuerpos quiméricos humanos/murinos. De forma especialmente preferente, se utiliza un anticuerpo monoclonal que reúne en sí las regiones hipervariables que definen la complementariedad (CDR, en inglés: "complementary defining region") de un anticuerpo monoclonal murino con las demás áreas de un anticuerpo humano. Este tipo de anticuerpos se denominan anticuerpos humanizados. En el estado actual de la técnica se conocen anticuerpos quiméricos y procedimientos para su producción (Cabilly y col., Proc. Natl. Sci. USA 81: 3273-3277 (1984); Morrison y col. Proc. Natl. Acad. Sci USA 81:6851-6855 (1984); Boulianne y col. Nature 312 643-646 (1984); Cabilly y col., EP-A-125023; Neuberger y col., Nature 314: 268-270 (1985); Taniguchi y col., EP-A-171496; Morrison y col., EP-A-173494; Neuberger y col., WO 86/01533; Kudo y col., EP-A-184187; Sahagan y col., J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson y col., WO 87/02671; Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84: 3439-3443 (1987); Sun y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84: 214218 (1987); Better y col., Science 240: 1041-1043 (1988) y Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, *supra*).

En el sentido de la presente invención, el concepto "anticuerpo inmunoestimulador" o "anticuerpo inmunoterapéutico" significa que el anticuerpo en cuestión, debido a su especificidad antigénica, provoca o favorece la estimulación del sistema inmunológico del paciente deseada en el marco del tratamiento de la enfermedad correspondiente.

En el sentido de la presente invención, los anticuerpos inmunoestimuladores son, en particular, aquellos que provocan una activación de células T. En este contexto es especialmente preferente la activación de las células T citotóxicas (CTL, en inglés: "cytotoxic T lymphocytes", denominadas células T asesinas). No obstante, también están incluidos los anticuerpos inmunoestimuladores con efectos facilitados por anticuerpos, que se producen por ejemplo por la activación de células T coadyuvantes, células accesorias (macrófagos), células dendríticas, células B o células asesinas naturales (células NK).

Los anticuerpos inmunoestimuladores son biespecíficos y trifuncionales. En particular en el caso de los anticuerpos biespecíficos se mencionan las moléculas de anticuerpos recombinantes que se producen mediante técnicas recombinantes, por ejemplo moléculas scFv (denominadas "single chain antibodies"), *diabodies* ("diacuerpos"). La estructura básica de inmunoconjugados y anticuerpos biespecíficos se describe por ejemplo en Spriell y col. (2000) Immunol. today 21: 391-397. Evidentemente, también se pueden preparar anticuerpos biespecíficos mediante técnicas de hibridoma conocidas. Algunos procedimientos para la producción de fragmentos de anticuerpo multivalentes y biespecíficos son conocidos por los especialistas y se describen, por ejemplo, en Tomlinson y Holliger (2000) Meth. Enzymol 326: 461 y siguientes. Un ejemplo especialmente preferente de anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico trifuncional en cuya parte Fc, es decir la parte del anticuerpo que no interviene directamente en la unión a antígeno, se pueden unir inmunocitos accesorios.

De acuerdo con la invención, anticuerpos inmunoestimuladores biespecíficos preferentes son aquellos que presentan al menos una especificidad contra un antígeno de una célula a eliminar, por ejemplo una célula tumoral, y contra un marcador CD. El marcador CD de un anticuerpo inmunoestimulador biespecífico de este tipo se expresa preferentemente en los linfocitos T y, por tanto, se elige de entre el grupo consistente en CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28 y CD44. Así, la especificidad de las células T del anticuerpo biespecífico recluta por un lado células T de forma específica. La segunda especificidad del anticuerpo con actividad inmunoestimuladora está dirigida contra un antígeno, que a ser posible se expresa específicamente en la célula a eliminar por el sistema inmunológico. En el caso de las células cancerosas se trata preferentemente del llamado antígeno tumoral, es decir, un péptido o polipéptido expresado sobre la superficie de las células tumorales. Anticuerpos preferentes con acción inmunoestimuladora contra células cancerosas son, por ejemplo, EpCAM, HER2/neu, HER3/neu, G250, CEA, MAGE, VEGF, GD3, EGFR, $\alpha V\beta 3$ -integrina, HLA, HLADR, ASC, CD1, CD2, CD4, CD6, CD7, CD8, CD11, CD13, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD33, CD40, CD41, CD52, c-erb-2, CALLA (CD10), MHCII, CD44v3, CD44v6, CD117, p97, gangliósido GD2, GD3, C215, antígeno del Ak 9.2.27, antígeno del Ak NE150 y antígeno del Ak CA125 (véase también Jager (2001) J. Clin. Pathol. 54(9): 669-674; Jager (2002) Curr. Opin. Immunol 14(2): 178-182).

En este contexto resulta especialmente preferente, como ya se ha mencionado, una variante de una molécula de anticuerpo biespecífica que presenta en la parte Fc uno o más sitios de unión para inmunocitos accesorios. Por tanto, este tipo de anticuerpo no sólo recluta la célula a eliminar, por ejemplo una célula tumoral, y células T, sino que, al mismo tiempo, también recluta inmunocitos accesorios, como monocitos o macrófagos, formando así un "complejo tricerular". Mediante el reclutamiento del tercer componente de unión celular se provoca la fagocitosis de la célula a eliminar. Esta es a su vez una condición previa para la producción de una respuesta inmunitaria policlonal, con la que el paciente no sólo se inmuniza contra el antígeno aislado expresado sobre la célula a eliminar, sino también contra muchas de las células a eliminar, en particular células tumorales, en el cuerpo del paciente con todas sus posibles mutaciones.

Algunas formas de realización especialmente preferentes de anticuerpos biespecíficos trifuncionales que tienen efecto inmunoestimulador están provistos, por ejemplo, de la especificidad anti-EpCAM x anti-CD3 o anti-HER2/neu x anti-CD3.

El glucocorticoide a utilizar según la invención no presenta ninguna limitación especial y puede ser tanto natural, por ejemplo hidrocortisona (cortisol) o cortisona, como sintético. Tampoco existe ningún tipo de limitación en lo que respecta a su selección en relación con la vida media biológica (acción breve, acción intermedia y acción prolongada). Algunos glucocorticoides sintéticos a utilizar según la invención son, por ejemplo y sin limitación, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, betametasona, dexametasona, acetato de cortisona, prednilideno, deflazacort, cloprednol, flucortolona y budenósido.

Un glucocorticoide especialmente preferente según la presente invención es el glucocorticoide dexametasona. Se trata de un glucocorticoide sintético cuya vida media oscila entre 36 y 54 horas, lo que corresponde a un glucocorticoide de acción prolongada. Por ello es especialmente adecuado para un tratamiento que requiera una acción continua de glucocorticoides. Después de su administración, entre un 70 y un 80% de la dexametasona se une a albúmina, con lo que queda una proporción libre y eficaz del glucocorticoide de entre un 20 y un 30%. La dexametasona tiene un efecto aproximadamente 30 veces más fuerte que el de la cortisona (hormona natural segregada por la corteza adrenal), un bajo efecto de corticoide mineral y un bajo efecto de retención de agua y sales. Entre muchas otras aplicaciones, también es particularmente adecuada para ser administrada a pacientes con insuficiencia cardíaca o hipertensión. También tiene importancia terapéutica el fuerte efecto antiflogístico e inmunosupresor (antialérgico) de la dexametasona. Otra ventaja es que, después de inyección intravenosa, en pocos minutos se alcanzan concentraciones máximas en plasma.

Como ejemplos de cánceres que pueden ser tratados con el anticuerpo (o varios anticuerpos) inmunoterapéutico según la invención junto con el glucocorticoide (o varios glucocorticoides) se pueden mencionar: carcinoma de estómago, adenocarcinoma, melanoma maligno, carcinoma de colon, carcinoma de páncreas, carcinoma ovárico, carcinoma de útero, carcinoma hepatocelular, carcinoma bronquial (todos los tipos histológicos), linfomas, sarcomas, carcinoma pulmonar de células pequeñas, blastomas, tumor estromal gastrointestinal (GIST), etc.

De acuerdo con la invención no existe ningún tipo de limitación en cuanto al modo de administración tanto del anticuerpo inmunoestimulador como del glucocorticoide. Por consiguiente, tanto el glucocorticoide como el anticuerpo pueden ser administrados vía intraperitoneal, sistémica (intravenosa o intraarterial), intramuscular, intradérmica, subcutánea, intratumoral o también selectivamente en un órgano definido o a través de éste. Evidentemente, el glucocorticoide también se puede administrar vía oral o se puede aplicar sobre la piel en forma de pomada, gel u otra forma de administración adecuada. Como ejemplo de administración selectiva o a través de un órgano se puede mencionar la administración a través de la médula (como órgano inmunológico) o a través de un catéter superselectivo en un vaso (arteria) que abastece el órgano correspondiente. Un ejemplo específico de administración de este tipo con catéter puede ser el empleo de la arteria hepática para la administración selectiva en el hígado o para la administración sistémica después del paso por el órgano. Otros ejemplos de administración específica en un órgano son la administración en el hígado a través de la vena porta, en los riñones a través de la

arteria renal, en el páncreas a través del tronco celíaco y la arteria mesentérica superior y en tumores en las extremidades a través de las arterias correspondientes. Además, también se puede llevar a cabo una administración directa en un tumor. Evidentemente, en la utilización según la invención de los anticuerpos inmunoestimuladores y glucocorticoides, la administración de estos componentes activos se puede llevar a cabo por la misma vía o por vías diferentes, por ejemplo el o los anticuerpos se pueden administrar selectivamente por el hígado, y el o los glucocorticoides se pueden administrar de forma sistémica, por ejemplo vía intravenosa.

Por ejemplo, el glucocorticoide se puede administrar de forma simultánea, por separado o de modo escalonado en el tiempo con respecto al anticuerpo que actúa como agente inmunoestimulador. Así, el glucocorticoide se puede administrar, antes, después o al mismo tiempo que el anticuerpo. De acuerdo con una forma de realización especialmente preferente, el glucocorticoide y el anticuerpo inmunoestimulador se administran aproximadamente al mismo tiempo.

Otro objeto de la invención es un producto que contiene al menos un anticuerpo inmunoestimulador o inmunoterapéutico tal como se ha definido anteriormente y al menos un glucocorticoide tal como se ha definido anteriormente como preparado combinado para la administración simultánea, por separado o de modo escalonado en el tiempo, en el tratamiento y/o la profilaxis de cánceres, enfermedades tumorales. Los cánceres incluyen, por ejemplo, carcinoma de estómago, adenocarcinoma, melanoma maligno, carcinoma de colon, carcinoma de páncreas, carcinoma ovárico, carcinoma de útero, carcinoma hepatocelular, todos los tipos histológicos del carcinoma bronquial, linfomas, sarcomas y/o blastomas.

Los componentes del producto según la invención: al menos un anticuerpo inmunoestimulador o inmunoterapéutico (1^{er} componente) y al menos un glucocorticoide tal como se define más arriba (2^o componente), forman una unidad funcional por su utilización dirigida a un objetivo. Los componentes del producto no pueden desplegar independientemente entre sí el efecto ventajoso según la invención arriba descrito, de modo que, a pesar de la separación física de los componentes 1 y 2 (para una administración simultánea, por separado o de modo escalonado en el tiempo), su utilización constituye un producto combinado nuevo, no descrito en el estado actual de la técnica.

Un producto según la invención puede incluir todos los componentes, sustancias y formas de realización, tal como se utilizan en un procedimiento, por ejemplo de terapia, para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades o en el procedimiento de terapia combinada según la presente invención.

Otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos un anticuerpo inmunoestimulador o inmunoterapéutico tal como se define más arriba y al menos un glucocorticoide tal como se define más arriba. La composición farmacéutica de la presente invención es particularmente adecuada para el tratamiento de las enfermedades arriba mencionadas. En caso dado, los componentes farmacológicamente activos de la composición farmacéutica según la invención se presentan junto con uno o más vehículos y/o coadyuvantes, tal como se describirá con mayor posteriormente.

En la composición farmacéutica según la invención o en la utilización según la invención de los glucocorticoides, éstos y los anticuerpos se preparan ventajosamente en formulaciones adecuadas. Este tipo de formulaciones son conocidas por los especialistas y, además de las sustancias de efecto terapéutico o inmunoestimulador, contienen uno o más soportes y/o vehículos farmacéuticamente compatibles. Por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980), cuyo contenido completo forma parte de la divulgación de la presente invención, se dan a conocer métodos para la formulación y preparación adecuada de este tipo de formulaciones. Como material soporte para la administración parenteral entran en consideración, por ejemplo, agua estéril, solución salina estéril, polialquilenglicoles, naftaleno hidrogenado y en particular polímeros de lactida biocompatibles, copolímeros de lactida/glicólido o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno. Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden contener sustancias de carga o sustancias como lactosa, manitol, sustancias para la unión covalente de polímeros, por ejemplo polietilenglicol, con los anticuerpos inmunoestimuladores según la invención, para formar complejos con iones metálicos o incluir materiales en o sobre determinados preparados de compuestos poliméricos, por ejemplo polilactato, ácido poliglicólico, hidrogel, o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilaminares o multilaminares, fragmentos de eritrocitos o esferoblastos. Las formas de realización correspondientes de las composiciones farmacéuticas se eligen en función de su comportamiento físico o de la solubilidad, la estabilidad, la biodisponibilidad o la degradabilidad. La liberación controlada o constante de los componentes de principio activo según la invención incluye la formulación basada en depósitos lipófilos (por ejemplo ácidos grasos, ceras o aceites). En el marco de la presente invención también se dan a conocer revestimientos de composiciones farmacéuticas o medicamentos según la invención, que contienen las sustancias de efecto terapéutico, es decir, revestimientos con polímeros (por ejemplo polioxámeros o polioxaminas). Además, las sustancias o composiciones de efecto terapéutico según la invención pueden presentar revestimientos protectores, por ejemplo inhibidores de proteasa o amplificadores de la permeabilidad. Algunos vehículos preferentes son típicamente materiales acuosos, utilizándose agua para inyección (WFI) o agua tamponada con fosfato, citrato, HEPES o acetato, etc., y ajustándose el pH típicamente a un valor entre 5,0 y 8,0 (preferentemente entre 6,5 y 7,5). Preferentemente, el soporte o vehículo contendrá adicionalmente componentes salinos, por ejemplo cloruro de sodio, cloruro de potasio u otros componentes que llevan a la solución por ejemplo a condiciones isotónicas.

Además de los componentes arriba mencionados, el soporte o vehículo también puede contener componentes adicionales, como seroalbúmina humana (HSA), polisorbato 80, azúcares o aminoácidos, etc.

5 El modo de administración y la dosificación del medicamento, del producto según la invención o de las composiciones farmacéuticas dependen del tipo de enfermedad a combatir, en caso dado su estadio, el antígeno a dirigir, y también del peso corporal, la edad y el sexo del paciente.

10 La concentración de los componentes activos en las formulaciones según la invención puede variar dentro de amplios márgenes. La dosis del anticuerpo según la invención oscila entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 1 mg, mientras que los glucocorticoides se administran en general a dosis de entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 1.000 mg, en particular entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 100 mg.

15 De acuerdo con la invención se propone además un procedimiento para el tratamiento de las enfermedades arriba mencionadas, que incluye la administración de un anticuerpo inmunoestimulador tal como se define más arriba y al menos un glucocorticoide a un paciente, en particular a un humano. En este contexto es preferente la administración previa o simultánea del glucocorticoide, o previamente o junto con el anticuerpo inmunoestimulador. Evidentemente, de acuerdo con la invención se pueden utilizar diversos anticuerpos inmunoestimuladores y diversos glucocorticoides en cualquier combinación.

20 Otro objeto de la invención se refiere a un *kit* que contiene al menos un anticuerpo inmunoestimulador o inmunoterapéutico tal como se define más arriba y al menos un glucocorticoide tal como se define más arriba, estando separados entre sí el o los anticuerpos inmunoestimuladores o inmunoterapéuticos tal como se definen más arriba y el o los glucocorticoides tal como se definen más arriba.

25 Una forma de realización preferente de la invención se refiere a la utilización del *kit* para el tratamiento y/o la profilaxis de cánceres, enfermedades tumorales. Los cánceres incluyen, por ejemplo, carcinoma de estómago, adenocarcinoma, melanoma maligno, carcinoma de colon, carcinoma de páncreas, carcinoma ovárico, carcinoma de útero, carcinoma hepatocelular, todos los tipos histológicos del carcinoma bronquial, linfomas, sarcomas y/o blastomas.

En las Figuras:

Fig. 1: representaciones gráficas que documentan la liberación de interleuquina-6 (IL-6) por células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (concentración 10^6 células/ml) después de estimulación con o sin células tumorales EpCAM-positivas (concentración $5 \cdot 10^4$ células/ml).

30 **Fig. 1A:** representa la liberación de IL-6, indicando el eje "Y" la concentración de IL-6 en pg/ml. El eje "X" indica la estimulación correspondiente con PBMC, utilizándose como control PBMC no estimuladas (barra PBMC). En este contexto, E representa en cada caso la estimulación con 100 µg/ml de anticuerpo biespecífico trifuncional con especificidad anti-EpCAM x anti-CD3. Con el término "dexa" se designa dexametasona a la concentración indicada en µg/ml. En el experimento según la Fig. 1A se analizó la liberación de IL-6 a partir de PBMC después de estimulación sin contacto con células tumorales Ep-CAM-positivas (= células diana). La estimulación sin células tumorales Ep-CAM-positivas corresponde a la liberación no específica de citoquinas, que es independiente de la unión de antígeno. Así, la liberación se produce de forma sistémica en todas las PBMC. Como muestra la Fig. 1A, la dexametasona reduce la liberación de IL-6 en función de la concentración. En caso de una concentración de 1 µg/ml se produce una supresión prácticamente completa de la liberación de IL-6. Por ello, una dosis suficientemente alta de dexametasona debería permitir suprimir prácticamente por completo los efectos secundarios provocados por la liberación sistémica de IL-6.

45 **Fig. 1B:** muestra en un gráfico correspondiente al de la Fig. 1A la liberación de IL-6 a partir de PBMC después de estimulación en contacto con células tumorales Ep-CAM-positivas (HCT8; concentración $5 \cdot 10^4$ células/ml). Este método de estimulación con células tumorales EpCAM-positivas corresponde a la situación de la liberación de IL-6 en el lugar de la unión de antígeno por las PBMC. Así, la IL-6 medida en esta disposición experimental corresponde a la acción específica (es decir, dirigida a un objetivo) del anticuerpo utilizado y por tanto no representa ningún efecto secundario no deseado. La IL-6 sólo es liberada por inmunocitos que intervienen directamente en la respuesta inmunitaria. Por ello, la liberación absolutamente mayor (compárese la graduación del eje "Y" en la Fig. 1B con la de la Fig. 1A) no debe valorarse como una señal de un aumento de los efectos secundarios, sino que se explica por el efecto inmunológico específico en el lugar de unión del antígeno. En el uso clínico del anticuerpo inmunoestimulador junto con el glucocorticoide, la cantidad elevada de IL-6 sólo es liberada por unas pocas PBMC que intervienen directamente en el efecto específico. Sin embargo, los efectos secundarios se deben a la liberación no específica de interleuquinas por la totalidad de las PBMC (lo que se documenta en la anterior Fig. 1A). Tal como se desprende de la Fig. 1B, en caso de una concentración de dexametasona de 1 µg/ml, se reduce la liberación de IL-6, pero ésta es muy superior a

la liberación sistémica observada en caso de una estimulación sin células tumorales EpCAM-positivas con el anticuerpo sin dexametasona (véase la Fig. 1A). Por ello, en caso de una dosis combinada del anticuerpo inmunoestimulador con dexametasona se inhibe esencialmente la liberación no específica de IL-6, mientras que el efecto selectivo del anticuerpo inmunoestimulador sigue siendo significativo.

- 5 **Figura 1C:** representa en otro diagrama una comparación porcentual de la liberación de IL-6 después de estimulación sin/con células HCT8 (células diana) según las Fig. 1A y 1B anteriores. El eje "Y" indica la liberación porcentual de IL-6 con respecto al valor sin la utilización simultánea de dexametasona (= 100%). Las barras de la izquierda representan en cada caso los valores después de estimulación sin HCT8, mientras que las barras de la derecha indican en cada caso el resultado después de la estimulación con HCT8. Entre una dosificación de dexametasona de 0,1 a 1 µg/ml se produce una disociación de la secreción de IL-6 en caso de estimulación de las PBMC con los anticuerpos en ausencia de células HCT8 en comparación con la estimulación en presencia de células HCT8: con 1 µg/ml de dexametasona se mantiene la liberación específica de IL-6 (es decir, provocada por la unión de la célula tumoral EpCAM-positiva) asociada al efecto. En cambio, la secreción no específica de IL-6, que es independiente de la unión del antígeno (en este caso de la unión de EpCAM sobre las células HCT8), se reduce esencialmente o desaparece.
- 10
- 15 **Fig. 2:** muestra diagramas de los resultados de la liberación del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) después de estimulación con anticuerpos biespecíficos trifuncionales con especificidad anti-EpCAM x anti-CD3, sin células tumorales EpCAM-positivas o en su presencia.
- 20 **Fig. 2A:** muestra, de modo similar a la anterior Fig. 1A (en ese caso con respecto a la IL-6), la liberación de TNF- α a partir de PBMC después de estimulación sin contacto con células tumorales Ep-CAM-positivas. En este caso, el eje "Y" indica la concentración de TNF- α en pg/ml. Esta estimulación sin células diana corresponde de nuevo, como ya se ha descrito en relación con la Fig. 1A, a la liberación sistémica no específica de citoquinas, que se produce independientemente de la interacción anticuerpo-antígeno. Esta liberación sistémica de TNF- α tiene lugar en toda la población de PBMC. La dexametasona reduce la liberación de TNF- α en función de la concentración. En caso de una concentración de 0,1 µg/ml ya se produce una fuerte reducción de la liberación de TNF- α , que corresponde aproximadamente a una quinta parte de la liberación de TNF- α producida en caso de una estimulación con anticuerpos sin dosis de glucocorticoides. A partir de una concentración de glucocorticoide de 1 µg/ml o más se produce incluso una supresión completa de la liberación de TNF- α .
- 25
- 30 **Fig. 2B:** representa en un diagrama similar al de la Fig. 1B la liberación de TNF- α a partir de PBMC después de estimulación de anticuerpos en contacto con células tumorales EpCAM-positivas. El eje "Y" también indica aquí la concentración de TNF- α en pg/ml. El resto del diagrama corresponde al de la Fig. 1B. La estimulación con células tumorales EpCAM-positivas como células diana llevada a cabo en esta disposición experimental corresponde a la situación de la liberación de TNF- α en el lugar de la unión de antígeno por las PBMC. Así, la concentración de TNF- α medida en este experimento se debe en su mayor parte al efecto específico (es decir, dirigido a un objetivo) del anticuerpo y por tanto no presenta ningún efecto secundario no deseado. En la liberación de TNF- α , en caso de una estimulación en contacto con células tumorales EpCAM-positivas también se miden valores absolutamente más altos en comparación con la estimulación sin contacto con células diana, valores que sin embargo, como ya se ha descrito anteriormente en relación con la liberación de IL-6 en la Fig. 1B, se deben al efecto inmunológico específico en el lugar de la interacción anticuerpo-antígeno. En esta liberación de TNF- α analizada, con una concentración del glucocorticoide dexametasona de 1 µg/ml o más, también se observa una clara disminución de la liberación específica de TNF- α , aunque ésta sigue siendo significativa.
- 35
- 40 **Fig. 2C:** representa, en un diagrama correspondiente a la Fig. 1C, una comparación porcentual de la liberación de TNF- α después de la estimulación sin (en cada caso la barra izquierda) o con (en cada caso la columna derecha) células diana HCT8. Los valores del 100% corresponden a la liberación de TNF- α sin dosis simultánea de dexametasona. En lo que respecta al diagrama, véase la Fig. 1C. También en relación con el TNF- α , entre una dosificación de dexametasona de 0,1 y 1 µg/ml se observa una disociación de la secreción de citoquinas con células diana en comparación con la estimulación en contacto con células diana. Con 1 µg/ml de dexametasona se mantiene la liberación específica de TNF- α (es decir, provocada por la unión de la célula tumoral EpCAM-positiva) asociada al efecto (más del 60% de la liberación de citoquina con respecto a la estimulación por anticuerpos sin adición simultánea de glucocorticoides). En cambio, la secreción no específica de TNF- α , que es independiente de la unión del antígeno (unión de EpCAM sobre células HCT8), bajo adición de 0,1 µg/ml de dexametasona se reduce se reduce al menos a un 20% del valor medido en caso de estimulación con anticuerpos sin adición de dexametasona. Con 1 mg/ml de dexametasona, la liberación no específica de TNF- α incluso desaparece por completo.
- 45
- 50
- 55 **Fig. 3:** otros diagramas, correspondientes a las representaciones de las Fig. 1 y 2 arriba descritas, de los resultados de la liberación de interferón γ (IFN- γ) a partir de PBMC después de su estimulación con anticuerpos biespecíficos (anti-EpCAM x anti-CD3) sin o con contacto con células diana (células tumorales EpCAM-positivas). El IFN- γ (como el TNF- α) es una citoquina específica de TH1 (células T
- 60

- coadyuvantes de tipo 1) y además un marcador para la destrucción de células diana específica de antígeno y facilitada por células T. El IFN- γ es descargado por linfocitos T específicos después de estimulación contra antígeno. Por ello, en caso de una estimulación con anticuerpos sin contacto simultáneo con las células diana no debería aparecer IFN- γ , ya que aquí no se produce ninguna estimulación basada en una interacción antígeno diana-anticuerpo.
- 5 **Fig. 3A:** confirma, en un diagrama correspondiente a la Fig. 1A o 2A (eje "Y": concentración de IFN- γ en pg/ml), las expectativas ya descritas, ya que en ninguna de las estimulaciones sin contacto con células tumorales EpCAM-positivas se produce una liberación de IFN- γ .
- 10 **Fig. 3B:** documenta la liberación de IFN- γ a partir de PBMC después de estimulación de anticuerpo en contacto con células tumorales EpCAM-positivas (HCT8). En caso de estimulación de las PBMC con el anticuerpo biespecífico en contacto con las células diana (HCT8) se produce una liberación significativa de IFN- γ que, cuando no se añade glucocorticoide, es superior a 6.000 pg IFN- γ /ml. En caso de una dosis simultánea de 0,01 μ g/ml de dexametasona, dicha liberación de IFN- γ es incluso un poco mayor (superior a 7.000 pg/ml). En caso de una concentración de dexametasona de 0,1 μ g/ml, la liberación de IFN- γ se reduce a cerca de 3.000 pg/ml, pero sigue siendo significativa.
- 15 **Fig. 3C:** representa, de modo similar a las Fig. 1C y 2C, una comparación porcentual de la liberación de citoquinas (en este caso IFN- γ) después de estimulación por anticuerpos sin o con contacto con células diana HCT8.
- 20 **Fig. 4:** representaciones gráficas de los resultados de experimentos para la activación de células T con los anticuerpos biespecíficos trifuncionales con especificidad anti-EpCAM x anti-CD3 (concentración de 10^6 células/ml) bajo la influencia de la dosis simultánea de dexametasona (concentraciones de 0,01, 0,1, 1 y 10 μ g/ml). En las Fig. 4A a 4E, el eje "Y" indica en cada caso la proporción porcentual de los linfocitos T CD3/CD4 (células T coadyuvantes)-positivos o CD3/CD8 (células T asesinas)-positivos con expresión de un marcador de activación (Fig. 4A y 4C: CD25; Fig. 4B y 4D: CD69; Figura 4E: HLADR). La medida se realizó con análisis FACS. Las barras de la izquierda representan en cada caso los resultados de la estimulación sin contacto con células diana HCT8 (concentración $5 \cdot 10^4$ células/ml), mientras que las barras de la derecha representan en cada caso los valores en caso de estimulación en contacto con células diana HCT8. La estimulación con el anticuerpo biespecífico trifuncional bajo contacto con las células diana HCT8, que corresponde a la estimulación específica con unión del antígeno diana, no influye en la activación de células T por dexametasona, tal como prueban los altos valores de medida inalterados en las Fig. 4A a 4E.
- 25 **Fig. 5:** presenta diagramas de los resultados de medir la citotoxicidad porcentual específica determinada en un ensayo de citotoxicidad de dos horas con células tumorales HCT8 marcadas con fluorescencia. Las Fig. 5A a 5D muestran la citotoxicidad porcentual específica contra HCT8 en función de la relación células efectoras-células dianas (R/T), habiéndose realizado el ensayo de citotoxicidad en cada caso con una relación células efectoras:células diana de 40:1, 20:1, 10:1, 5:1 y 2,5:1. En cada experimento se llevó a cabo una estimulación con 100 μ g/ml de anticuerpos biespecíficos trifuncionales con especificidad anti-Ep-CAM x anti-CD3 (E) sin células HCT8, en presencia de células HCT8 (E + HCT8) y también con dosis adicional de dexametasona en concentraciones de 0,01 μ g/ml, 1,0 μ g/ml o 10,0 μ g/ml, sin contacto (E + μ g/ml Dexa) o en contacto con células HCT8 (E + μ g/ml Dexa + HCT8).
- 30 **Fig. 5A:** documenta la influencia de la dexametasona a una concentración 0,01 mg/ml en la citotoxicidad porcentual específica. En comparación con las PBMC sin dexametasona, aquí no se produce inhibición de la citotoxicidad porcentual específica por parte del glucocorticoide.
- 35 **Fig. 5B:** presenta los resultados de las medidas correspondientes en cuanto a la influencia de 0,1 μ g/ml de dexametasona. Con esta concentración de dexametasona se produce una clara inhibición de la citotoxicidad porcentual específica en aproximadamente 50 puntos porcentuales. En este contexto no se produjo ninguna diferencia digna de mención cuando la estimulación se realizó en presencia de células HCT y cuando se realizó en ausencia de éstas.
- 40 **Fig. 5C:** muestra los resultados de mediciones comparativas con dexametasona a una concentración de 1 μ g/ml. También en este caso se produjo una clara inhibición de la citotoxicidad porcentual específica, que presentaba aproximadamente el mismo nivel que el comprobado para una concentración de glucocorticoide de 0,1 μ g/ml (véase la Fig. 5B), cuando la estimulación de las PBMC se llevó a cabo en presencia de células HCT8. En caso de una relación células efectoras:células diana de 20:1, en ausencia de HCT8 se produjo una inhibición claramente mayor de la citotoxicidad porcentual específica de las PBMC.
- 45 **Fig. 5D:** reproduce las medidas correspondientes para una concentración de dexametasona de 10 μ g/ml. En el caso de la estimulación de las PBMC en presencia de células HCT8, con esta concentración de dexametasona resultó una citotoxicidad porcentual específica que correspondía aproximadamente a la comprobada con concentraciones de dexametasona de 0,1 y 1 μ g/ml (véanse las Fig. 5B y 5C): con una relación células efectoras:células diana de 20:1 resultó en consecuencia una citotoxicidad porcentual de un 30%, mientras que, con una relación el doble de grande entre las células efectoras y las células diana, la citotoxicidad porcentual específica era de aproximadamente un 60%. En cambio, en caso de una estimulación de las PBMC en ausencia de células HCT8, los valores de citotoxicidad disminuyeron más con respecto a las menores concentraciones de dexametasona.
- 50
- 55
- 60

De acuerdo con los resultados representados en las Fig. 5A a 5D, la dexametasona a una concentración de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ no tiene ningún efecto en la citotoxicidad de PBMC estimuladas. A partir de una concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ se produce una clara disminución de la citotoxicidad independientemente de la ausencia o presencia de HCT8 durante la estimulación. En caso de una estimulación en presencia de HCT8, la citotoxicidad porcentual específica se mantuvo en un nivel entre el 40% y el 60% de la citotoxicidad medida sin dexametasona, cuando se administró dexametasona en un intervalo de concentración de 3 órdenes de magnitud (0,1 a 10 $\mu\text{g/ml}$) con una relación células efectoras:células diana de 40:1. Por ello, con una relación correspondiente entre las células efectoras (E) y las células diana (T), al añadir glucocorticoides en un amplio intervalo de concentraciones se mantiene constante una clara citotoxicidad porcentual de las PBMC estimuladas en presencia de células HCT8. En cambio, después de la estimulación de las PBMC sin HCT8, la citotoxicidad disminuye claramente en función de la concentración de dexametasona.

Fig. 6: documenta los valores de laboratorio de parámetros inmunológicos de un paciente con carcinoma de estómago resistente a la quimioterapia tratado según la invención con un anticuerpo biespecífico trifuncional (anti-EpCAM x anti-CD3) para la inmunoestimulación contra las células tumorales y con glucocorticoides (dexametasona) para la inhibición de los efectos secundarios relacionados con la inmunoterapia. El eje "Y" de las Fig. 6A a 6E muestra los valores de medición en la unidad indicada en cada caso. En el eje "X" se representa el desarrollo de la terapia en días. En este contexto, E significa una dosis del anticuerpo inmunoestimulador mencionado con dosificación intraperitoneal en μg , y Dex significa la dosis de dexametasona en mg, vía intravenosa.

Fig. 6A: muestra el desarrollo de la concentración de leucocitos (en g/l) (\blacklozenge) y las concentraciones de CRP en suero (en mg/dl) (\blacksquare). Las dos primeras administraciones de anticuerpo el día 0 y el día 4 se llevaron a cabo sin administración adicional del glucocorticoide. Con esta terapia aumenta en particular la concentración en suero de la "proteína de fase aguda" CRP hasta 40 mg/dl. En el posterior desarrollo de la terapia con administración adicional de dexametasona y al mismo tiempo un aumento claro de la dosificación de anticuerpo hasta 500 μg , el nivel de CRP en suero cae de nuevo a los valores normales. La concentración de leucocitos también permanece por debajo de 20 g/l con la terapia combinada según la invención. Los valores normales en adultos sanos oscilan entre 4 y 11 g/l. El aumento observado de la cantidad de leucocitos es también una expresión de la inmunoestimulación deseada.

Fig. 6B: presenta el desarrollo de la proporción porcentual de los linfocitos en la fórmula sanguínea. Las fluctuaciones observadas tanto con monoterapia con anticuerpos al comienzo del tratamiento como con la dosificación adicional de dexametasona con un fuerte aumento simultáneo de la dosis del anticuerpo inmunoterapéutico corresponden a lo esperado. En particular, al final de la administración de la combinación según la invención de anticuerpo y glucocorticoide, los valores medidos están aproximadamente en el intervalo normal de un adulto sano (entre un 20 y un 30% de linfocitos).

Fig. 6C: muestra el desarrollo de la concentración en suero del receptor de IL-2. Los valores aumentan de aprox. 1 a aprox. 2 ng/ml al comienzo del tratamiento primero al aumentar la dosis del anticuerpo inmunoestimulador a 100 μg vía intraperitoneal y administración adicional de dexametasona hasta aprox. 5,5 ng/ml, pero, a pesar de seguir aumentando claramente la dosis del anticuerpo biespecífico trifuncional y administrar simultáneamente el glucocorticoide con una dosis de 10 mg vía intravenosa, caen de nuevo por debajo de 1 ng de receptor de IL-2/ml hacia el final del tratamiento.

Fig. 6D: muestra el desarrollo de la concentración de TNF- α en suero (en pg/ml) medida en el paciente con carcinoma de estómago. La concentración de TNF- α aumenta con la terapia con un incremento de la dosis de 10 μg a 500 μg del anticuerpo inmunoterapéutico como expresión de una actividad inmunológica con un valor menor de 50 pg/ml con una monoterapia con anticuerpos de baja dosificación hasta aproximadamente 200 pg/ml con una dosis de 200 o 500 μg vía intraperitoneal del anticuerpo biespecífico más 10 mg vía intravenosa de dexametasona en cada caso. Por consiguiente, gracias a la administración del glucocorticoide, que inhibe los efectos secundarios y posibilita un aumento considerable de la dosis del anticuerpo inmunoestimulador, con la utilización del glucocorticoide o la terapia según la invención se observa una excelente actividad inmunológica específica celular.

Fig. 6E: muestra el desarrollo de la concentración de IL-6 en suero (en pg/ml) del paciente con carcinoma de estómago en terapia indicada en el eje "X". Después de la primera y la segunda administración del anticuerpo inmunoestimulador sin dosis simultánea de dexametasona (el día 0 y el día 4) se observan claros aumentos de la concentración de IL-6 a aproximadamente 300 o cerca de 1.000 pg/ml, respectivamente. Después de la primera administración combinada de anticuerpo y glucocorticoide (100 μg de anticuerpo vía intraperitoneal más 40 mg de dexametasona vía intravenosa el día 9) también se observa un breve aumento de la concentración de IL-6 con un valor máximo de aproximadamente 1.200 pg/ml. Sin embargo, la concentración de IL-6 vuelve muy rápidamente a los valores básicos y se mantiene constante en valores bajos a pesar del aumento de la dosis de anticuerpo hasta 500 μg vía intraperitoneal y la administración simultánea de 10 mg de dexametasona vía intravenosa.

Los valores de los parámetros inmunológicos determinados en un paciente con carcinoma de estómago muestran que, con la terapia combinada con anticuerpos biespecíficos trifuncionales con especificidad anti-EpCAM x anti-CD3 más dexametasona, se provoca una clara actividad inmunológica específica celular, como muestra el aumento de la concentración de TNF- α . Gracias a la administración del glucocorticoide, todos los demás parámetros se mantienen esencialmente constantes con el enorme aumento de la dosis del anticuerpo. En este contexto se ha de señalar que,

aparte del TNF- α , ninguno de los parámetros inmunológicos medidos refleja el efecto provocado por el anticuerpo en la célula tumoral, sino que éstos corresponden a los efectos secundarios inmunológicos. En particular, a pesar del fuerte incremento de la dosis del anticuerpo con la administración simultánea de dexametasona, no se observa ninguna señal de SIRS (inglés: "systemic inflammatory response syndrome" - síndrome de respuesta inflamatoria sistémica). El SIRS es un síndrome inflamatorio que aparece debido a una fuerte liberación sistémica de citoquinas en caso de terapias con anticuerpos a altas dosis, en particular terapias inmunoestimuladoras, y puede ir acompañado de fallo orgánico y provocar un desenlace letal. Sorprendentemente, los parámetros inmunológicos observados con la terapia combinada según la invención en un paciente con carcinoma de estómago resistente a la quimioterapia no muestran ninguna señal de un efecto secundario tan fuerte.

- 5
- 10 **Fig. 7:** diagramas que representan los efectos secundarios en los valores pancreáticos y hepáticos resultantes de la terapia arriba expuesta de un paciente con carcinoma de estómago resistente a la quimioterapia.
- Fig. 7A:** muestra el desarrollo de la concentración en suero de las enzimas específicas del páncreas α -amilasa (\blacklozenge) y lipasa (\blacksquare), en cada caso en U/l. En ninguno de los parámetros pancreáticos se produce un aumento anormal como señal de un efecto secundario no deseado a pesar del fuerte aumento de la dosis del anticuerpo estimulador en el tratamiento combinado según la invención (valores normales de un adulto sano: α -amilasa < 120 U/l; lipasa < 190 U/l).
- 15
- Fig. 7B:** muestra el desarrollo correspondiente de las concentraciones en suero de las enzimas específicas hepáticas fosfatasa alcalina (AP; \blacklozenge), γ -glutamilttransferasa (γ -GT; \blacksquare), glutamato-oxalacetato-transaminasa (GOT; \blacktriangle) y glutamato-piruvato-transaminasa (GPT; x) (en cada caso en u/l) bajo la terapia arriba descrita de un paciente con carcinoma de estómago. Los intervalos de referencia de las concentraciones en suero de las enzimas medidas son: AP: de 40 a 190 U/l; γ -GT: de 4 a 18 U/l; GOT: de 5 a 15 U/l; GPT: de 5 a 19 U/l. Únicamente al comienzo de la terapia combinada con anticuerpo-glucocorticoide (días de terapia 10 a 13) se produce un aumento de la concentración en suero de enzimas hepáticas, en particular de AP, pero éstas retornan en poco tiempo a los valores normales. Por consiguiente, en las concentraciones de las enzimas específicas del hígado tampoco se produce ningún aumento correspondiente al incremento de la dosis del anticuerpo inmunoestimulador como señal de un efecto secundario no deseado con la administración simultánea de dexametasona.
- 20
- Fig. 7C:** diagrama de la concentración total de bilirrubina (en mg/ml) como parámetro hepático adicional en función del desarrollo de la terapia del paciente con carcinoma de estómago. Aparte de un breve aumento de la bilirrubina (que desaparece rápidamente) después del incremento de la dosis del anticuerpo inmunoestimulador de 30 a 100 μ g, este parámetro hepático se mantiene dentro del intervalo de referencia, por debajo de 1 mg/dl, cuando se continúa aumentando la dosis. Por ello, a pesar de una dosificación muy alta del anticuerpo biespecífico, en caso de administración de dexametasona no se detecta ningún aumento de la bilirrubina, que indicaría un efecto secundario no deseado. En este contexto se comprobó significativamente que el paciente sometido a la terapia con administración simultánea de dexametasona y anticuerpos inmunoestimuladores no mostró ningún tipo de efecto secundario clínico importante (véase más abajo el Ejemplo de realización 4).
- 25
- 30
- 35

Otro paciente fue sometido a terapia inmunológica según la invención con un anticuerpo (anticuerpo biespecífico trifuncional con la especificidad anti-EpCAM x anti-CD3) y dexametasona. Se trataba de una paciente con adenocarcinoma y metástasis hepática difusa. La administración del anticuerpo se llevó a cabo a través de un catéter selectivo en la arteria hepática derecha. La Fig. 8 muestra diagramas que documentan el desarrollo de parámetros inmunológicos en función de la terapia. La representación gráfica de los parámetros se llevó a cabo tal como se ha descrito más arriba en relación con la Fig. 6.

- 40
- Fig. 8A:** desarrollo de la cantidad de leucocitos y de la concentración de CRP en suero; la Fig. 8B representa la proporción porcentual de los linfocitos en la fórmula sanguínea en función del desarrollo de la terapia; la Fig. 8C reproduce el desarrollo de la concentración del receptor de IL-2; la Fig. 8D muestra un diagrama correspondiente para el receptor de TNF p75 y el receptor de TNF p55; y, por último, la Fig. 8E muestra el desarrollo de la concentración de IL-6 bajo la terapia combinada según la invención. Bajo la terapia, a pesar de la administración de dexametasona, se produjo un aumento sistémico del receptor de IL-2 soluble (Fig. 8C) y de los receptores de TNF p55 y p75 (Fig. 8D), lo que refleja la activación inmunológica deseada contra células tumorales. Al mismo tiempo, con un aumento de la dosis de 1 μ g de anticuerpo a 40 μ g de anticuerpo, es decir, con un aumento en un factor 40, no se produjo ningún incremento esencial de los leucocitos, el CRP en suero y la proporción porcentual de linfocitos, ni ningún aumento significativo de la liberación sistémica de IL-6 (véanse las Fig. 8A, 8B y 8E).
- 45
- 50

- 55 En el caso de la paciente de adenocarcinoma con metástasis hepática difusa también se determinaron valores de laboratorio específicos del páncreas y el hígado durante la terapia con la utilización según la invención del glucocorticoide junto con el anticuerpo inmunoestimulador arriba indicado. La Fig. 9 muestra los resultados de estos análisis. El diagrama se realizó tal como se indica más arriba en la Fig. 7 en relación con el paciente con cáncer de estómago.

- Fig. 9A:** muestra de nuevo las concentraciones en suero de las enzimas específicas del páncreas α -amilasa y lipasa (en cada caso en U/l) en función de la terapia representada en el eje "X". Los valores pancreáticos se mantuvieron dentro del intervalo de referencia durante toda la terapia.
- Fig. 9B:** muestra un diagrama correspondiente de las enzimas específicas del hígado AP, γ -GT, GOT y GPT (también en U/l). Es cierto que, en caso de un aumento de la dosis de anticuerpo de 5 μ g a 40 μ g, se observa un aumento de la AP de 200 U/l a aprox. 700 U/l. Las concentraciones de γ -GT y GPT también aumentaron con este incremento de la dosis de un valor claramente inferior a 100 a cerca de 400 U/l y 150 U/l, respectivamente. Sin embargo, este aumento de las concentraciones de las enzimas específicas del hígado no es indicativo de efectos secundarios preocupantes, ya que dicho aumento era totalmente reversible una vez concluida la terapia y la paciente no presentó en ningún momento problemas clínicos. Por lo demás, esto también es aplicable al desarrollo de la concentración total de bilirrubina, que se representa en la Fig. 9C en función del desarrollo de la terapia y constituye otro parámetro de laboratorio específico hepático. El aumento de la concentración total de bilirrubina de 0,5 mg/dl con una dosis de anticuerpo de 5 μ g hasta 3 a 3,5 mg/dl con una dosis de anticuerpo de 40 μ g no indica ningún efecto secundario significativo de la terapia en el hígado de la paciente. En este contexto se ha de señalar también que los valores hepáticos de la paciente, en particular las enzimas específicas del hígado, eran elevados por las metástasis hepáticas existentes.
- Fig. 10:** representaciones gráficas de ensayos de citotoxicidad, donde los resultados de las medidas de citotoxicidad porcentual específica se determinaron utilizando las células tumorales HCT8 marcadas con fluorescencia. Las Fig. 10A a 10C representan los valores medios de las mediciones realizadas en tres voluntarios sanos, mientras que la Fig. 10D representa los valores medios de las mediciones realizadas en seis pacientes con carcinoma gastrointestinal. En los experimentos se llevó a cabo una estimulación con anticuerpos biespecíficos trifuncionales con especificidad anti-EpCAM x anti-CD3 a diferentes concentraciones de 10 ng/ml, 100 ng/ml y 1.000 ng/ml. En las Fig. 10A a 10D se indica la concentración correspondiente del anticuerpo utilizado. La concentración de PBMC era de 10^6 células/ml y la de las células HCT8 era de $5 \cdot 10^4$ células/ml. En cada uno de los experimentos, la estimulación se llevó a cabo con el anticuerpo sin células HCT8 (PBMC + AK), en presencia de células HCT8 (PBMC + AK + HCT8) y bajo administración adicional de dexametasona a concentraciones de 0,01 μ g/ml, 0,1 μ g/ml, 1,0 μ g/ml (PBMC + AK + 0,01 o 0,1 o 1). El eje "Y" indica la citotoxicidad porcentual y el eje "X" indica la carga de ensayo correspondiente de las PBMC, utilizándose como control PBMC no estimuladas (PBMC).
- Fig. 10A:** muestra los resultados de las mediciones correspondientes con una concentración de anticuerpo de 10 ng/ml. En caso de PBMC estimuladas en contacto con células diana HCT8 y administración de dexametasona resulta una inhibición de la citotoxicidad porcentual específica de aproximadamente 15 puntos porcentuales (aproximadamente del 55 al 41%), aumentando la inhibición cuanto mayor es la concentración de dexametasona. En el caso del contacto con HCT8, la inhibición porcentual es más clara que en las cargas de ensayo que no tienen ningún contacto con células HCT8. En este caso solo se produce una inhibición de aproximadamente 5 puntos porcentuales.
- Figura 10B:** muestra los resultados de las mediciones con una concentración de anticuerpos de 100 ng/ml. En el caso de las PBMC estimuladas en contacto con células diana HCT8 se produce una inhibición clara de la citotoxicidad porcentual específica de hasta aprox. 30 puntos porcentuales (aproximadamente del 78 al 50%) cuando se lleva a cabo la administración adicional de dexametasona, aumentando la inhibición cuanto mayor es la concentración de dexametasona. En cambio, en el caso de PBMC estimuladas sin contacto con HCT8 y con administración de dexametasona solo se produce una inhibición insignificante de la citotoxicidad de aproximadamente 10 puntos porcentuales, que también aumenta cuanto mayor es la concentración de dexametasona.
- Figura 10C:** muestra los resultados de las mediciones correspondientes con una concentración de anticuerpos de 1.000 ng/ml. La dexametasona produce una inhibición de la citotoxicidad, pero en conjunto ésta es menor que en caso de una estimulación con una concentración de anticuerpos de 100 ng/ml (Fig. 10B). En caso de PBMC estimuladas en contacto con células diana HCT8 se produce una inhibición de la citotoxicidad porcentual específica de hasta aproximadamente 20 puntos porcentuales (aproximadamente del 85 al 67%) cuando se lleva a cabo la administración adicional de dexametasona, aumentando la inhibición cuanto mayor es la concentración de dexametasona. En las cargas de ensayo de PBMC estimuladas sin contacto con HCT8 y con administración de dexametasona solo se produce una inhibición mínima de la citotoxicidad de aproximadamente 2 puntos porcentuales, que de nuevo aumenta cuanto mayor es la concentración de dexametasona.
- Figura 10D:** muestra las mediciones medias correspondientes en caso de pacientes con tumores gastrointestinales. Estas mediciones se llevaron a cabo con una concentración de anticuerpos de 100 ng/ml. Tal como se puede observar, se produce una inhibición clara de la citotoxicidad de aproximadamente 27 puntos porcentuales (aproximadamente del 78% al 51%) bajo administración de dexametasona. De nuevo, la inhibición es mayor cuando se lleva a cabo una estimulación en contacto con células diana HCT8. En lo

que respecta a la concentración de anticuerpos, los resultados son comparables a los de la Fig. 10B (voluntarios sanos). Esta comparación permite constatar que la administración del glucocorticoide dexametasona provoca una clara inhibición de la citotoxicidad porcentual específica tanto en voluntarios sanos como en pacientes con tumores.

5 **Fig. 11-13:** representaciones gráficas de los resultados de la liberación de diferentes citoquinas por PBMC en voluntarios sanos (a una concentración de 10^6 células/ml) después de estimulación con un anticuerpo biespecífico trifuncional con especificidad anti-EpCAM x anti-CD3 (AK) (en una concentración de 100 ng/ml) en ausencia o en presencia de células tumorales EpCAM-positivas (HCT8) (a una concentración de $5 \cdot 10^4$ células/ml). En los ejes "Y" se indica la concentración de la citoquina correspondiente en pg/ml.
10 En los ejes "X" se indican las cargas de estimulación correspondientes de las PBMC. Las indicaciones "0,01", "0,1" y "1" designan la concentración correspondiente de dexametasona añadida en $\mu\text{g/ml}$. También se indican los valores de PBMC no estimuladas como control ("PBMC").

15 La estimulación de las PBMC sin contacto con células tumorales EpCAM-positivas (células HCT8) corresponde (al igual que en las Fig. 1 a 3) a la liberación no específica de citoquinas, que es independiente de la unión de antígeno (interacción anticuerpo-antígeno). Por consiguiente, la liberación de las citoquinas tiene lugar de forma sistémica por la totalidad de las PBMC. En cambio, la estimulación de las PBMC en contacto con células tumorales EpCAM-positivas corresponde a la liberación de las respectivas citoquinas por las PBMC directamente en el lugar de la unión de antígeno. Por consiguiente, las respectivas liberaciones de citoquinas medidas en estas cargas de ensayo corresponden a la acción específica (dirigida a un objetivo) del anticuerpo utilizado y, por tanto, no representan ningún efecto secundario no deseado (liberación sistémica). Las citoquinas correspondientes sólo son liberadas por los inmunocitos que intervienen directamente en la respuesta inmunitaria.

20 **Fig. 11:** muestra los resultados de la liberación de interleuquina 10 (IL-10). La IL-10 es una citoquina inmunosupresora. Se puede observar que la liberación de IL-10 disminuye en caso de estimulación con el anticuerpo y administración de dexametasona. Esta disminución es más intensa cuanto mayor es la concentración de dexametasona.
25

Fig. 12: muestra los resultados de la liberación de interleuquina 6 (IL-6). La liberación de la citoquina proinflamatoria IL-6 disminuye en caso de estimulación con el anticuerpo y administración de dexametasona. Esta disminución es más intensa cuanto mayor es la concentración de dexametasona. Además, la liberación de IL-6 disminuye de forma claramente mayor cuando no hay contacto simultáneo con HCT8. La liberación absolutamente mayor de la citoquina en caso de contacto con células HCT8 no se debe valorar como una señal de un aumento de los efectos secundarios (liberación sistémica de citoquinas), sino que se explica por el efecto inmunológico específico en el lugar de unión del antígeno. Es decir, de acuerdo con la invención, la liberación de IL-6 disminuye más rápidamente sin contacto con las células HCT8 (efectos secundarios) que en contacto con células HCT8 (efecto específico). Dicho de otro modo, hay un mayor efecto específico (liberación de la citoquina en el lugar de la unión de antígeno).
30
35

Fig. 13: muestra los resultados de la liberación de $\text{TNF-}\alpha$. El $\text{TNF-}\alpha$, al igual que el $\text{IFN-}\gamma$, es una citoquina de la inmunidad celular. La liberación de $\text{TNF-}\alpha$ disminuye con la estimulación con el anticuerpo y administración de dexametasona. Esta disminución es más intensa cuanto mayor es la concentración de dexametasona. A partir de una concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de dexametasona, la liberación de $\text{TNF-}\alpha$ disminuye más sin contacto simultáneo con HCT8 (liberación sistémica; efectos secundarios) que en caso de contacto con HCT8 (efecto específico). La liberación absolutamente mayor del $\text{TNF-}\alpha$ en caso de contacto con células HCT8 tampoco se ha de valorar aquí como una señal de un aumento de los efectos secundarios (liberación sistémica de citoquinas), sino que se explica por el efecto inmunológico específico en el lugar de unión del antígeno, es decir, de acuerdo con la invención los efectos secundarios disminuyen más que el efecto específico.
40
45

Fig. 14-16: representaciones gráficas de los resultados de la liberación de diferentes citoquinas por PBMC en pacientes con tumores. Las cargas de ensayo (concentraciones, sustancias o células utilizadas) corresponden a las cargas representadas en las Fig. 11 a 13. También se mide la liberación de las mismas citoquinas. Esto permite comparar los resultados de los voluntarios sanos (Fig. 11 a 13) con los resultados de los pacientes tumorales (Fig. 14 a 16). Del mismo modo, los ejes "Y" y "X" de los gráficos indican lo mismo que los ejes correspondientes de las Fig. 11 a 13. También aquí, la estimulación de las PBMC sin contacto con HCT8 (según las Fig. 1 a 3; 11 a 13) corresponde a la liberación no específica de citoquinas, que es independiente de la unión de antígeno. En este caso, la liberación de las citoquinas tiene lugar de forma sistémica por la totalidad de las PBMC. La estimulación de las PBMC en contacto con HCT8 corresponde a la liberación de las respectivas citoquinas por las PBMC directamente en el lugar de la unión de antígeno. Por consiguiente, las liberaciones de citoquinas respectivas medidas en estas últimas cargas de ensayo corresponden a la acción específica (dirigida a un objetivo) del anticuerpo utilizado y no representan ningún efecto secundario no deseado (liberación sistémica). En este caso, las citoquinas
50
55

correspondientes sólo son liberadas por los inmunocitos que intervienen directamente en la respuesta inmunitaria.

- 5 **Fig. 14:** muestra los resultados de la liberación de interleuquina 10 (IL-10). La liberación de IL-10 disminuye en caso de estimulación con el anticuerpo y administración de dexametasona. Esta disminución es más intensa cuanto mayor es la concentración de dexametasona. La liberación de IL-10 disminuye menos cuando no hay ningún contacto simultáneo con HCT8. La liberación absolutamente mayor de la citoquina en caso de contacto con células HCT8 no se debe valorar como una señal de un aumento de los efectos secundarios (liberación sistémica de citoquinas), sino que se explica por el efecto inmunológico específico en el lugar de unión del antígeno. Es decir, de acuerdo con la invención, la liberación de IL-10 disminuye más rápidamente sin contacto con HCT8 (efectos secundarios) con una concentración creciente de dexametasona que en contacto con células HCT8 (efecto específico). Esto significa que, conforme a lo deseado, se produce un efecto específico muy intenso (liberación de la citoquina en el lugar de la unión de antígeno).
- 10
- 15 **Fig. 15:** muestra los resultados de la liberación de interleuquina 6 (IL-6). También aquí, como en la Fig. 14, la liberación de IL-6 disminuye en caso de estimulación con el anticuerpo y administración de dexametasona, intensificándose también esta disminución al aumentar la concentración de dexametasona. La disminución de la liberación de IL-6 se intensifica drásticamente cuando no hay contacto simultáneo con HCT8. La liberación absolutamente mayor de la citoquina en caso de contacto con células HCT8 tampoco se debe valorar aquí como una señal de un aumento de los efectos secundarios (liberación sistémica de citoquinas), sino que es el resultado del efecto inmunológico específico en el lugar de unión del antígeno. Es decir, de acuerdo con la invención, la liberación de IL-6 disminuye mucho más sin contacto con HCT8 (efectos secundarios) con una concentración creciente de dexametasona que en contacto con HCT8 (efecto específico). Esto permite constatar que se produce un efecto específico muy intenso (liberación de la citoquina en el lugar de la unión de antígeno).
- 20
- 25 **Fig. 16:** muestra los resultados de la liberación de TNF- α . En caso de estimulación con el anticuerpo y administración de dexametasona, la liberación de TNF- α disminuye, siendo esta disminución más intensa cuanto mayor es la concentración de dexametasona. Conforme a lo esperado, la liberación de TNF- α disminuye más cuando no hay contacto simultáneo con HCT8. La liberación absolutamente mayor de la citoquina en caso de contacto con células HCT8 tampoco se debe valorar aquí como una señal de un aumento de los efectos secundarios (liberación sistémica de citoquinas), sino que es el resultado del efecto inmunológico específico en el lugar de unión del antígeno. Por consiguiente, la liberación de TNF- α disminuye mucho más sin contacto con HCT8 (efectos secundarios) con una concentración creciente de dexametasona que en contacto con HCT8 (efecto específico). Es decir, se produce un efecto específico muy intenso (liberación de la citoquina en el lugar de la unión de antígeno).
- 30
- 35 Teniendo en cuenta los resultados de la liberación de citoquinas en caso de utilizar el anticuerpo biespecífico trifuncional anti-EpCAM x anti-CD3 por un lado en voluntarios sanos (Fig. 11 a 13) y por otro lado en pacientes tumorales (Fig. 14 a 16), de acuerdo con la invención se constata que los resultados obtenidos en los pacientes tumorales corresponden a los resultados de los voluntarios sanos. En los pacientes tumorales, de acuerdo con la invención los efectos del glucocorticoide dexametasona son más fuertes en la liberación sistémica no específica de citoquinas (efectos secundarios; sin contacto con HCT8) que en el efecto específico (contra EpCAM y CD-3), lo que implica una fuerte reducción de los efectos secundarios de acuerdo con la invención.
- 40
- 45 **Fig. 17-18:** muestran representaciones gráficas de los resultados de la liberación de diferentes citoquinas por PBMC en voluntarios sanos (en una concentración de 10^6 células/ml) después de estimulación con el anticuerpo monoclonal mono específico Herceptin (AK) (a una concentración de 1 mg/ml) en ausencia o en presencia de células tumorales HER2/neu-positivas (HCT8) (a una concentración de $5 \cdot 10^4$ células/ml). En los ejes "Y" se indica la concentración de la citoquina correspondiente en pg/ml. En los ejes "X" se indican las cargas de estimulación correspondientes de las PBMC. Las indicaciones "0,01", "0,1" y "1" designan la concentración correspondiente de la dexametasona añadida en $\mu\text{g/ml}$. También se indican los valores de PBMC no estimuladas como control ("PBMC").
- 50 **Fig. 17:** muestra los resultados de la liberación de interleuquina 6 (IL-6). La liberación de IL-6 disminuye en caso de estimulación de las PCMB con los anticuerpos y administración de dexametasona, siendo esta disminución más intensa cuanto mayor es la concentración de dexametasona. La liberación de IL-6 disminuye mucho más cuando no hay contacto simultáneo con células HCT8. La liberación absolutamente mayor de la citoquina en caso de contacto con células HCT8 no se debe valorar como una señal de un aumento de los efectos secundarios (liberación sistémica de citoquinas), sino que es el resultado del efecto inmunológico específico en el lugar de unión del antígeno. La liberación de IL-6 disminuye mucho más sin contacto con HCT8 (efectos secundarios) con una concentración creciente de dexametasona que en contacto con HCT8 (efecto específico). Se produce un efecto específico intenso (liberación de la citoquina en el lugar de la unión de antígeno).
- 55

Fig. 18: muestra los resultados de la liberación de TNF- α . La liberación de TNF- α disminuye con la estimulación con el anticuerpo y administración de dexametasona. Esta disminución es más intensa cuanto mayor es la concentración de dexametasona. La disminución de la liberación de TNF- α se intensifica drásticamente cuando no hay contacto simultáneo con HCT8. La liberación absolutamente mayor de la citoquina en caso de contacto con células HCT8 tampoco se debe valorar aquí como una señal de un aumento de los efectos secundarios (liberación sistémica de citoquinas), sino que es el resultado del efecto inmunológico específico en el lugar de unión del antígeno. Por consiguiente, la liberación de TNF- α disminuye mucho más sin contacto con HCT8 (efectos secundarios) con una concentración creciente de dexametasona que en contacto con HCT8 (efecto específico). Es decir, se produce un efecto específico muy intenso (liberación de la citoquina en el lugar de la unión de antígeno).

Teniendo en cuenta los resultados de la liberación de diversas citoquinas en caso de estimulación de PBMC con diferentes anticuerpos:

- i. cargas de ensayo de las Fig. 11 a 16: estimulación con el anticuerpo biespecífico trifuncional anti-EpCAM x anti-CD3,
- ii. cargas de ensayo de las Fig. 17 a 18: estimulación con el anticuerpo monoclonal mono específico Herceptin,

se puede constatar que los dos anticuerpos, a pesar de sus diferentes mecanismos de acción, mostraron esencialmente los mismos efectos en la liberación de diversas citoquinas, tanto en voluntarios sanos como en pacientes con tumores.

Fig. 19: representaciones gráficas de los resultados medidos para la activación de células T con el anticuerpo biespecífico trifuncional con especificidad anti-EpCAM x anti-CD3 a una concentración de 10^6 células/ml bajo la influencia de la administración simultánea de dexametasona (concentraciones de 0,01, 0,1 y 1 $\mu\text{g/ml}$). Se representa la medición de los marcadores superficiales CD3/CD4/CD25 o CD3/CD8/HLADR en células T coadyuvantes. En este contexto, CD3/CD4 representan linfocitos T coadyuvantes, siendo CD25 un marcador de activación de estas células. CD3/CD8 representan linfocitos T citotóxicos, siendo HLADR un marcador de activación de estas células. El eje "Y" indica la proporción porcentual de linfocitos T CD3/CD4 (células T coadyuvantes)-positivos o CD3/CD8 (células T asesinas)-positivos con expresión del marcador de activación (CD25 o HLADR, respectivamente). El eje "X" indica las cargas de estimulación de PBMC correspondientes con y sin contacto con células diana HCT8 (concentración $5 \cdot 10^4$ células/ml), y con y sin administración de dexametasona a diferentes concentraciones. La columna izquierda se refiere en cada caso a la medida CD3/CD4/CD25 y la columna derecha se refiere en cada caso a la de CD3/CD8/HLADR. Las medidas se realizan por análisis FACS. En la tabla mostrada en la parte inferior de la Fig. 19 se indican los valores de medida (en porcentaje) de cada carga de estimulación. Se puede observar que la dexametasona no influye en la activación de células T en caso de estimulación con el anticuerpo biespecífico trifuncional en contacto con las células diana HCT8 (esta estimulación corresponde a la estimulación específica con unión del antígeno diana), lo que se demuestra mediante los elevados valores de medición inalterados en la tabla de la parte inferior de la Fig. 19.

Los siguientes ejemplos de realización explican la invención más detalladamente, sin limitarla.

Ejemplo de realización 1:

Obtención de PBMC

A partir de sangre periférica de un voluntario sano se obtuvieron células mononucleares por centrifugación con Ficoll (densidad $1,068 \text{ g/cm}^3$). Para ello, la sangre venosa heparinizada se separó en capas con Ficoll y se centrifugó durante 20 minutos a 2.000 rpm. La capa celular que se encontraba sobre el Ficoll se retiró con pipeta después de la centrifugación y se lavó con PBS.

Estimulación de PBMC

Para la estimulación se utilizaron las PBMC en una concentración de $1 \cdot 10^6$ /ml. La estimulación de las PBMC se realizó con un anticuerpo biespecífico trifuncional intacto con especificidad anti-EpCAM x anti-CD3 a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ o con especificidad anti-HER2/neu x anti-CD3 a una concentración de 1 mg/ml. La estimulación se llevó a cabo durante 24 horas por incubación a 37°C . La estimulación tuvo lugar en cada caso sin células tumorales o en presencia de $5 \cdot 10^4$ células tumorales HCT-8 (con respecto a ATCC; EpCAM-positivas) por ml. Para el efecto del glucocorticoide sintético dexametasona (de Jenapharm®) se llevaron a cabo cargas de estimulación sin glucocorticoide y cargas con 0,01, 0,1, 1 o 10 $\mu\text{g/ml}$.

Determinación de citoquinas

Después de la estimulación, se llevó a cabo la determinación de las concentraciones de las citoquinas IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ en el sobrenadante de placas de 24 pocillos, en cada caso por ELISA. Se realizaron en cada caso medidas por duplicado. Los ELISA se realizaron con los kits normalizados de la firma R&D Systems conforme a las instrucciones del fabricante.

*Resultados**Liberación de IL-6*

La IL-6 es una citoquina que es descargada por células efectoras inmunológicas y células presentadoras de antígenos directamente al producirse una respuesta inmunitaria. La importancia clínica de la IL-6 como citoquina en suero estriba en que, pocas horas después de producirse una inflamación o una respuesta inmunitaria, se descarga IL-6 y su cantidad se relaciona con la magnitud de la respuesta inmunitaria. En el presente ejemplo de realización, en caso de contacto con células tumorales EpCAM-positivas (HCT8) y administración simultánea de 0,01 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de dexametasona, se observa una liberación de IL-6 de valores superiores a 5.000 pg/ml en el sobrenadante (Fig. 1B). Esta liberación corresponde al efecto inmunológico del anticuerpo específico de EpCAM y, en consecuencia, representa el efecto inmunológico deseado. Esta intensa liberación de IL-6 es realizada sólo por unos pocos inmunocitos que intervienen directamente en la reacción dependiente de la interacción específica antígeno-anticuerpo.

En cambio, en caso de una estimulación de las PBMC con anticuerpos sin contacto con células tumorales HCT8, se observa una liberación de IL-6 superior a 9.000 pg/ml (Fig. 1A). En caso de administración clínica del anticuerpo inmuoestimulador, esta liberación se produce de forma sistémica a través de muchas PBMC independientemente del efecto específico deseado. Así, mediante la liberación sistémica de IL-6 se produce en el cuerpo una cantidad muy grande de IL-6, que finalmente es responsable de los fuertes efectos secundarios que pueden llegar a un SIRS.

Con la combinación del anticuerpo con un glucocorticoide (en este caso dexametasona) se ha comprobado de acuerdo con la invención que la liberación no específica de IL-6, que es esencialmente responsable de los efectos secundarios clínicos de anticuerpos inmuoestimuladores, se reduce por completo con la dexametasona. Sin embargo, al mismo tiempo se mantiene la liberación de IL-6 que se induce después de la estimulación con células tumorales EpCAM-positivas y que, en consecuencia, corresponde al efecto específico deseado del anticuerpo inmuoestimulador.

Liberación de TNF- α

El TNF- α es una TH1-citoquina descargada por células efectoras inmunológicas (en este caso: PBMC) durante la eliminación inmunológica de células diana (en este caso: células tumorales HCT8). En comparación con una estimulación no específica sin células tumorales, en el presente ejemplo se midieron los valores de TNF- α aumentados aproximadamente al triple después de la estimulación con el anticuerpo biespecífico trifuncional en presencia de células diana con antígeno definido (EpCAM) (Fig. 2A y 2B). Este claro aumento de la concentración de TNF- α es el resultado de la liberación dependiente de la célula diana por las PBMC durante la eliminación de células tumorales. Si el anticuerpo biespecífico trifuncional se combina de acuerdo con la invención con un glucocorticoide, en este caso dexametasona, la liberación de TNF- α basada en efectos no específicos disminuye o, con una concentración correspondientemente alta de glucocorticoides, se reduce por completo. Por consiguiente, con la utilización según la invención de glucocorticoides se pueden reducir significativamente o eliminar los efectos secundarios clínicos preocupantes basados en una liberación no específica de TNF- α . A diferencia de la liberación no específica de citoquinas, en caso de adición de dexametasona se mantiene por completo la liberación de TNF- α dependiente del antígeno y en consecuencia específica de la célula diana.

Liberación de IFN- γ

El IFN- γ es también una TH1-citoquina. Además, el IFN- γ es descargado por linfocitos T específicos activados después de la estimulación contra un antígeno, por lo que el IFN- γ es un marcador para la eliminación de células diana específica de antígeno facilitada por células T. Por ello, el IFN- γ no es descargado después de una estimulación de las PBMC con el anticuerpo biespecífico trifuncional en ausencia de células diana HCT8, ya que en este caso sólo se produce una estimulación no específica, no dirigida contra un antígeno (Fig. 3A). En el caso de la estimulación en presencia de células HCT8, se midió una liberación significativa de IFN- γ provocada por la estimulación contra EpCAM mediante el anticuerpo (Fig. 3B). Esta liberación de IFN- γ específica de la célula diana se mantiene esencialmente con concentraciones de glucocorticoide inferiores a 1 $\mu\text{g/ml}$ en el presente ejemplo de realización.

Ejemplo de realización 2

5 Para determinar la influencia de la activación de los glucocorticoides en la activación de células T mediante estimulación con el anticuerpo biespecifico trifuncional anti-EpCAM x anti-CD3, se llevaron a cabo experimentos de estimulación tal como se indica en el anterior Ejemplo de realización 1, y después se midieron los marcadores de activación específicos de células T CD25, CD69 y HLA-DR con linfocitos T CD3⁺/CD4⁺ o CD3⁺/CD8⁺.

Análisis FACS

Los análisis FACS se realizaron utilizando un FACScalibur de la firma Becton Dickinson. Unas PBMC estimuladas correspondientemente se marcaron con anticuerpos de la especificidad necesaria marcados con FITC, PE y APC.

Resultados

10 Tal como se desprende de las Fig. 4A a 4E, en caso de una estimulación con el anticuerpo biespecifico trifuncional no se constató ninguna influencia de la activación de células T por el glucocorticoide dexametasona.

Ejemplo de realización 3

15 La influencia del glucocorticoide en la toxicidad de células T se analizó con ayuda de un ensayo de citotoxicidad. La obtención de las PBMC y su estimulación se llevaron a cabo de acuerdo con el Ejemplo de realización 1 arriba descrito.

Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad se midió con ayuda de un ensayo de fluorescencia utilizando el colorante BCECF-AM. La medición tuvo lugar mediante la técnica 2 h Release correspondientemente al método descrito en Kolben y col. (1988) J. Immunol. Meth. 108: 255-264.

Resultados

25 Tal como se desprende de las Fig. 5A a 5B, el efecto de la dexametasona en la citotoxicidad de PBMC estimuladas provocada por los anticuerpos biespecificos trifuncionales se puede resumir de la siguiente manera. En caso de una concentración de 0,01 mg/ml no se observó ningún efecto de la dexametasona en la citotoxicidad de las PBMC estimuladas. A partir de una concentración de 0,1 µg/ml se observó una reducción significativa de la citotoxicidad independientemente de la presencia o ausencia de células tumorales HCT8 durante la estimulación. En caso de una estimulación en presencia de HCT8, la citotoxicidad porcentual se mantuvo constante en un nivel alto al utilizar una relación células efectoras:células diana de 40:1 y concentraciones de 0,1 a 10 µg/ml de dexametasona. Cuando no había células diana durante la estimulación de las PBMC, la citotoxicidad porcentual disminuyó adicionalmente en función de la concentración de dexametasona.

30 Por consiguiente, los datos *in vitro* según los Ejemplos de realización 1 a 3 se pueden resumir de la siguiente manera: mediante la combinación de anticuerpos inmunoestimuladores con glucocorticoides se produce una disminución de la liberación no específica de citoquinas sin que se reduzca en la misma medida la respuesta inmunitaria específica de antígeno deseada (Ejemplo de realización 1), la activación de células T (Ejemplo de realización 2) o la citotoxicidad de las células estimuladas (Ejemplo de realización 3). Con una concentración de dexametasona entre 0,1 y 1 µg/ml, la reacción no específica se reduce en gran medida o se elimina por completo. 35 En cambio, con este intervalo de concentraciones de glucocorticoides, la actividad inmunológica específica dirigida contra el antígeno de células tumorales EpCAM no resultó esencialmente afectada *in vitro*.

Ejemplo de realización 4

40 Un paciente (46 años, varón) con carcinoma de estómago (carcinosis peritoneal; pT3 pN2 M1) fue sometido a inmunoterapia utilizando un glucocorticoide con el anticuerpo biespecifico trifuncional con especificidad anti-EpCAM x anti-CD3 según la invención. La terapia se llevó a cabo después de una gastrectomía en el año 2000 y una quimioterapia múltiple ineficaz del tumor. El paciente presentaba una formación de ascitis sintomática. El examen de las células tumorales de la ascitis mostró una fuerte expresión de EpCAM (EpCAM+++). El anticuerpo se administró vía intraperitoneal (i.p.), en cada caso mediante infusión durante 6 a 10 horas.

45 Al comienzo de la terapia se administraron los anticuerpos al paciente en dosis relativamente pequeñas sin combinación con glucocorticoides. Después de estos 2 intentos de monoterapia, se aumentó claramente la dosis de anticuerpos y al mismo tiempo se añadió dexametasona. La siguiente Tabla 1 resume el desarrollo de la terapia indicando los efectos secundarios observados.

Tabla 1 Desarrollo de la terapia en un paciente con carcinoma de estómago

Día	Terapia	Desarrollo Clínico
0	10 E	Infusión durante 6 h, 1.000 ml Tuto ip Medicación previa 2A Fenistil + 1000 mg Benuron Fiebre hasta 39,3 Vómitos Dolor de estómago, administración de Tramal Decaimiento
1		Persistencia de la fiebre hasta 39,0
2		
3		Fiebre 39,0 → Novalgina 1A 19.15
4	30 E	Infusión durante 8 h, 1000 ml Tuto ip Medicación previa 2A Fenistil + 1000 mg Benuron Interrupción de la terapia con fiebre > 39,6 tras 6 h Novalgina 1A Escalofríos Náuseas
5		Persistencia de la fiebre: Novalgina 1A Novalgina 30 ggt Decaimiento
6		
7		
8		Cambio de catéter Nueva cantidad de ascitis: 500 ml
9	100 E	Cambio de medicación previa 2A Fenistil 2A Tagamet 40 mg dexametasona 1000 ml Tuto ip Infusión durante 8 h Fiebre hasta un máximo de 39,0
10		
11		
12		Fuerte reacción alérgica con enrojecimiento completo de la piel en el tronco
13		
14		
15	100 E	2A Fenistil 2A Tagamet 10 mg dexametasona 1000 ml Tuto ip Infusión durante 8 h Sin fiebre Sin ES
16		
17		
18		
19	200 E	2A Fenistil 2A Tagamet 10 mg dexametasona 1000 ml Tuto ip Infusión durante 10 h Sin fiebre Sin ES
20		
21		
22		

Día	Terapia	Desarrollo Clínico
23	500 E	2A Fenistil 2A Tagamet 10 mg dexametasona 1000 ml Tuto ip Infusión durante 8 h Sin fiebre Sin ES
E: µg anticuerpo biespecífico trifuncional anti-EpCAM x anti-CD3 i.p. ES: Efectos secundarios		

Tal como se desprende de la Tabla 1, en la monoterapia con el anticuerpo inmunoestimulador a una dosis de 10 mg a 30 mg el paciente sufrió fuertes efectos secundarios, en particular vómitos, dolor de estómago, indisposición y fiebre alta. En cambio, cuando el anticuerpo se combinó con dexametasona, la dosis de anticuerpo se pudo aumentar a 500 mg i.p. sin la aparición de fiebre u otros efectos secundarios. Los parámetros inmunológicos de laboratorio confirman el fuerte efecto inmunomodulador del anticuerpo dirigido contra las células tumorales (Fig. 6). Los valores hepáticos y pancreáticos eran muy poco llamativos con la terapia combinada según la invención (Fig. 7). Una vez finalizada la terapia según la invención, se constató una desaparición completa de ascitis malignas y en el desarrollo de la terapia una eliminación total de las células tumorales malignas en la ascitis.

10 Ejemplo de realización 5

En otro ejemplo de realización según la invención, una paciente (68 años) con adenocarcinoma (Sigma pT3 pN2 M1) y metástasis hepática difusa fue sometida a inmunoterapia con el anticuerpo biespecífico trifuncional anti-EpCAM x anti-CD3 en combinación con el glucocorticoide dexametasona. Previamente se comprobó que un 80% de las células de las metástasis hepáticas eran EpCAM -positivas. En esta terapia, la administración del anticuerpo se llevó a cabo con un catéter selectivo a través de la arteria hepática derecha como ejemplo de administración selectiva en órgano (en este caso intrahepática) o sistémica (después de pasar por el hígado). La dexametasona se administró en cada caso como una medicación previa antes de la administración del anticuerpo inmunoestimulador.

La siguiente Tabla 2 muestra la terapia y su desarrollo.

Tabla 2 Desarrollo de la terapia en una paciente con adenocarcinoma y metástasis hepática difusa

Día	Terapia	Observaciones
0	1 µg	Administración por acceso arterial selectivo en la arteria hepática derecha a lo largo de 8 horas Medicación previa: Dexa 40 mg, 2A Fenistil, 2A Ranitidina Sin fiebre, sin efectos secundarios
1		
2		
3	5 µg	Administración por acceso arterial selectivo en la arteria hepática derecha a lo largo de 8 horas Medicación previa: Dexa 20 mg, 2A Fenistil, 2A Ranitidina Fiebre hasta 39,8°C, 9 h después del inicio de la terapia Medicación con metamizol 1A i.v. Normalización de la temperatura en un plazo de 4 h
4		
5		
6	20 µg	Administración por acceso arterial selectivo en la arteria hepática derecha a lo largo de 8 horas Medicación previa: Dexa 20 mg, 2A Fenistil, 2A Ranitidina Fiebre hasta 39,6°C, 10 h después del inicio de la terapia Medicación con metamizol 1A i.v. Normalización de la temperatura en un plazo de 4 h
7		
8		
9		
10	4 µg	Administración por acceso arterial selectivo en la arteria hepática derecha a lo largo de 10 horas Medicación previa: Dexa 20 mg, 2A Fenistil, 2A Ranitidina Fiebre hasta 40,1°C, 6 h después del inicio de la terapia Medicación con metamizol 2A i.v. Normalización de la temperatura en un plazo de 10 h Escalofríos / dolores en las extremidades

5 Con la combinación según la invención del glucocorticoide con el anticuerpo inmunoterapéutico sólo se produjo una fiebre pasajera, normalizándose la temperatura en un plazo máximo de 10 horas después de alcanzar la temperatura máxima. Por consiguiente, a pesar del enorme aumento de la dosis del anticuerpo en un factor 40 (de 1 µg a 40 µg), durante la terapia no se constató ninguna intensificación de los efectos secundarios del anticuerpo in-
10 munoestimulador correspondiente a dicho enorme aumento, lo que ha de atribuirse a la administración según la invención del glucocorticoide. La administración de dexametasona no tuvo ninguna influencia negativa significativa en el efecto in-
munoestimulador del anticuerpo. Esto se documenta mediante un aumento sistémico del receptor de IL-2 soluble y de los receptores TNF p55 y p75 (Fig. 8). En cambio, a pesar del aumento de la dosis con respecto al anticuerpo en un factor 40, no se constató ningún efecto secundario significativo. Esto también se confirma en particular con los parámetros de laboratorio específicos del páncreas e hígado (Fig. 9).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uno o más glucocorticoides para reducir la liberación no específica de citoquinas en el tratamiento de cánceres y de enfermedades tumorales con uno o más anticuerpos biespecíficos trifuncionales inmunoestimuladores (ACtr).
2. Glucocorticoide o glucocorticoides a utilizar según la reivindicación 1, caracterizados porque son sintéticos.
3. Glucocorticoide o glucocorticoides a utilizar según la reivindicación 2, caracterizados porque el glucocorticoide sintético se selecciona de entre el grupo consistente en prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, betametasona, dexametasona, acetato de cortisona, prednilideno, deflazacort, cloprednol, flucortolona y budenósido.
- 10 4. Glucocorticoide o glucocorticoides a utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizados porque el cáncer se selecciona de entre el grupo consistente en carcinoma de estómago, adenocarcinoma, melanoma maligno, carcinoma de colon, carcinoma de páncreas, carcinoma ovárico, carcinoma de útero, carcinoma hepatocelular, todos los tipos histológicos del carcinoma bronquial, linfomas, sarcomas, blastomas, tumor estromal gastrointestinal (GIST).
- 15 5. Glucocorticoide o glucocorticoides a utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizados porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado.
6. Glucocorticoide o glucocorticoides a utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizados porque el anticuerpo presenta en cada caso al menos una especificidad contra un antígeno tumoral y contra un marcador CD.
- 20 7. Glucocorticoide o glucocorticoides a utilizar según la reivindicación 6, caracterizados porque el marcador CD se selecciona de entre el grupo consistente en CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28 y CD44.
8. Glucocorticoide o glucocorticoides a utilizar según la reivindicación 6 o 7, caracterizados porque el antígeno tumoral se selecciona de entre el grupo consistente en EpCAM, HER2/neu, HER3/neu, G250, CEA, MAGE, VEGF, GD3, EGFR, $\alpha V\beta 3$ -integrina, HLA, HLA-DR, ASC, CD1, CD2, CD4, CD6, CD7, CD8, CD11, CD13, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD33, CD40, CD41, CD52, c-erb-2, CALLA, MHCII, CD44v3, CD44v6, CD117, p97, gangliósido GD2, GD3, C215, antígeno del anticuerpo 9.2.27, antígeno del anticuerpo NE150 y antígeno del anticuerpo CA125.
- 25 9. Glucocorticoide o glucocorticoides a utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizados porque el anticuerpo tiene una especificidad EpCAM x anti-CD3 o anti-HER2/neu x anti-CD3.
- 30 10. Glucocorticoide o glucocorticoides a utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizados porque el anticuerpo y/o el glucocorticoide se administra vía intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intratumoral o selectivamente en un órgano definido.
- 35 11. Glucocorticoide o glucocorticoides a utilizar según la reivindicación 10, caracterizados porque la administración selectiva en un órgano definido se lleva a cabo a través de un catéter en el vaso que abastece dicho órgano.
12. Glucocorticoide o glucocorticoides a utilizar según la reivindicación 11, caracterizados porque la administración en el hígado se lleva a cabo a través de un catéter en la arteria hepática.
13. Glucocorticoide o glucocorticoides a utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizados porque el glucocorticoide y el anticuerpo se administran de forma simultánea.
- 40 14. Composición farmacéutica que incluye al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional inmunoestimulador y al menos un glucocorticoide, presentando el anticuerpo una especificidad EpCAM x anti-CD3 o anti-HER2/neu x anti-CD3.
- 45 15. Composición farmacéutica para reducir la liberación no específica de citoquinas en el tratamiento de cánceres y enfermedades tumorales con uno o más anticuerpos biespecíficos trifuncionales inmunoestimuladores (ACtr), que contiene al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional inmunoestimulador y al menos un glucocorticoide, en caso dado junto con uno o más vehículos y/o coadyuvantes farmacéuticamente compatibles.
16. Composición farmacéutica según la reivindicación 14 o a utilizar según la reivindicación 15, caracterizada porque el glucocorticoide es un glucocorticoide sintético.

17. Composición farmacéutica o composición farmacéutica a utilizar según la reivindicación 16, caracterizada porque el glucocorticoide sintético se selecciona de entre el grupo consistente en prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, betametasona, dexametasona, acetato de cortisona, prednilideno, deflazacort, cloprednol, fluocortolona y budesónido.
- 5 18. Composición farmacéutica o composición farmacéutica a utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, caracterizada porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado.
19. Composición farmacéutica o composición farmacéutica a utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizada porque el anticuerpo presenta en cada caso al menos una especificidad contra un antígeno tumoral y contra un marcador CD.
- 10 20. Composición farmacéutica o composición farmacéutica a utilizar según la reivindicación 19, caracterizada porque el marcador CD se selecciona de entre el grupo consistente en CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28 y CD44.
- 15 21. Composición farmacéutica o composición farmacéutica a utilizar según la reivindicación 19 o 20, caracterizada porque el antígeno tumoral se selecciona de entre el grupo consistente en EpCAM, HER2/neu, HER3/neu, G250, CEA, MAGE, VEGF, GD3, EGFR, α V β 3-integrina, HLA, HLA-DR, ASC, CD1, CD2, CD4, CD6, CD7, CD8, CD11, CD13, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD33, CD40, CD41, CD52, c-erb-2, CALLA, MHCII, CD44v3, CD44v6, CD117, p97, gangliósido GD2, GD3, C215, antígeno del anticuerpo 9.2.27, antígeno del anticuerpo NE150 y antígeno del anticuerpo CA125.
- 20 22. Composición farmacéutica o composición farmacéutica a utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, caracterizada porque el anticuerpo tiene una especificidad EpCAM x anti-CD3 o anti-HER2/neu x anti-CD3.
23. Composición farmacéutica según la reivindicación 14 para el tratamiento de enfermedades seleccionadas de entre el grupo consistente en cánceres y enfermedades tumorales.
- 25 24. Composición farmacéutica a utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23, seleccionándose el cáncer entre el grupo consistente en carcinoma de estómago, adenocarcinoma, melanoma maligno, carcinoma de colon, carcinoma de páncreas, carcinoma ovárico, carcinoma de útero, carcinoma hepatocelular, todos los tipos histológicos del carcinoma bronquial, linfomas, sarcomas y blastomas.
- 30 25. *Kit* que contiene al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional (ACtr) inmunoestimulador y al menos un glucocorticoide, teniendo el anticuerpo una especificidad EpCAM x anti-CD3 o anti-HER2/neu x anti-CD3, estando separados entre sí el o los anticuerpos biespecíficos trifuncionales inmunoestimuladores y el o los glucocorticoides.
26. *Kit* según la reivindicación 25, caracterizado porque el glucocorticoide se selecciona de entre el grupo consistente en prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, betametasona, dexametasona, acetato de cortisona, prednilideno, deflazacort, cloprednol, fluocortolona y budesónido.

35

Fig. 1A

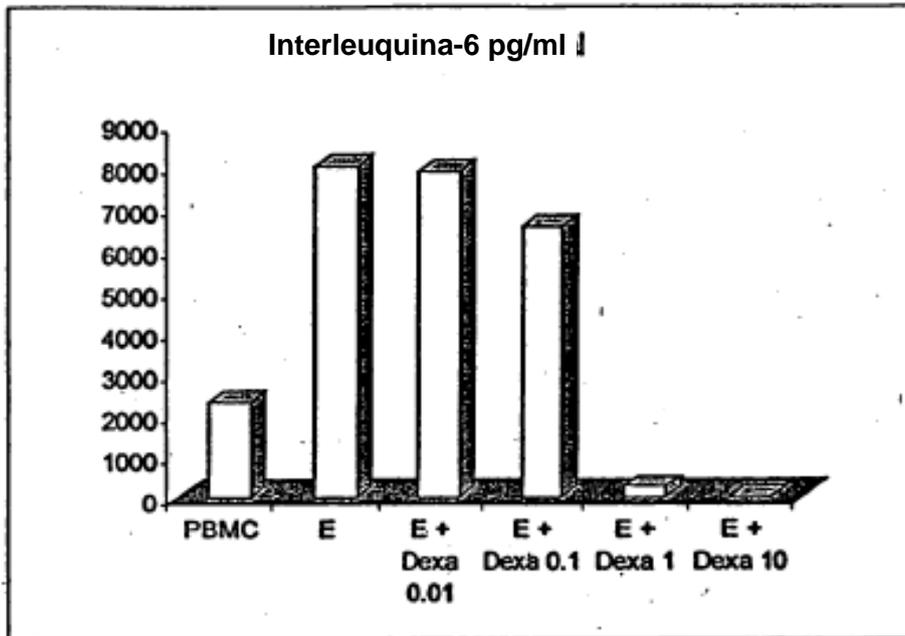


Fig. 1B

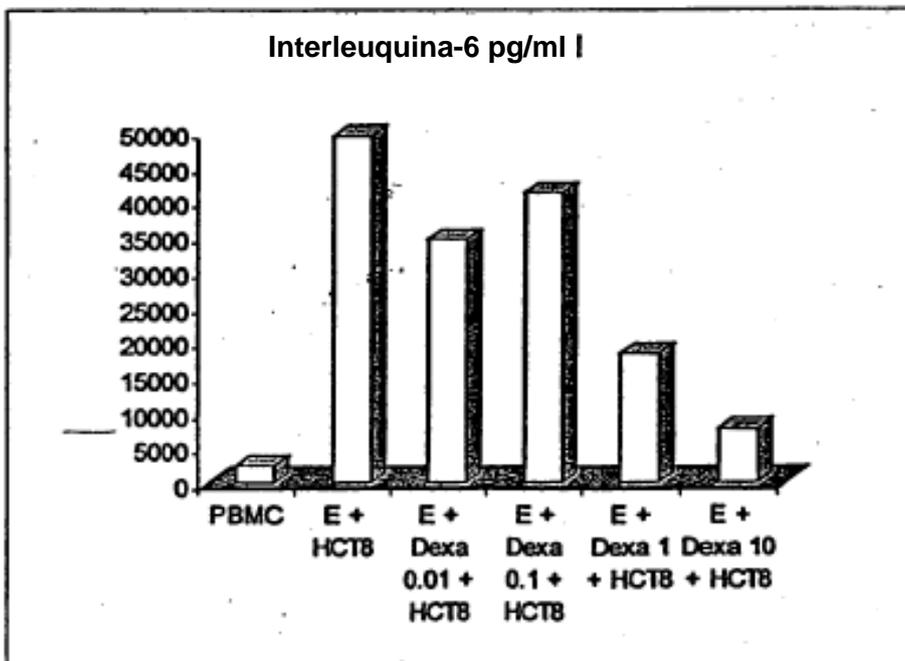


Fig. 1C

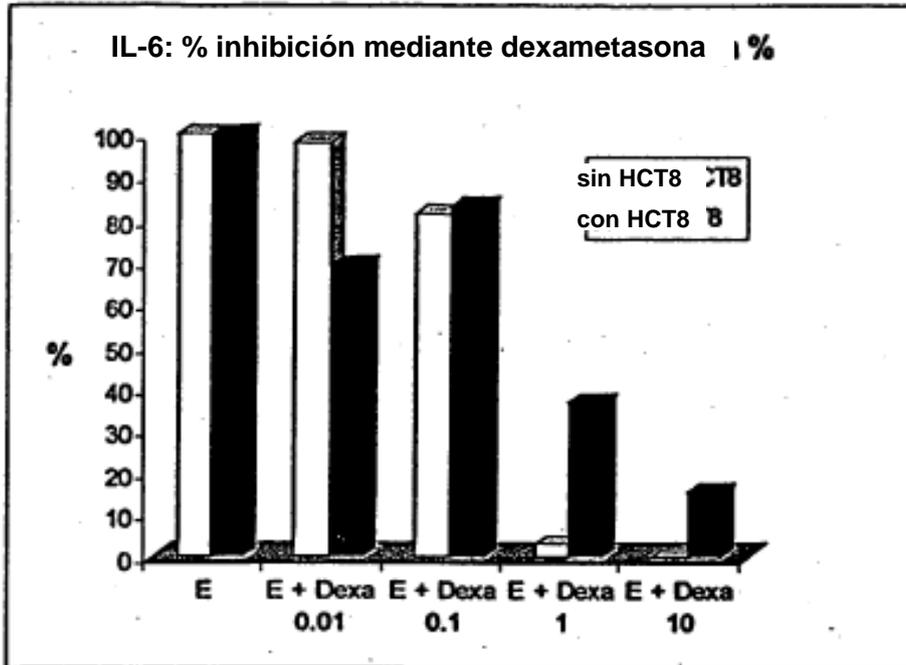


Fig. 2A

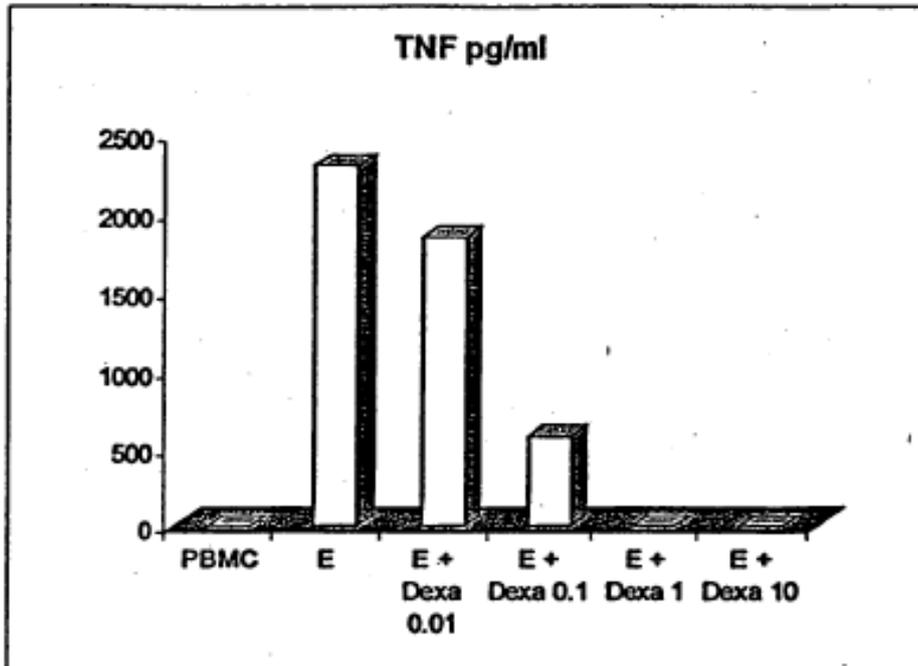


Fig. 2B

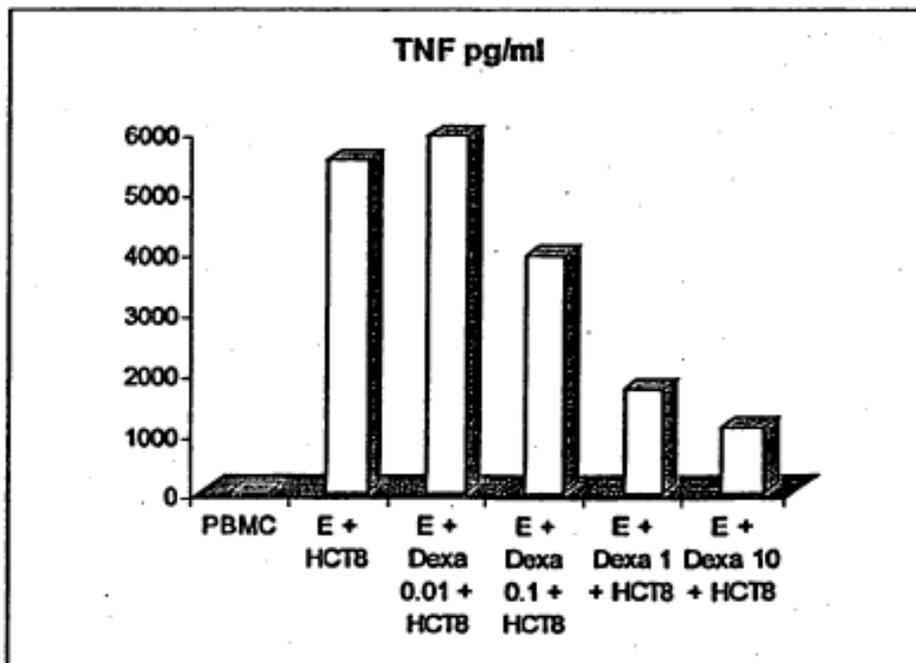


Fig. 2C

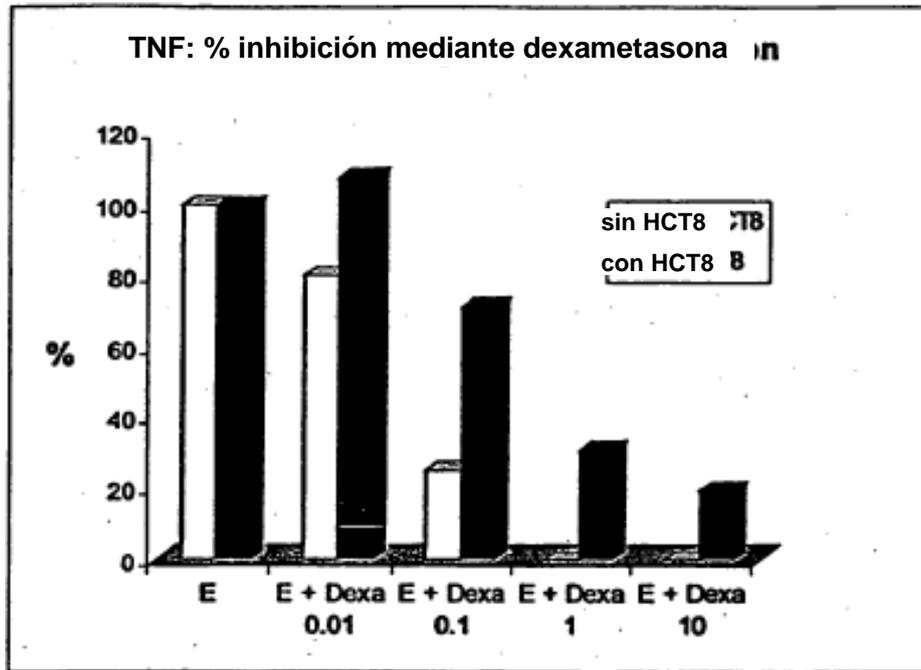


Fig. 3A

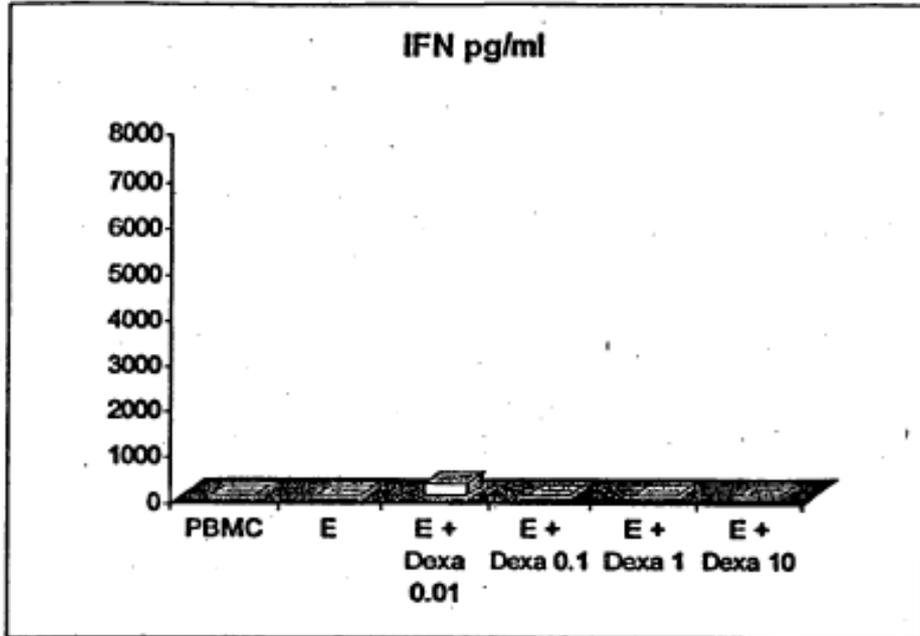


Fig. 3B

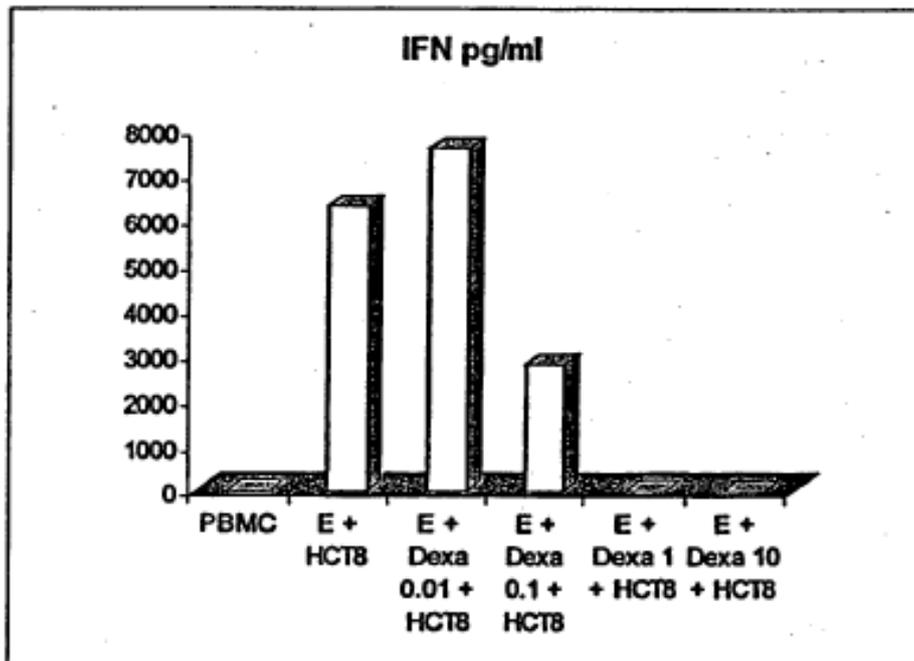


Fig. 3C

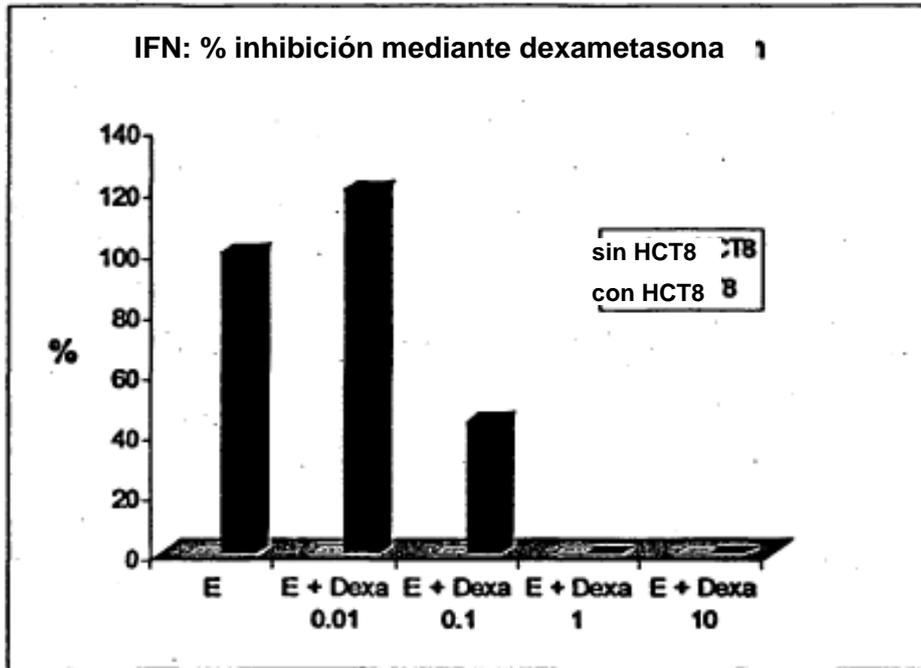


Fig. 4A

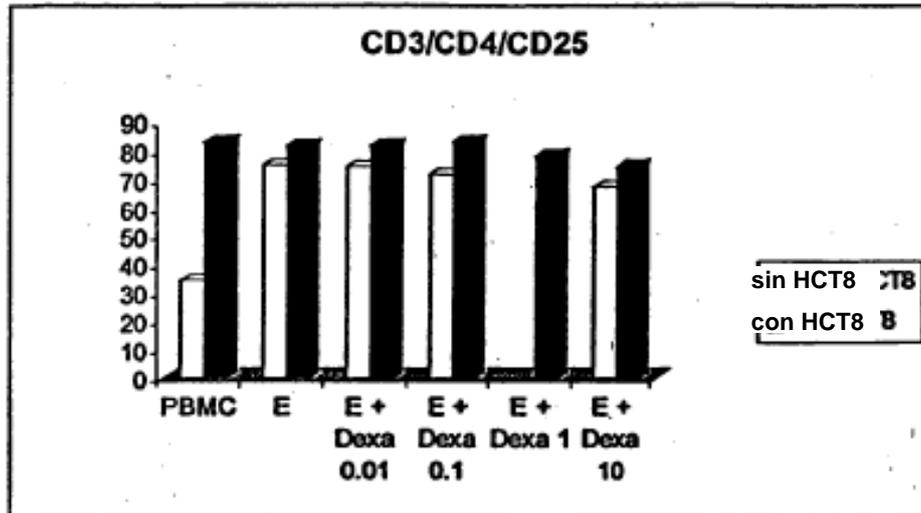


Fig. 4B

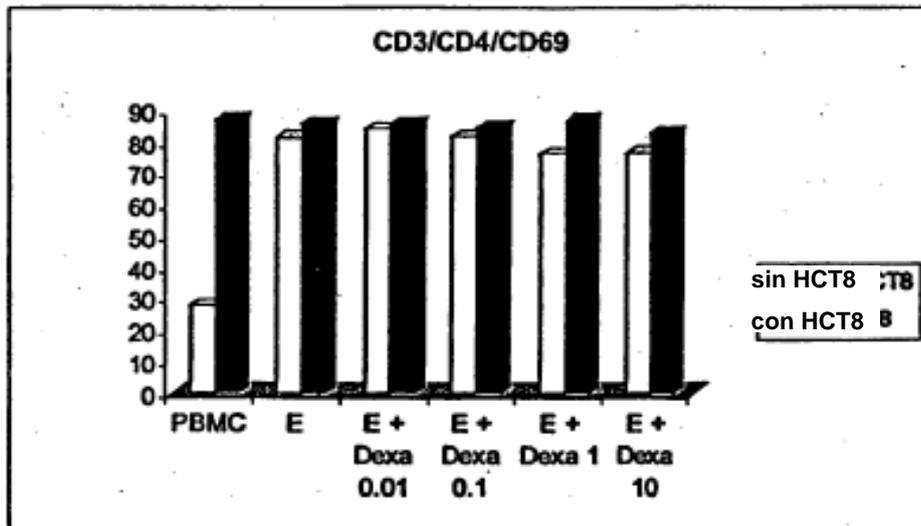


Fig. 4C

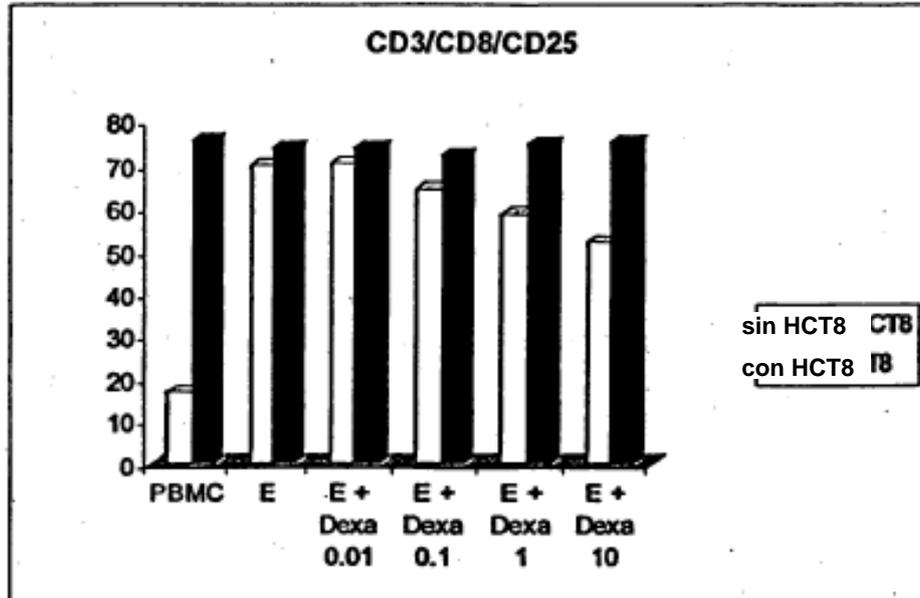


Fig. 4D

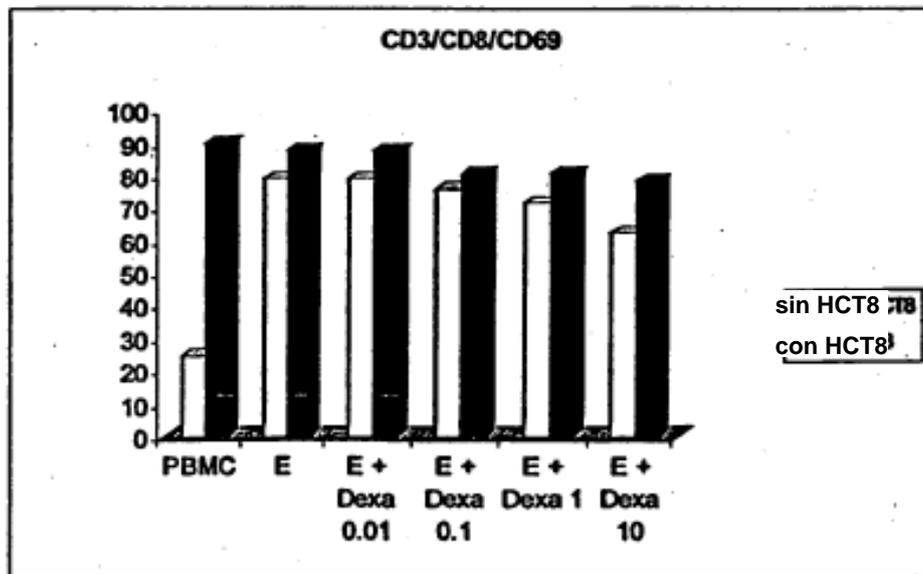


Fig. 4E

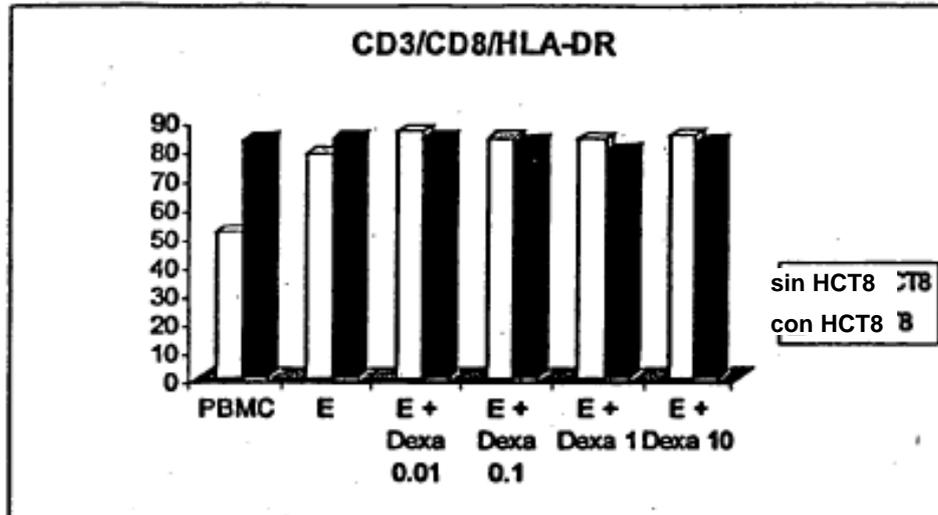


Fig. 5A

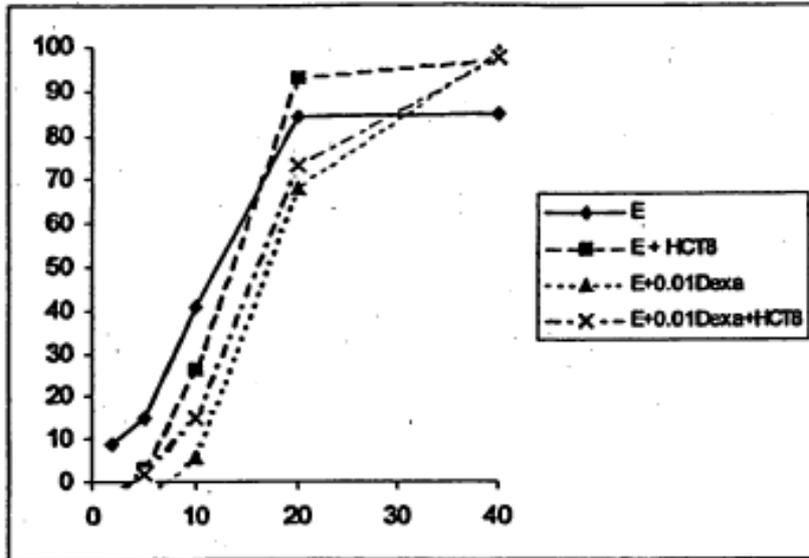


Fig. 5B

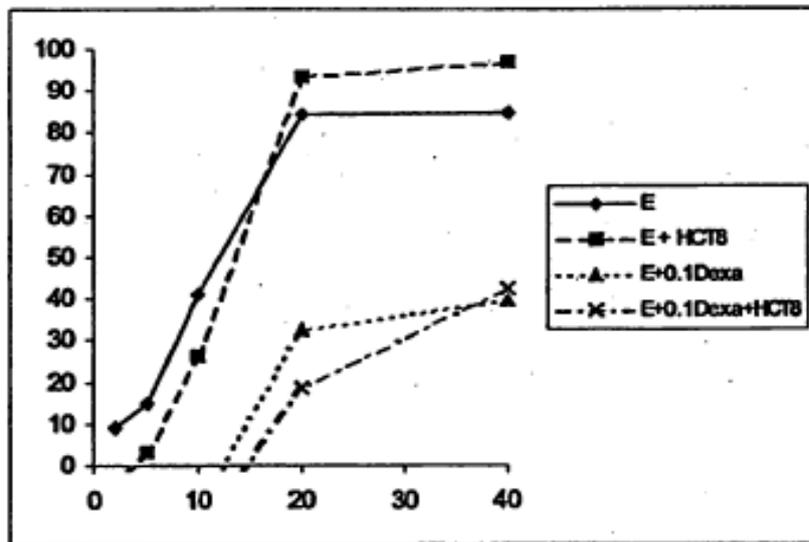


Fig. 5C

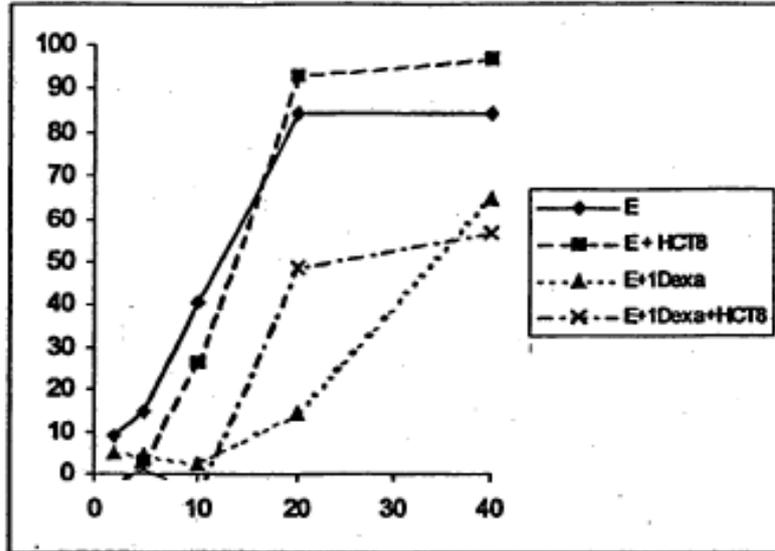


Fig. 5D

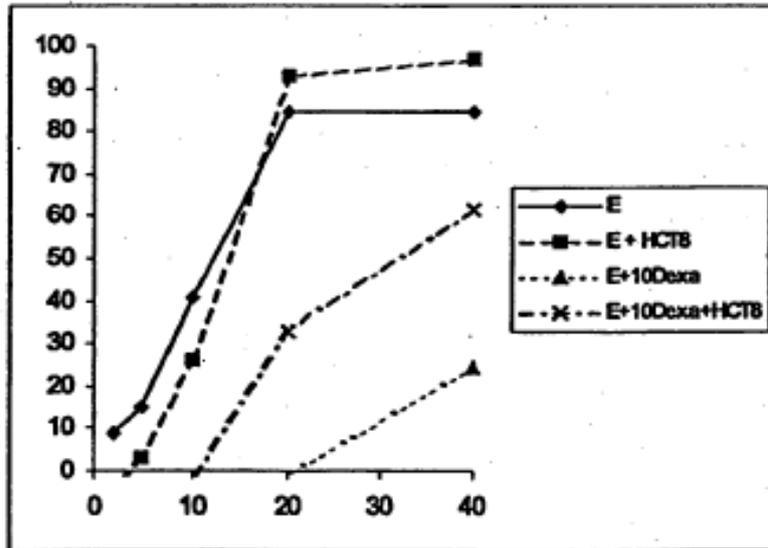


Fig. 6A

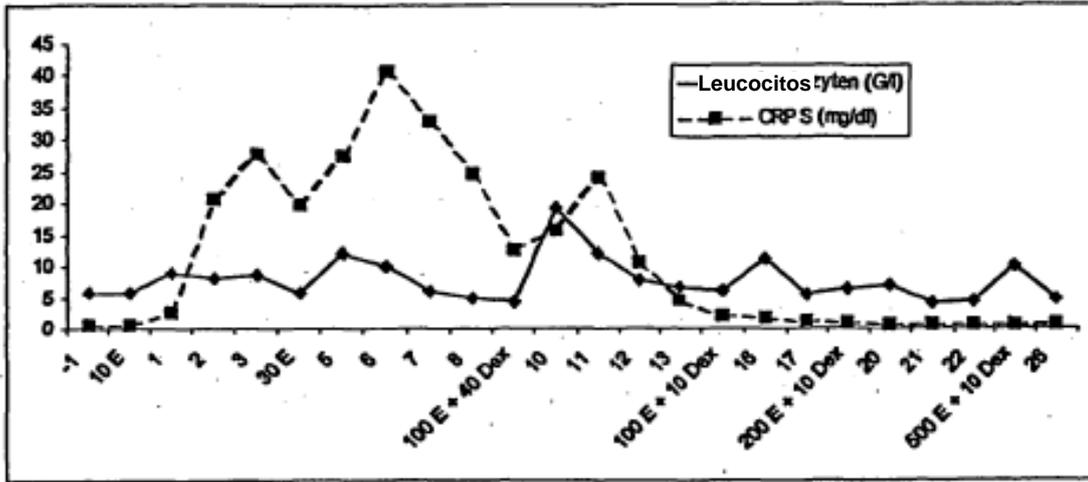


Fig. 6B

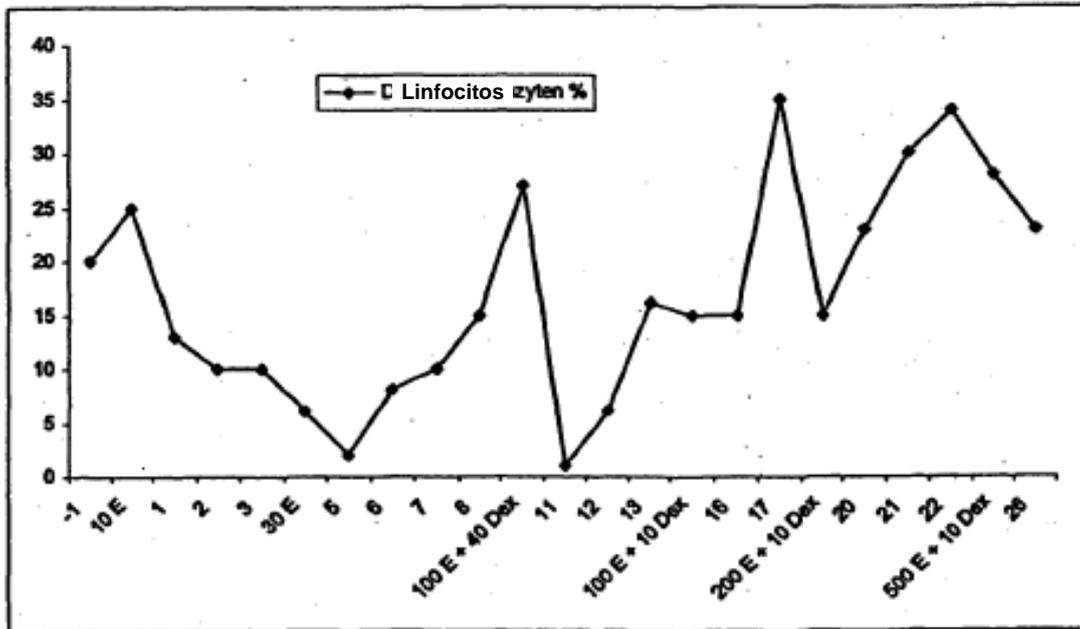


Fig. 6C

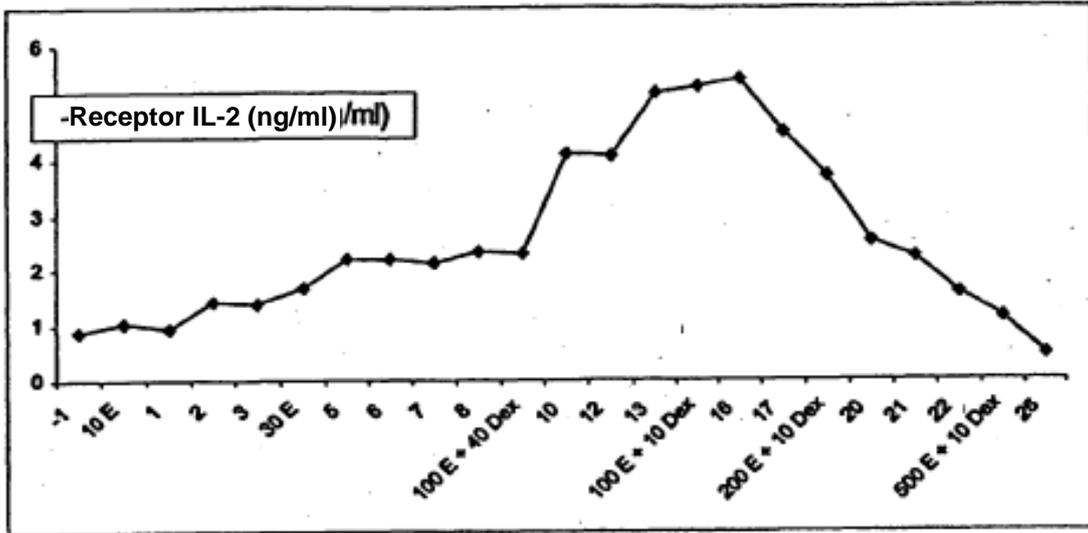


Fig. 6D

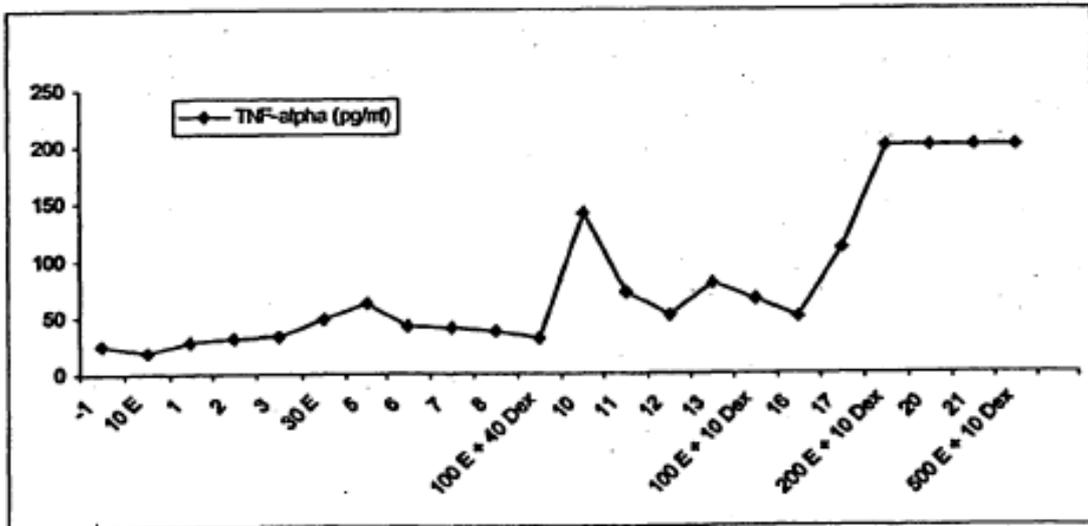


Fig. 6E

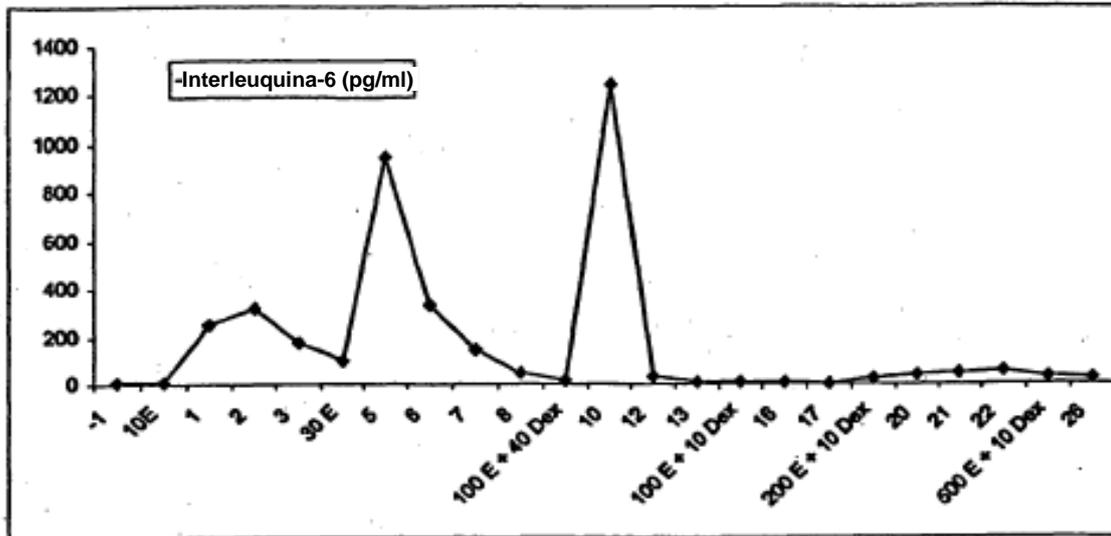


Fig. 7A

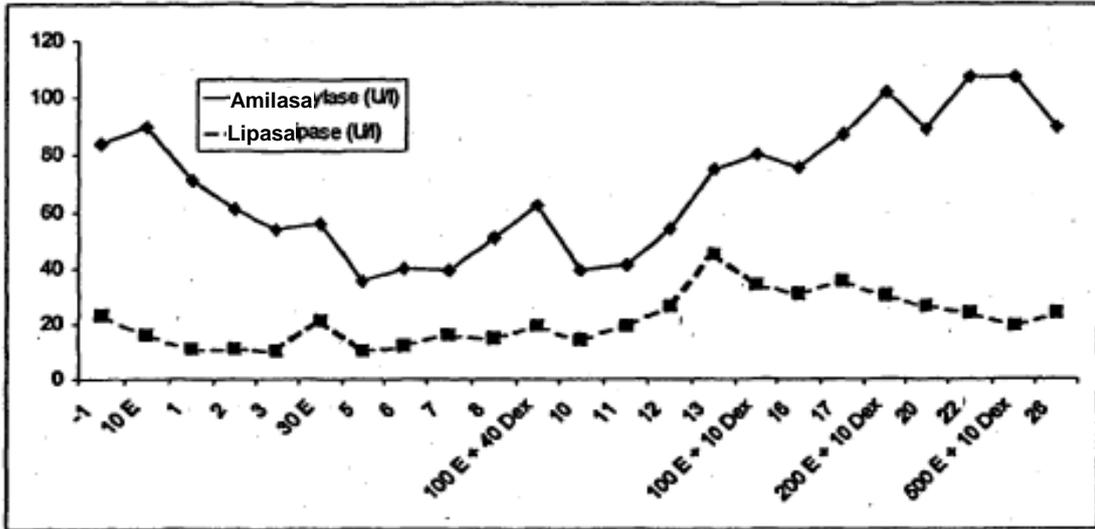


Fig. 7B

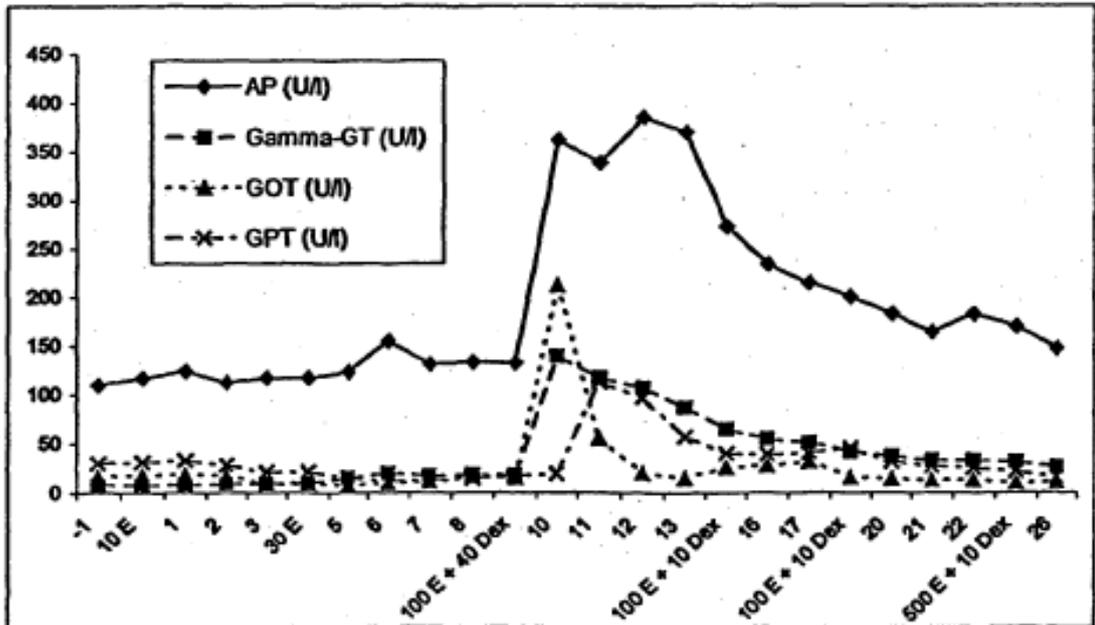


Fig. 7C

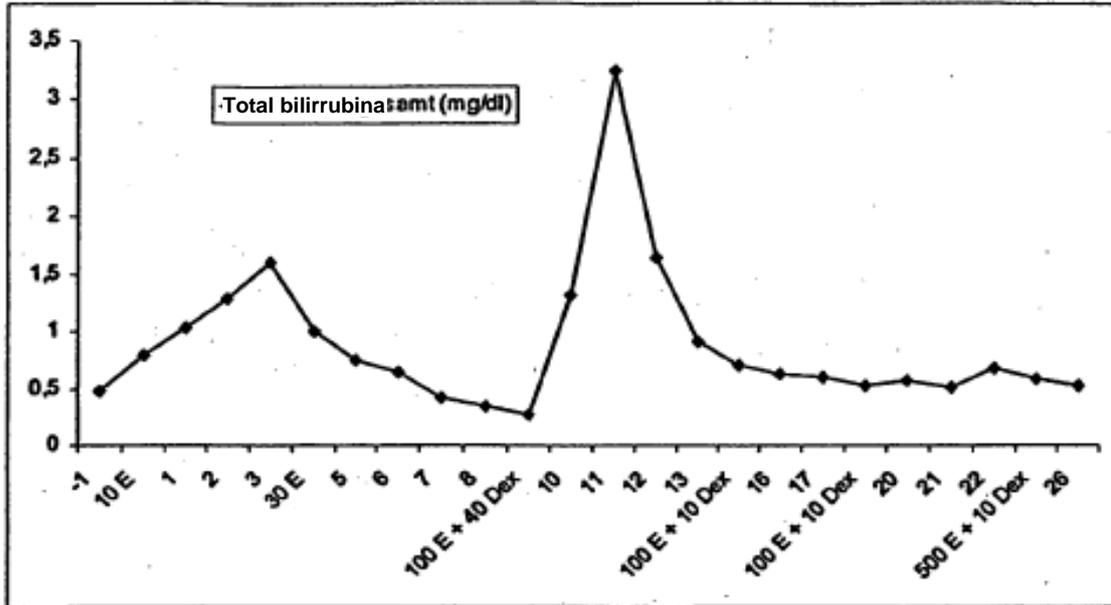


Fig. 8A

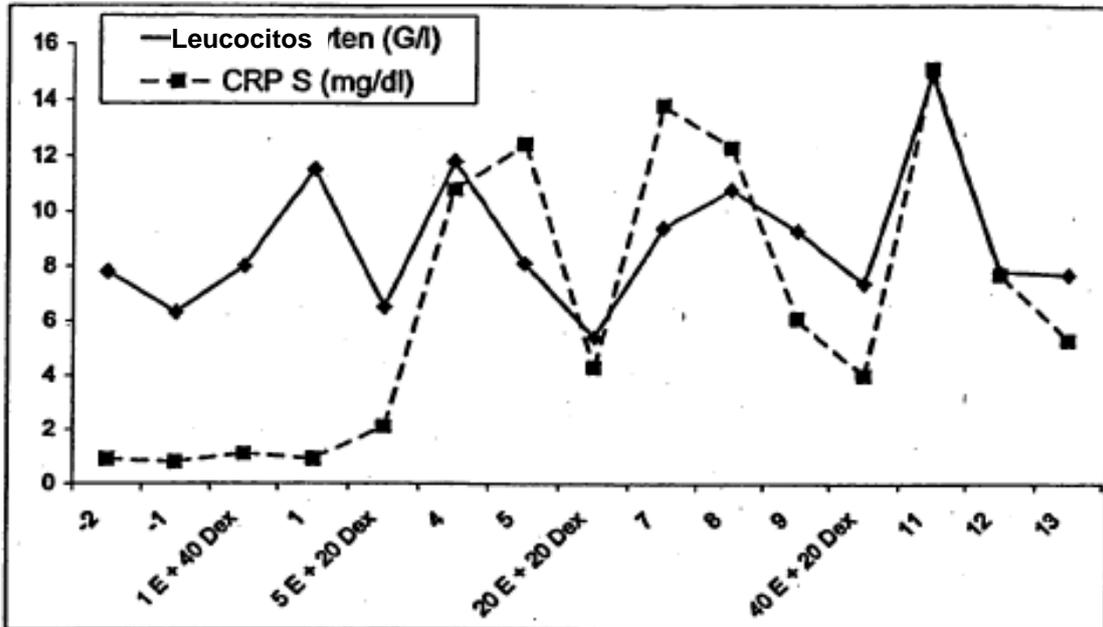


Fig. 8B

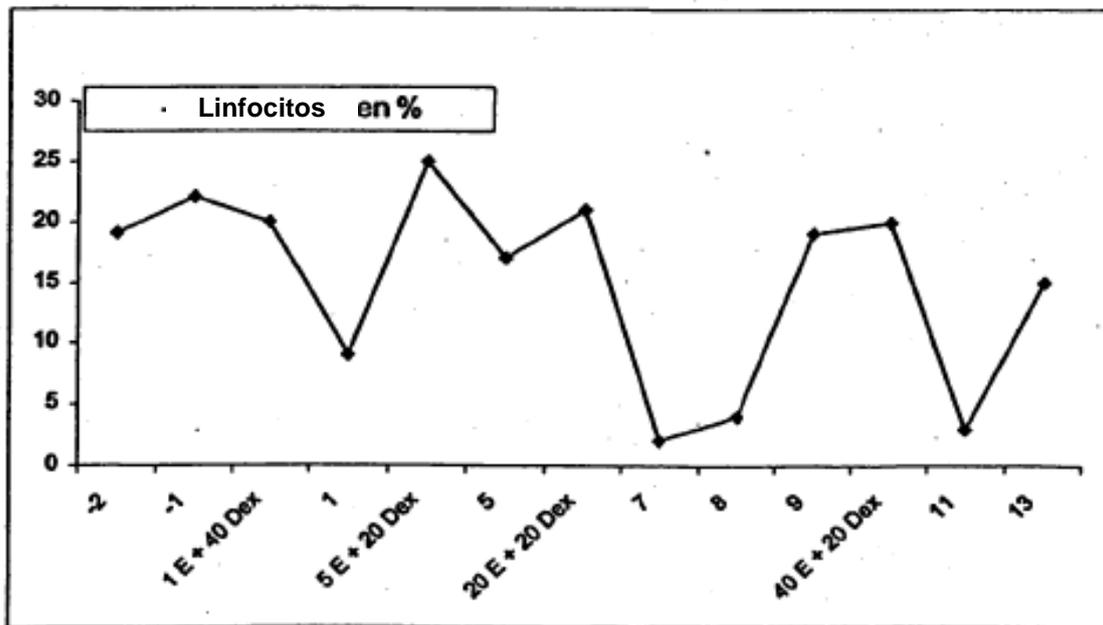


Fig. 8C

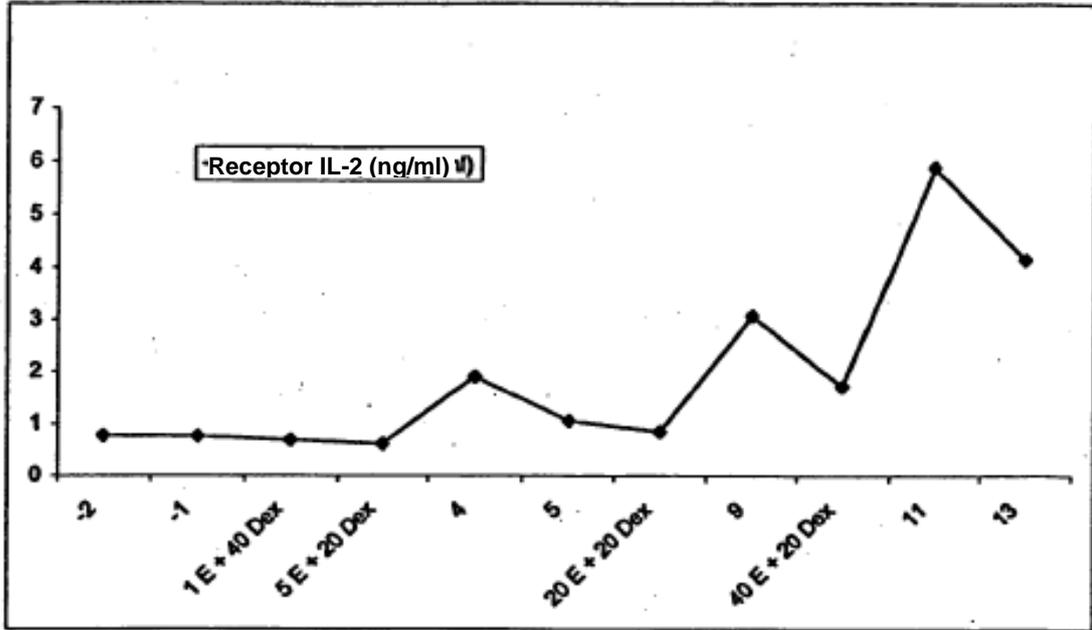


Fig. 8D

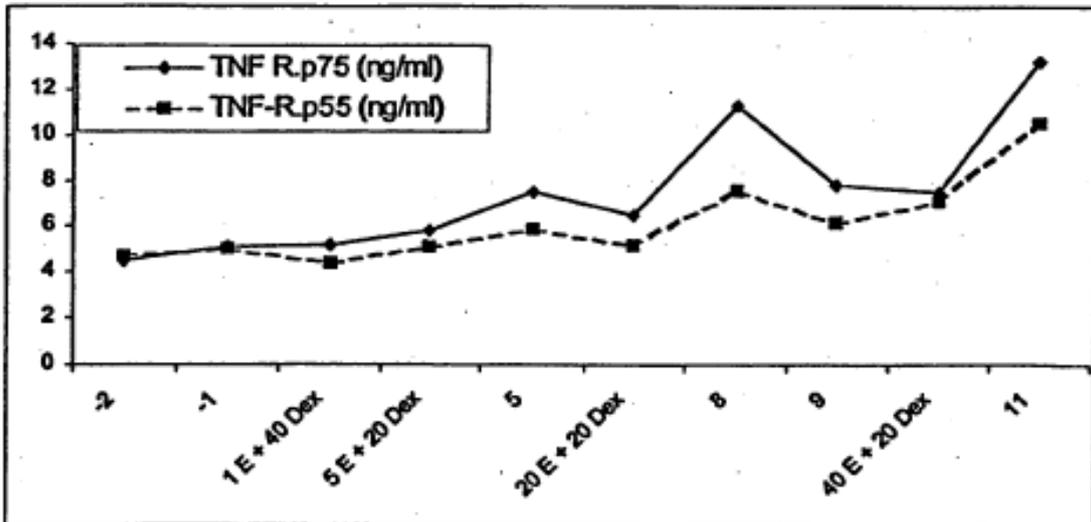


Fig. 8E

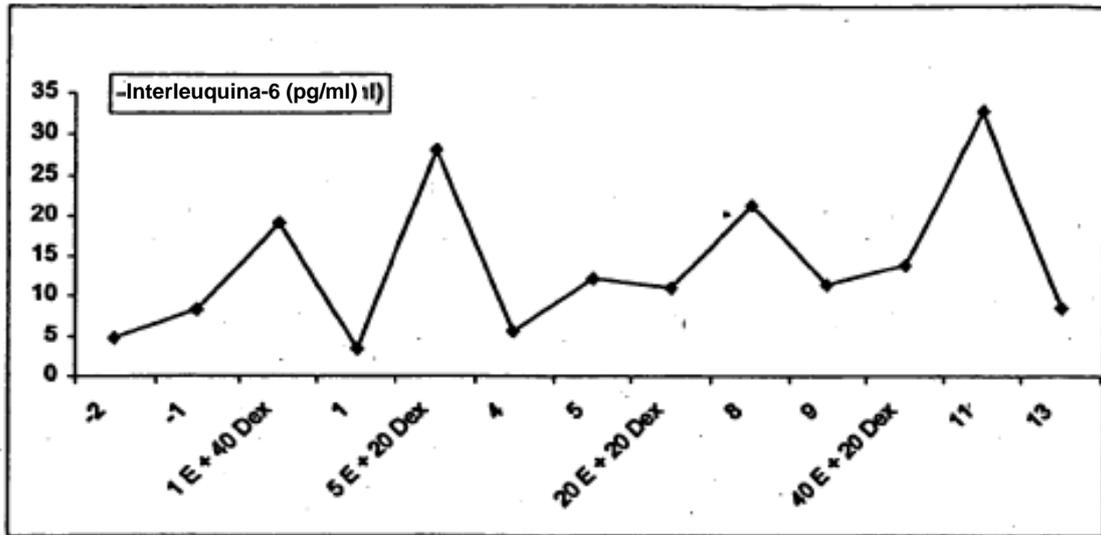


Fig. 9A

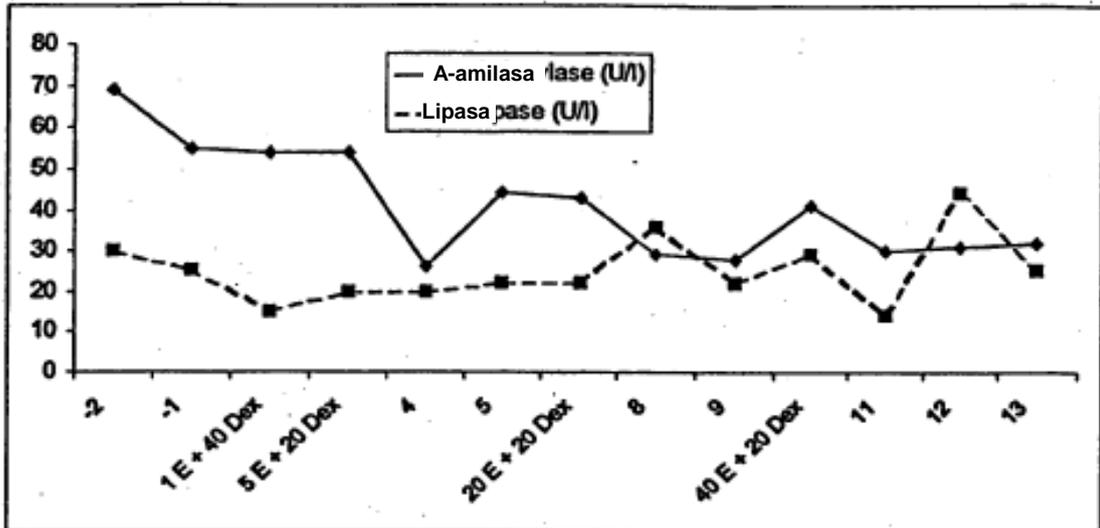


Fig. 9B

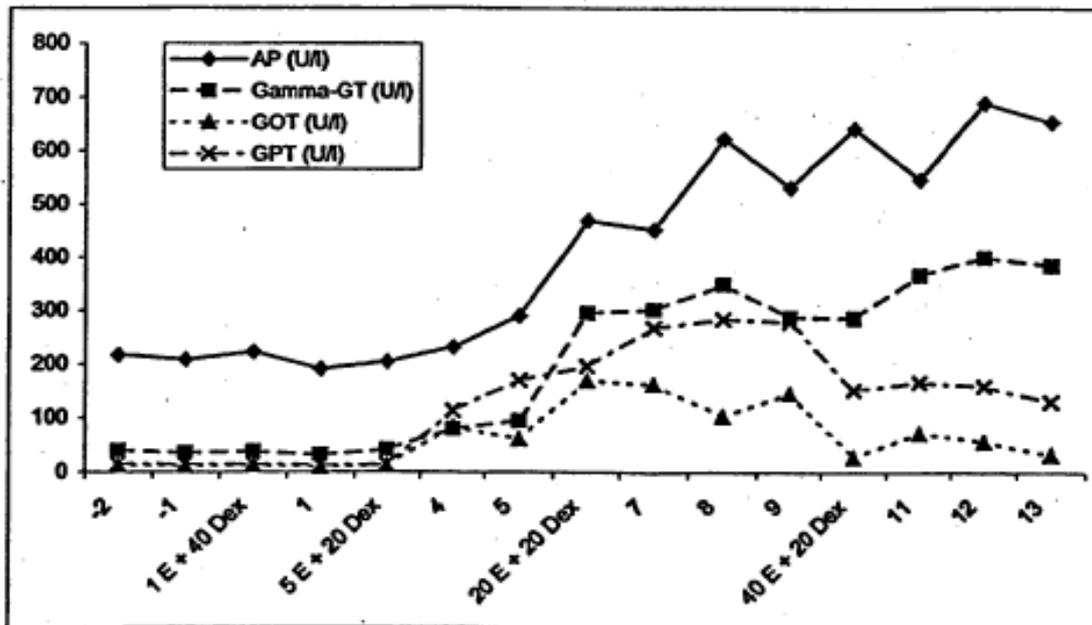


Fig. 9C

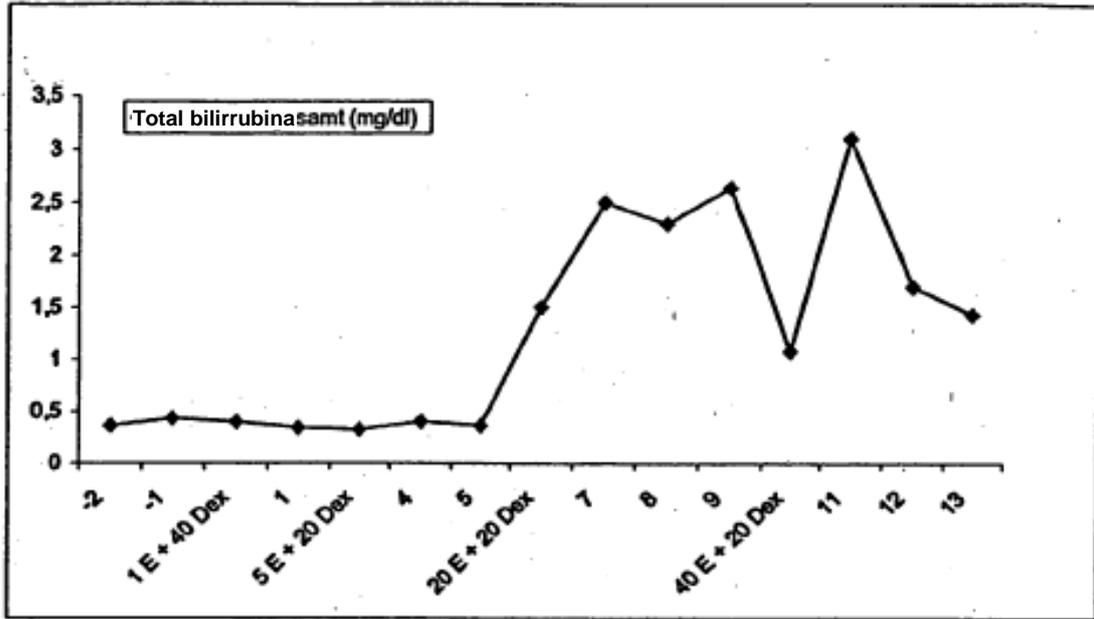


Fig 10a

Valores medios de 3 voluntarios sanos

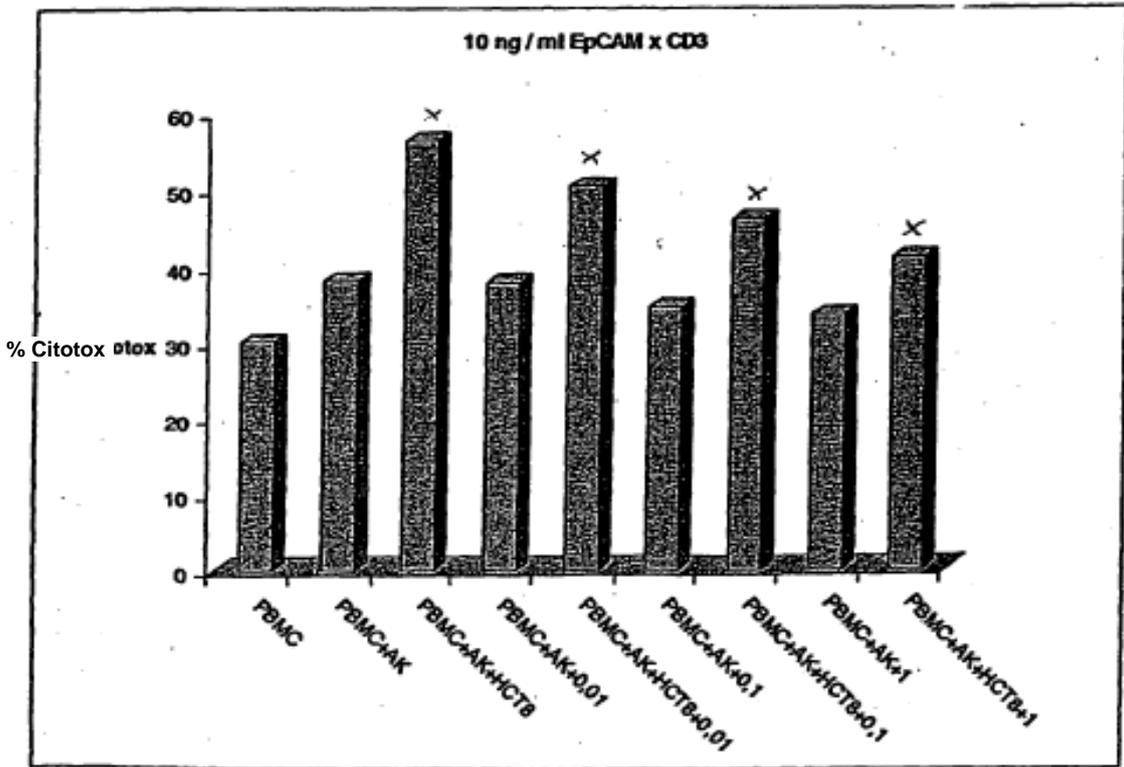


Fig. 106

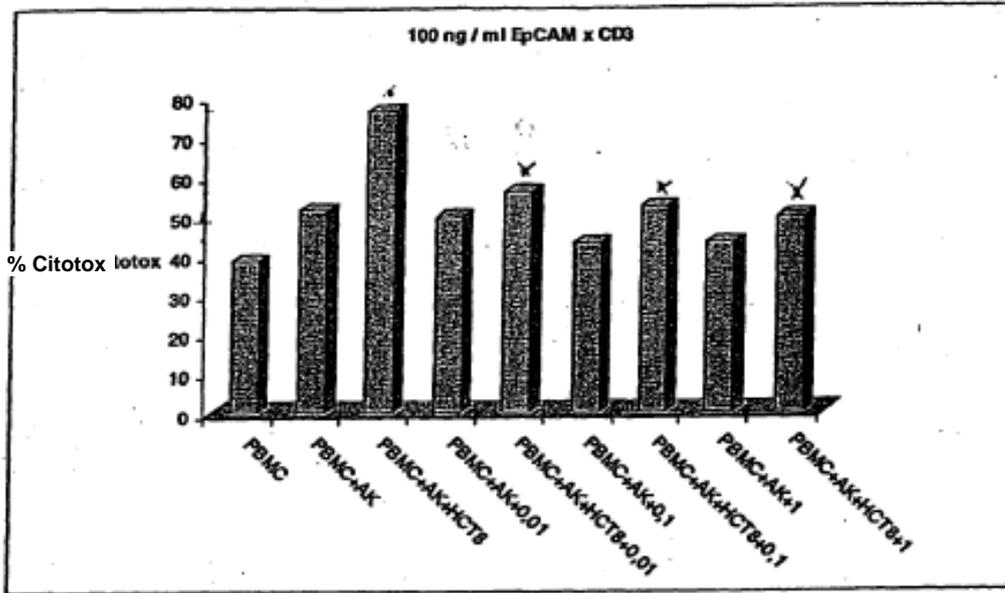


Fig. 10c

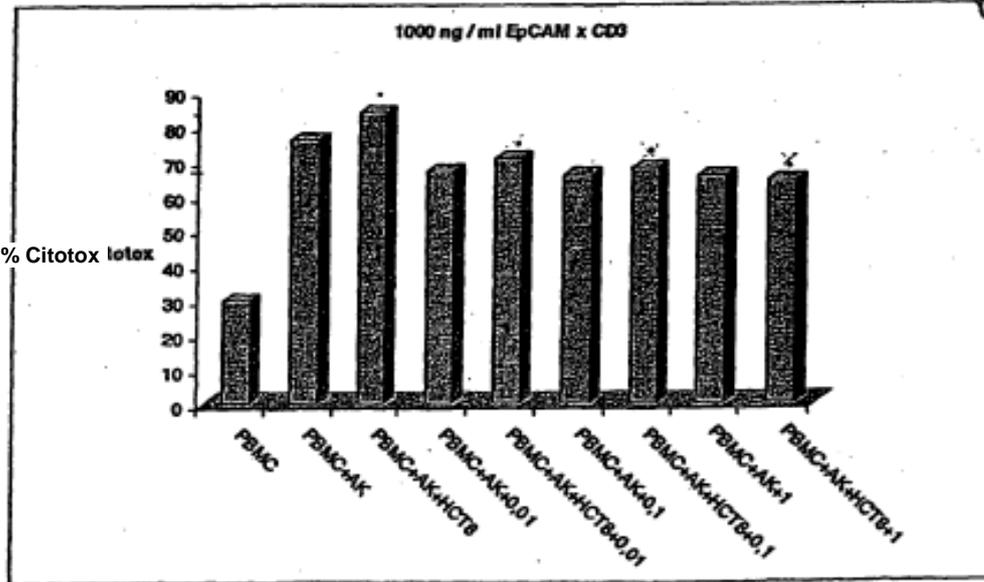


Fig. 10d

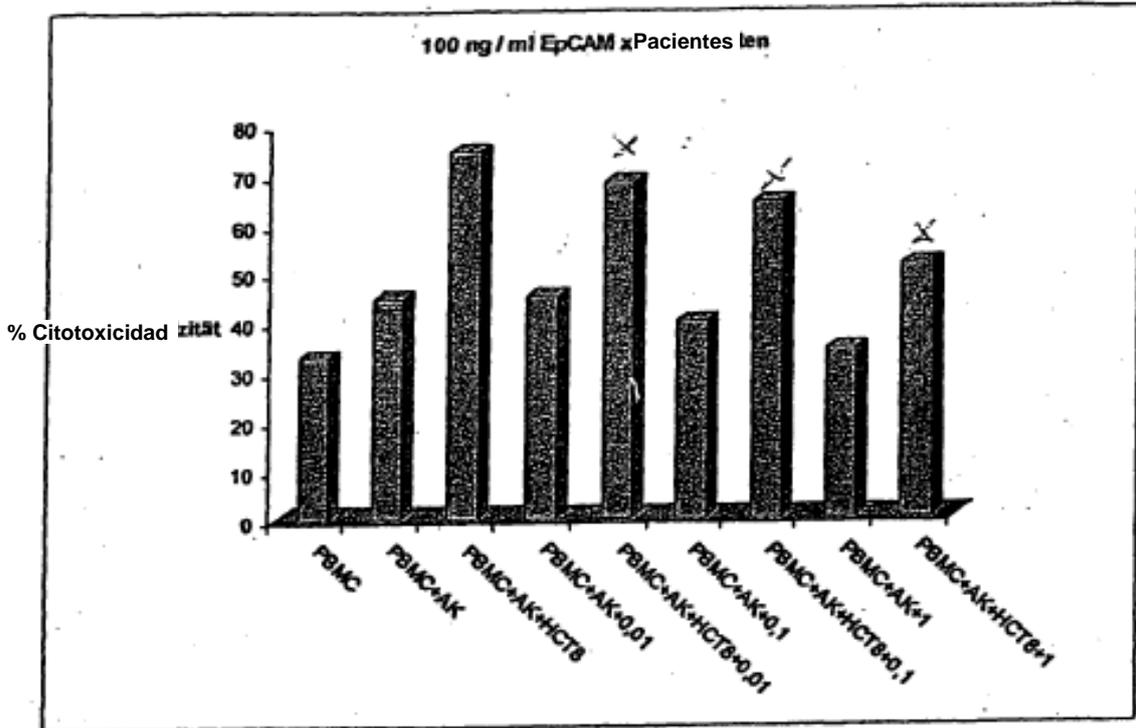


Fig. 11

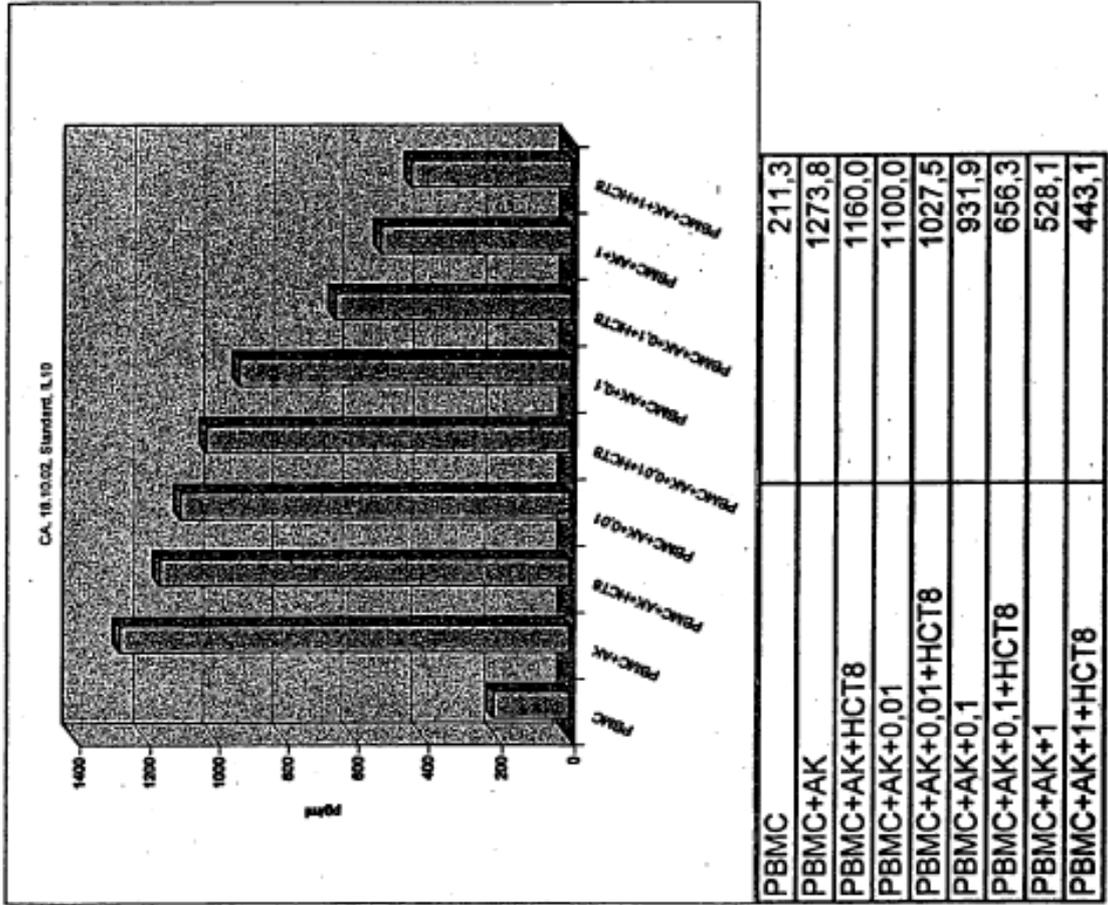


Fig. 12

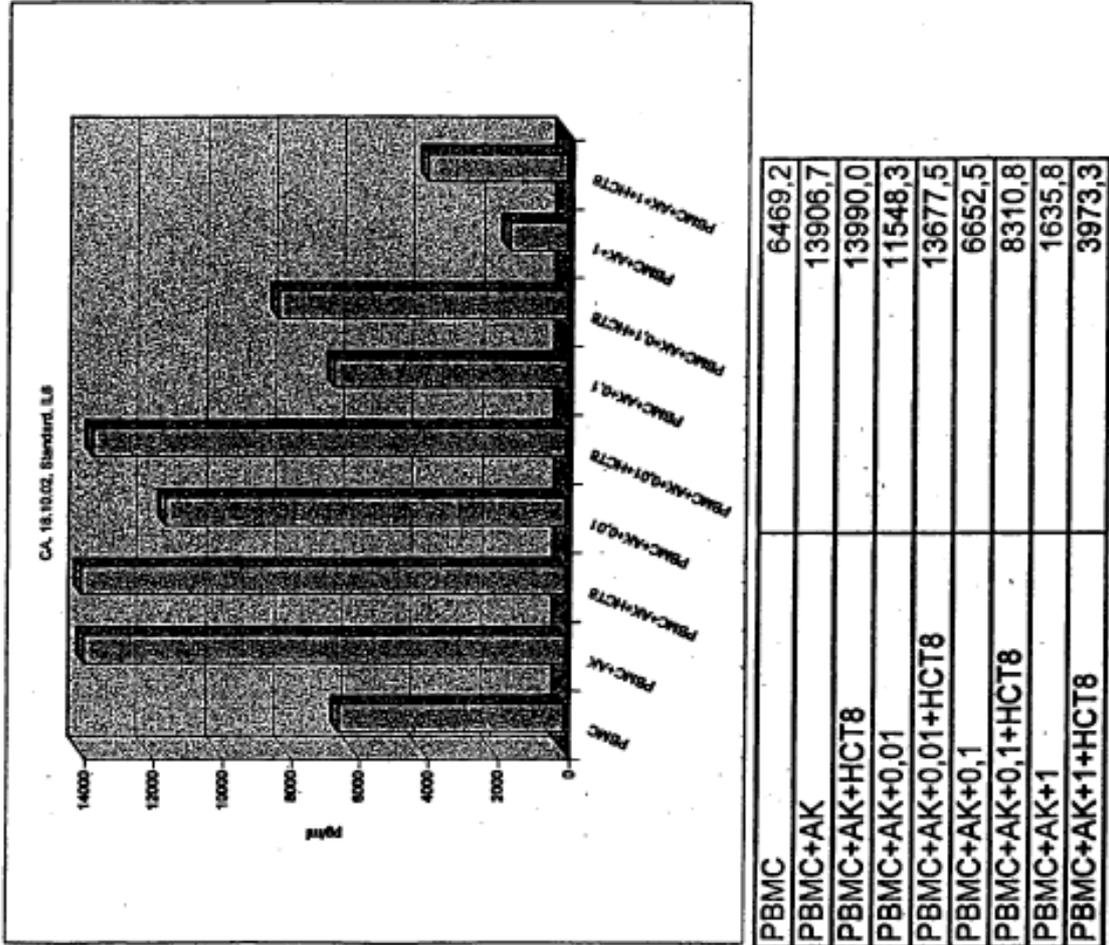


Fig. 13

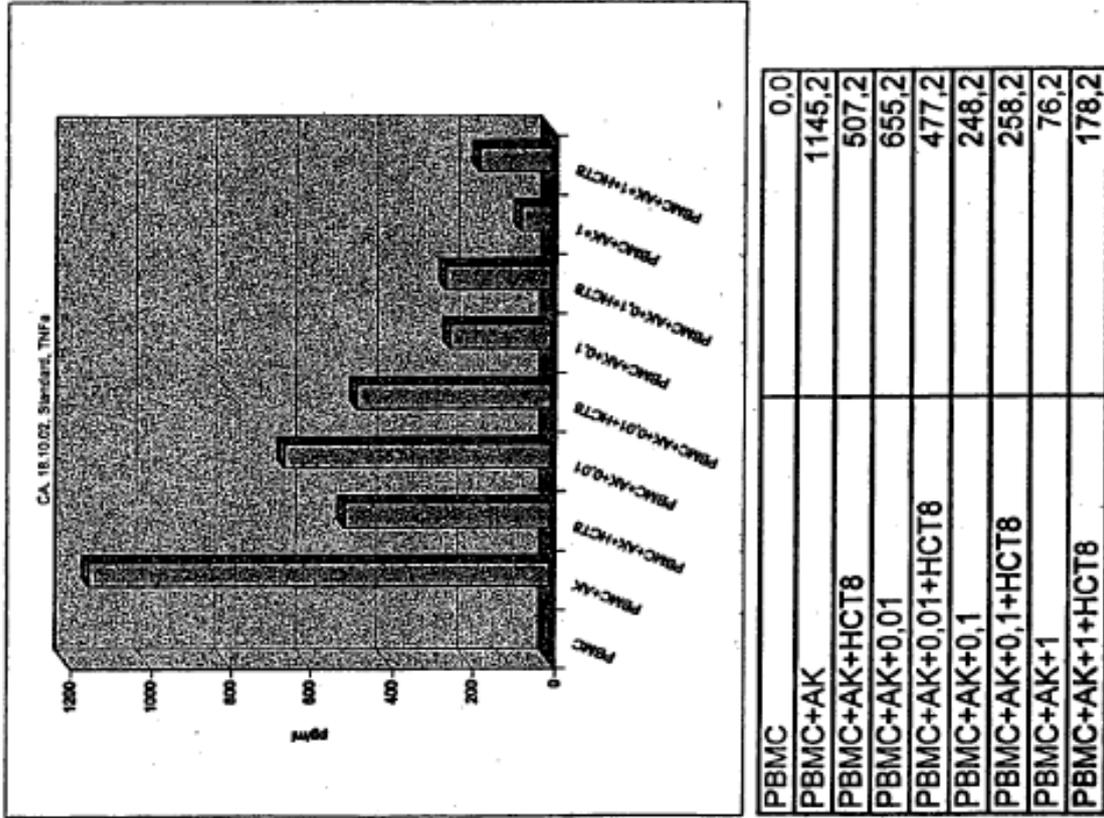


Fig. 14

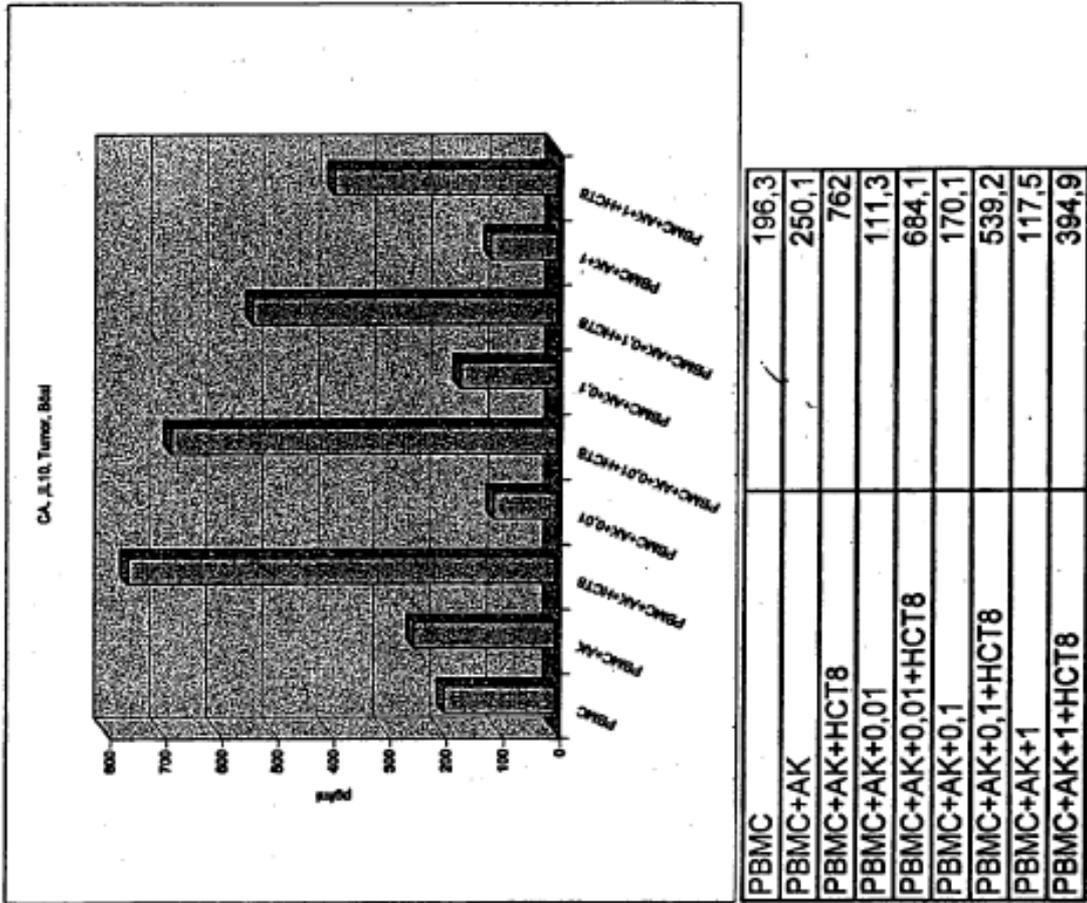


Fig. 15

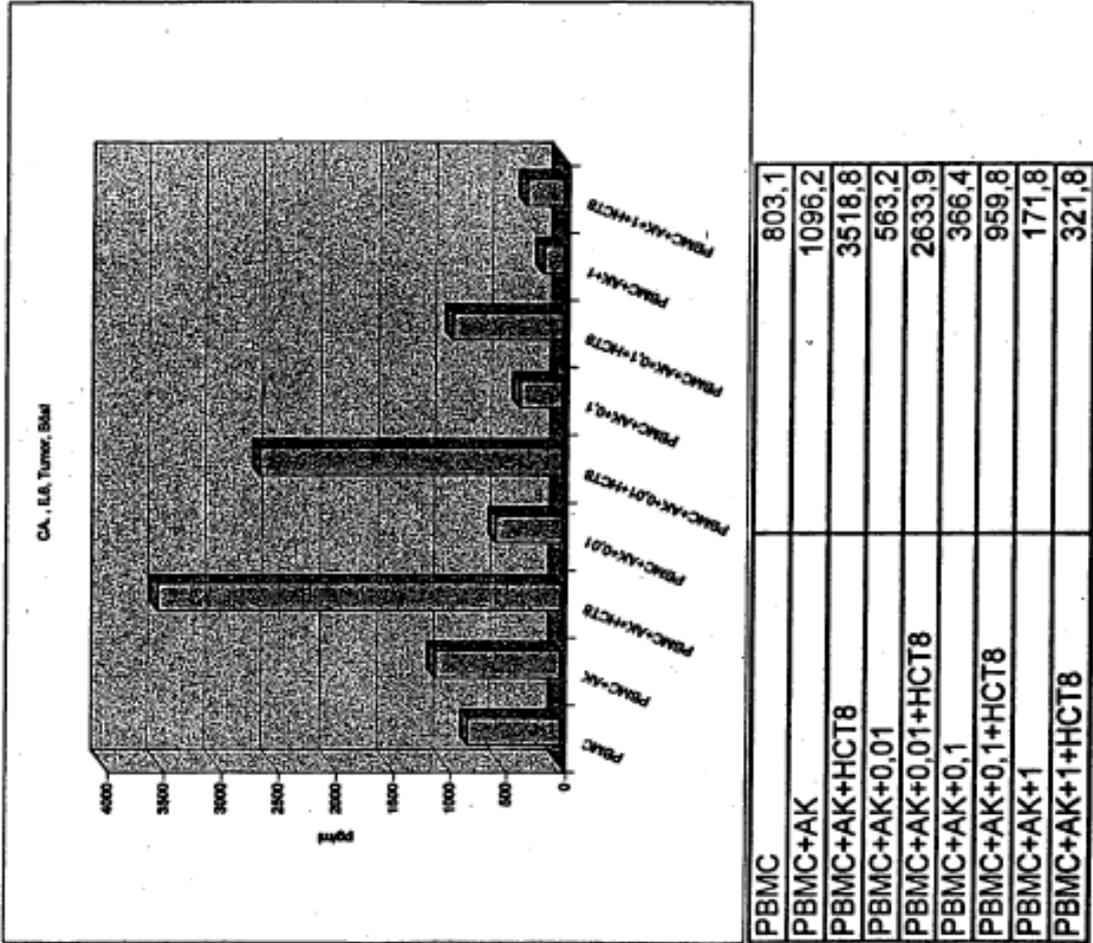


Fig. 16

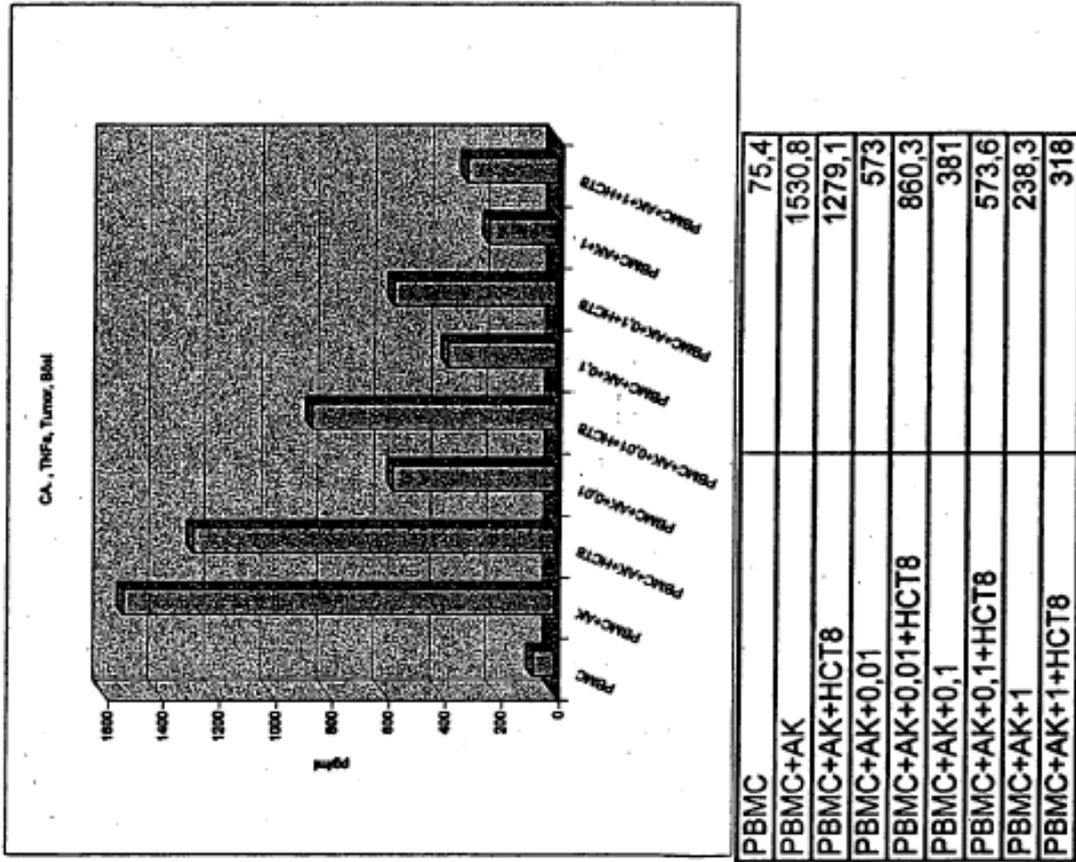


Fig. 17

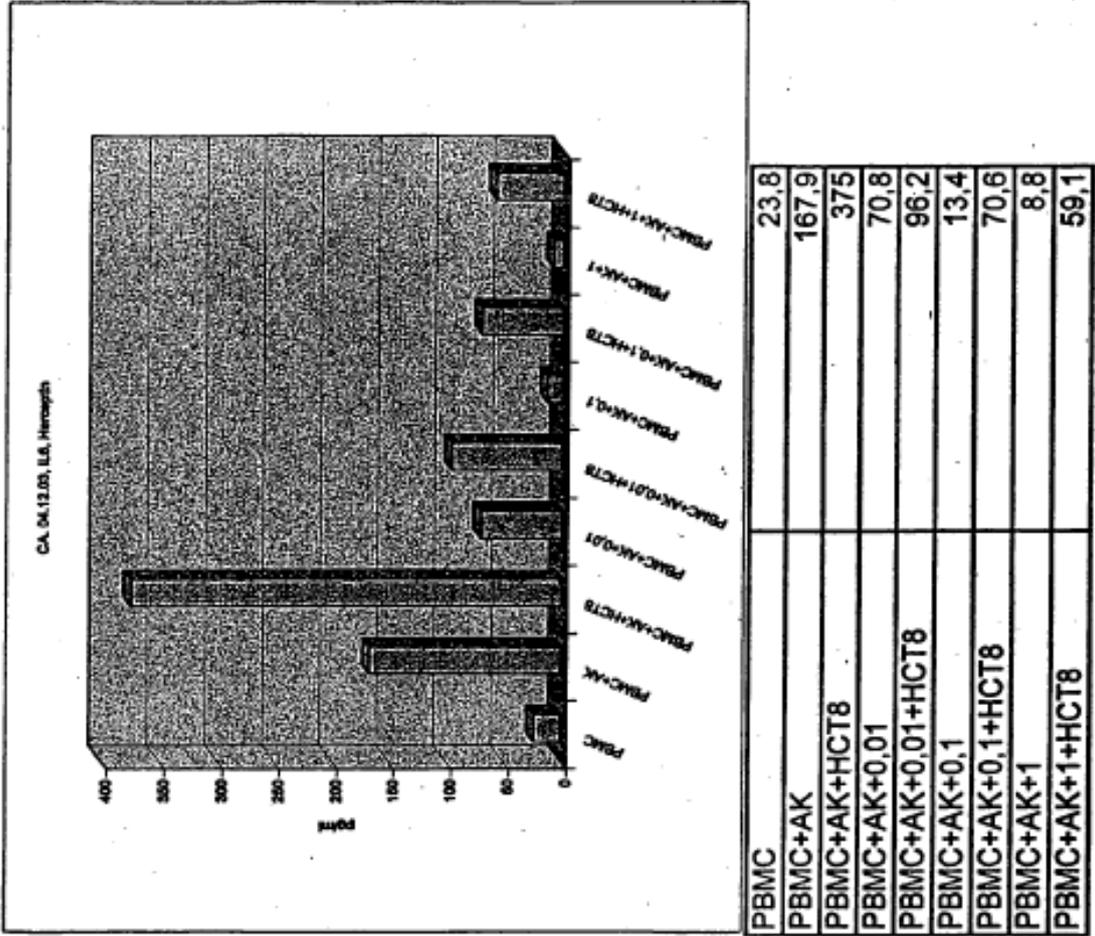


Fig. 18

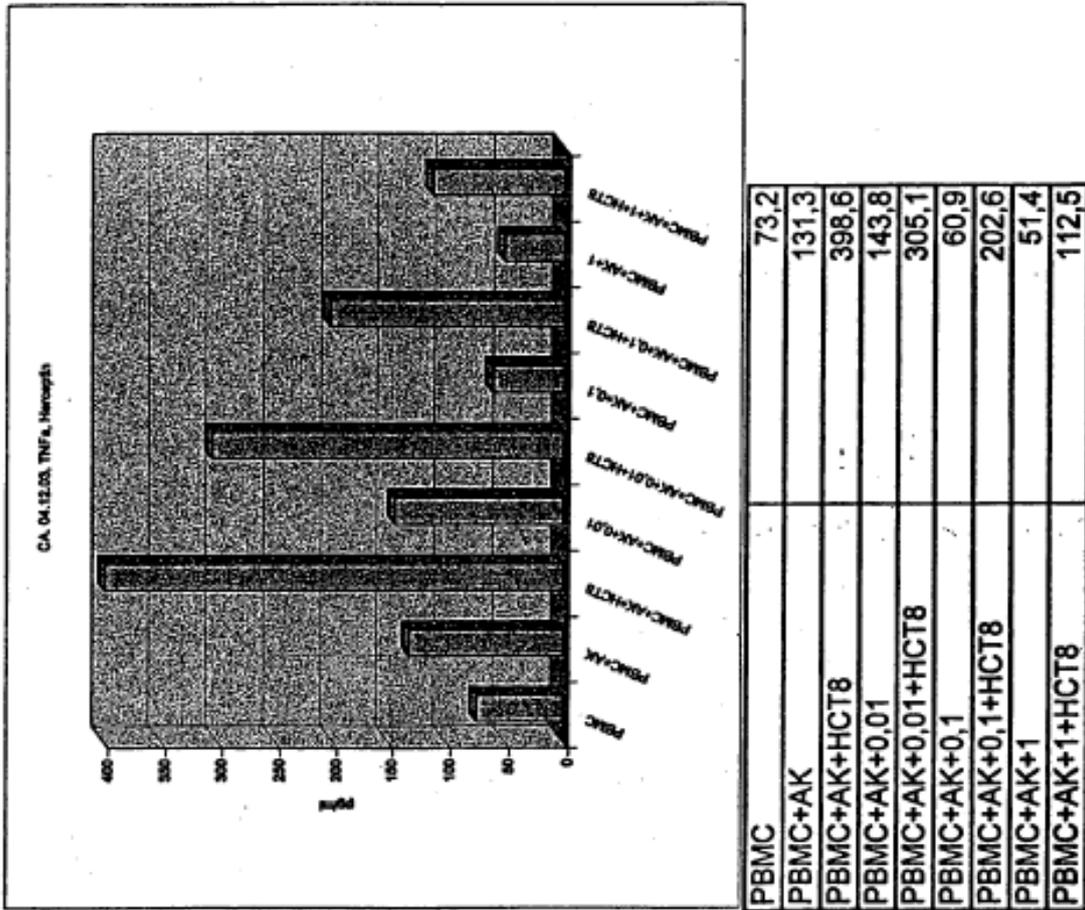


Fig. 19

Análisis FACS
FACS Analyse

