

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 419**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2003 E 03783820 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1528934**

54 Título: **Utilización de anticuerpos contra un antígeno asociado con un tumor**

30 Prioridad:

12.08.2002 AT 12172002

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

22.04.2015

73 Titular/es:

**GREENOVATION BIOTECH GMBH (50.0%)
Bötzingen Strasse 29b
79111 Freiburg, DE y
MERIDIAN BIOPHARMACEUTICALS GMBH
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**LOIBNER, HANS;
HIMMLER, GOTTFRIED;
SAMONIGG, HELLMUT;
STERMETZ, EUGEN;
HAUER, ANDREAS y
REDL, GERDA**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

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

ES 2 534 419 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

Utilización de anticuerpos contra un antígeno asociado con un tumor.

5 La invención se refiere a una nueva utilización de una preparación de anticuerpo así como a un kit para el tratamiento intraoperatorio de pacientes con un tumor.

10 Los tumores se generan debido a un crecimiento celular incontrolado, lo que conduce en el caso de células epiteliales a la formación de aglomerados celulares sólidos. En el caso del tejido tumoral benigno se parte de la base de que el crecimiento celular es limitado y no aparecen tumores secundarios o metástasis. Sin embargo, en las enfermedades cancerosas se produce la formación de tumores malignos, apareciendo en el estadio avanzado tumores secundarios y metástasis. Con la mayor frecuencia aparecen formas de cáncer con tumores epiteliales, que entre otros afectan a la mama, el estómago, el intestino, el páncreas, el pulmón, la próstata y el ovario.

15 El cáncer es una enfermedad ampliamente extendida y presenta en muchos casos un desenlace mortal. La terapia contra el cáncer comprende habitualmente la extirpación de un tumor sólido y un tratamiento adicional que pretende impedir o reducir las metástasis. A las terapias convencionales pertenecen, además de la cirugía, también la quimioterapia y la radioterapia. A pesar de la amplia terapia, que a menudo va acompañada de efectos secundarios graves, el éxito del tratamiento es insuficiente. La tasa de recidiva en el cáncer de intestino es de aproximadamente el 45%. El cáncer epitelial metastásico se considera prácticamente incurable. Por tanto, en el tratamiento de pacientes con cáncer debe impedirse o reducirse la formación de metástasis.

25 Las células tumorales pueden diseminarse desde tumores primarios a líquidos corporales y otros órganos. Estas células tumorales diseminadas pueden encontrarse en estado latente y a menudo no pueden atacarse mediante quimioterapia (radioterapia). Una paciente tratado de esta manera se encuentra aparentemente en un estado curado, que también se describe como "enfermedad residual mínima". Sin embargo, las células tumorales latentes presentan potencial para la formación de metástasis cuando se convierten en células en crecimiento y con metástasis.

30 La inmunoterapia representa una posibilidad de tratamiento innovadora de pacientes con cáncer. La inmunoterapia tanto activa como pasiva son medidas reconocidas para apoyar el sistema inmunitario.

35 El sistema inmunitario adaptativo del ser humano consiste en dos componentes esenciales, la inmunidad humoral y la celular. La respuesta inmunitaria adaptativa se basa en parte en la selección clonal de linfocitos B y T y permite en principio el reconocimiento de cualquier antígeno así como la creación de una memoria inmunológica. Estas características del sistema inmunitario adaptativo se utilizan generalmente de manera provechosa en el caso de vacunaciones.

40 Cada célula B produce un anticuerpo con una determinada especificidad de unión. Este anticuerpo se encuentra como receptor específico también en la membrana de la célula B que lo produce. La respuesta inmunitaria humoral frente a antígenos reconocidos como extraños se basa en la activación selectiva de las células B que producen tales anticuerpos que pueden unirse a epítopos del respectivo antígeno. Las transposiciones de ADN en el transcurso de la diferenciación de células B desempeñan un papel decisivo para la diversidad de anticuerpos.

45 Existen varias posibilidades para intervenir en el sistema inmunitario.

1. Terapia pasiva con anticuerpos:

50 Para fines terapéuticos, es posible suministrar anticuerpos, que son necesarios para cumplir una determinada función dentro de un organismo, a dicho organismo. Este tipo de aplicación se denomina inmunoterapia pasiva y puede utilizarse en diferentes indicaciones médicas, por ejemplo en la inmunoterapia contra el cáncer (Immunol. Today (2000), 21:403), intoxicaciones (Toxicon (1998), 36:823; Therapie (1994), 49:41), infecciones (Clin. Infect. Dis. (1995), 21:150). En estos casos, pueden utilizarse anticuerpos que o bien proceden de animales correspondientemente inmunizados o bien pueden obtenerse a partir de células a través de inmortalización de genes de inmunoglobulina mediante diferentes técnicas biológicas o de biología molecular (por ejemplo la técnica del hibridoma, la técnica de presentación en fago, etc.).

2. Inmunización activa:

60 Para la modulación del sistema inmunitario puede inmunizarse con antígenos. Los antígenos son moléculas, complejos de moléculas u organismos completos a los que pueden unirse anticuerpos. No todos los antígenos provocan una respuesta inmunitaria, es decir no todos los antígenos son inmunógenos. Determinadas moléculas pequeñas no se registran por el sistema inmunitario (haptenos), pudiendo presentarse tales moléculas más pequeñas al sistema inmunitario en forma adecuada y convertirlas de este modo en inmunógenas. Un método de este tipo es el acoplamiento del hapteno a una molécula inmunógena, una denominada "molécula portadora". Para la inmunización activa también pueden utilizarse preparaciones de anticuerpo, tal como se describe en el documento

EP 1 140 168.

El sistema inmunitario sólo puede atacar las células tumorales de manera limitada, dado que apenas se diferencian de las células normales y por tanto faltan anticuerpos específicos. Muchos trabajos se ocupan de la identificación de dianas adecuadas, es decir antígenos diana para la producción de anticuerpos específicos de tumor. La inmunoterapia para el tratamiento del cáncer comprende entonces o bien la terapia pasiva mediante la administración directa de los anticuerpos específicos o bien la vacunación activa con dianas de antígeno adecuadas para estimular el sistema inmunitario y generar los anticuerpos específicos *in vivo*.

Un enfoque para destruir de manera relativamente específica células tumorales es la inmunoterapia pasiva con anticuerpos que están dirigidos contra antígenos asociados a tumor (TAA) (Immunology Today (2000), 21:403-410; Curr. Opin. Immunol. (1997), 9:717). Otro enfoque para destruir células tumorales es una vacunación activa, que desencadena una respuesta inmunitaria frente a TAA. Por consiguiente, esta respuesta inmunitaria también está dirigida contra las células tumorales correspondientes (Ann. Med. (1999), 31:66; Immunobiol. (1999), 201:1).

Determinados TAA se definen como "dianas" relevantes para el desarrollo de medios inmunoterapéuticos para la profilaxis y/o el tratamiento del cáncer. Los TAA son estructuras que se expresan preferentemente sobre la membrana celular de células tumorales, por lo que posibilitan una diferenciación con respecto a tejido no maligno y por tanto se consideran puntos diana para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas de anticuerpos específicos.

En el transcurso del descubrimiento y la posterior caracterización de diferentes TAA se ha comprobado que éstos a menudo presentan funciones importantes para células cancerosas. Permiten a las células degeneradas ejercer propiedades características para el fenotipo maligno, como por ejemplo una capacidad de adhesión aumentada o una captación aumentada de factores de crecimiento, que son de gran importancia para el establecimiento de metástasis. Sin embargo, tales antígenos pueden expresarse absolutamente en determinados estadios también en células normales, donde son responsables de funciones normales de estas células. Un ejemplo de ello es el antígeno hidrato de carbono Lewis Y, que aparece en la mayoría de tumores de origen epitelial, pero que también desempeña un papel importante durante el desarrollo fetal de tejido epitelial. Se ha mostrado que la expresión de este antígeno en el cáncer de pulmón va asociado con un pronóstico desfavorable, dado que las células cancerosas positivas para Lewis Y por lo visto presentan un mayor potencial metastásico (N. Engl. J. Med. 327 (1992), 14).

En el documento EP 0 528 767 se describe la utilización de un anticuerpo anti-Lewis Y humanizado para el tratamiento de cáncer epitelial.

Entre las demás estructuras de hidrato de carbono asociadas con un tumor conocidas se encuentran por ejemplo todos los antígenos Lewis, que se expresan de manera intensificada en muchos tipos de cáncer epitelial. A éstas pertenecen estructuras de Lewis x, Lewis b y Lewis y, así como estructuras de Lewis x sializadas. Otros antígenos hidratos de carbono son estructuras de GloboH, KH1, antígeno Tn, antígeno TF, el epítipo de alfa-1,3-galactosilo (Elektrophoresis (1999), 20:362; Curr. Pharmaceutical Design (2000), 6:485, Neoplasma (1996), 43:285).

Otros TAA son proteínas que se expresan por células cancerosas de manera especialmente intensa, como por ejemplo CEA, TAG-72, MUC1, proteína de unión a folato A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, etc. (Sem. Cancer Biol. (1995), 6:321). Los TAA relevantes son con frecuencia antígenos superficiales de células epiteliales, que aparecen de manera aumentada en células en crecimiento, como tejido fetal, y también en tejido tumoral.

Las aplicaciones terapéuticas directas de anticuerpos frente a TAA se basan en inmunoterapias pasivas, es decir, un anticuerpo específico se administra de manera sistémica en una cantidad adecuada a pacientes con cáncer y ejerce un efecto inmunoterapéutico. La semivida biológica de tales agentes depende de su estructura y es limitada. Por tanto, es necesario realizar aplicaciones repetidas. Sin embargo, esto puede conducir en el caso de utilizar anticuerpos xenogénicos (por ejemplo anticuerpos monoclonales murinos, MAK) a reacciones inmunitarias no deseadas, que pueden neutralizar un posible efecto terapéutico y provocar efectos secundarios peligrosos (reacciones anafilácticas). Por tanto, tales agentes inmunoterapéuticos sólo pueden administrarse durante un tiempo limitado.

Una compatibilidad mejorada se consigue mediante la reducción de las estructuras xenogénicas del anticuerpo y la incorporación de estructuras humanas, por ejemplo con anticuerpos quiméricos o humanizados. También se desarrollan sistemas para la producción de anticuerpos humanos específicos. Así, determinadas líneas celulares, organismos o animales transgénicos según el estado de la técnica pueden producir anticuerpos humanos.

Diferentes trabajos tratan el riesgo de la formación de metástasis mediante la liberación de células tumorales, como puede producirse en un tratamiento quirúrgico. Como se describe en Clin. Cancer Res. 4(2), 343-8 (1998), precisamente durante una resección tumoral pueden determinarse células tumorales en muestras de sangre. La diseminación intraoperatoria de células tumorales hematógenas se relaciona directamente con la "enfermedad residual mínima" así como con la formación de metástasis. Por tanto, en Semin. Surg. Oncol. 20(4), 329-33 (2001) se propone tomar medidas perioperatorias adicionales de terapia con anticuerpos o terapia citotóxica.

Un tratamiento combinado de pacientes con un tumor se describe en el documento WO 00/69460. Los pacientes se tratan en primer lugar durante 8-24 semanas antes de un tratamiento quirúrgico con una preparación de anticuerpo, combinada con un agente citotóxico, a intervalos semanales, para reducir el tamaño del tumor. Tras haberse realizado la resección tumoral, se somete de nuevo al paciente al tratamiento inmunoterapéutico combinado. Este tratamiento perioperatorio comprende de momento un ciclo de tratamiento completo semanas antes y posteriormente un ciclo adicional semanas tras la operación. En este documento se administran anticuerpos que a través de una función ADCC o CDC conducen a la muerte celular (véase página 5, líneas 10-17). Los pacientes así tratados muestran una tasa de supervivencia mejorada así como una progresión tumoral (TTP) reducida.

Según el documento US 20010006618 se proponen preparaciones de anticuerpo para la utilización diagnóstica durante una intervención operatoria, intravascular, laparoscópica o endoscópica. Se pretende detectar lesiones intraoperatorias utilizando una preparación de anticuerpo marcado. A este respecto, el anticuerpo marcado se administra en el plazo de 48 horas antes de la intervención y tras la operación se examina al paciente con respecto a la posible distribución del anticuerpo marcado. La sustancia de marcaje puede utilizarse, además de para la detección, también para el tratamiento del tumor, por ejemplo utilizando un reactivo fotoactivo como sustancia de marcaje, que tras la unión del anticuerpo se activa mediante la acción de la luz.

Según el documento US nº 4.643.971 se propone una selección de anticuerpos específicos de tumor para la determinación de cáncer biliar antes de una operación correspondiente.

El documento WO 01/23005 se refiere a la administración de anticuerpos que están conjugados con un colorante, para la representación del borde del tumor. Los conjugados de anticuerpo-colorante se acumulan preferentemente en la región de borde del tejido celular de un tumor y con ello hacen que pueda representarse ópticamente la región de borde (véase página 8, 1^{er} párrafo completo).

Nakashio *et al.*, Int. J. Onc. 10(2), 1997: 355-362, se refiere a la administración de anticuerpos frente a los TAA CD44H e integrina β_1 tras una operación para la extirpación de un tumor, para impedir o reducir una propagación del cáncer.

La invención se plantea el objetivo de mejorar el tratamiento de pacientes con cáncer en el sentido de que se suprima en su mayor parte la diseminación de células tumorales o la formación de metástasis.

El objetivo se soluciona según la invención mediante el objeto de las reivindicaciones.

La utilización según la invención se refiere a una preparación a base de un anticuerpo para la preparación de un fármaco, anticuerpo que está dirigido contra Lewis Y. Este fármaco se administra para el tratamiento intraoperatorio de pacientes con un tumor en el marco de intervenciones quirúrgicas, inmunocomplejándose células tumorales epiteliales. La formación de inmunocomplejos tiene lugar durante la operación, es decir, sobre todo sobre tejido tumoral o células, que pasan a ser accesibles de manera intraoperatoria. Para el tratamiento intraoperatorio, el fármaco se administra directamente durante o 24 horas antes de la intervención quirúrgica.

El tratamiento intraoperatorio es una condición previa para la activación funcional del sistema inmunitario frente a la célula tumoral, tras lo cual ésta se lisa directamente. La diseminación de células tumorales, que puede suceder durante determinadas operaciones quirúrgicas, se inhibe entonces en gran medida. El hecho de que una diseminación de células tumorales puede aparecer incluso durante la biopsia, es decir una intervención quirúrgica relativamente poco invasiva, se mostró por ejemplo en pacientes con cáncer de mama. En este caso, no era posible detectar células tumorales diseminadas antes de la operación; tras la biopsia el valor de las células epiteliales en circulación, que corresponden a células tumorales diseminadas, aumentó mucho en algunos casos.

El fármaco se utiliza sobre todo según la invención de manera profiláctica, para impedir la diseminación de las células tumorales a órganos secundarios o a la médula ósea.

El tratamiento según la invención comprende medidas tanto profilácticas como terapéuticas. El tratamiento sirve no sólo para la medicina humana, sino que también puede estar indicado en intervenciones quirúrgicas en diferentes mamíferos.

Por el término "tratamiento intraoperatorio" se entiende según la invención el tratamiento de pacientes con un tumor que garantiza un título de anticuerpo elevado durante la duración de una operación. En la práctica, la preparación de anticuerpo se administra sólo pocas horas antes, es decir directamente durante la preparación del paciente para la operación o durante la propia operación. El tratamiento se lleva a cabo 24 horas antes de la operación, preferentemente en el plazo de 8 horas, más preferentemente en el plazo de 4 horas, lo más preferentemente una hora antes de la intervención quirúrgica. Por consiguiente, el tratamiento intraoperatorio según la invención se diferencia de un tratamiento perioperatorio del estado de la técnica, que prevé un tratamiento de varias semanas y repetido del paciente antes de la operación, así como un periodo de tratamiento adicional tras la operación.

Según la invención se llevan a cabo intervenciones quirúrgicas para la resección tumoral parcial o completa de

tumores sólidos. El tejido tumoral se extirpa preferentemente con una técnica de operación "no touch" (sin tocar el tumor), para reducir de entrada el peligro de diseminación de células tumorales a la periferia.

5 Directamente antes o durante la intervención operatoria, el paciente con tumor recibe según la invención habitualmente una única dosis de una preparación de anticuerpo, para alcanzar un determinado contenido en suero. A partir de un contenido en inmunoglobulina específico de aproximadamente por lo menos 10, preferentemente por lo menos 50, lo más preferentemente más de 100 µg/ml de suero, se crea así una protección frente a una posible distribución de células tumorales al torrente sanguíneo. El título de anticuerpo está disponible prácticamente de manera inmediata tras un tratamiento intravenoso. Tratamientos sistémicos adicionales comprenden la administración intramuscular, subcutánea, intradérmica o mucosa, así como oral o nasal. Sin embargo, a este respecto debe contarse con una disponibilidad retardada. La preparación de anticuerpo puede administrarse también localmente, es decir al tejido tumoral y/o en la zona de herida tras la extirpación del tumor. También pueden combinarse de manera útil diferentes tipos de administración, por ejemplo una infusión i.v. poco antes de la operación, así como una dosis local directa aplicada en la zona de herida. Las formas de aplicación prácticas para la administración localizada comprenden, por ejemplo, aplicadores "listos para usar" acabados, por ejemplo catéteres, jeringuillas o pulverizadores, adecuados para la distribución de fármacos líquidos.

10 Precisamente en el caso de métodos de operación endoscópicos o microinvasivos, la aplicación local es ventajosa. Así, por ejemplo durante la biopsia, el fármaco se introduce preferentemente a través del canal de punción o en paralelo a través de jeringuillas o catéteres correspondientes.

15 Habitualmente mediante una biopsia se extraen pequeños tumores o una muestra de tejido tumoral. Basándose en el material de biopsia, un patólogo diagnostica entonces si el tejido procede de un tumor benigno o maligno. Los pacientes de los que se toma una biopsia no se someten en sí aún a ninguna terapia contra el cáncer. El paciente, según el estado de la técnica, no recibe un fármaco correspondiente a una enfermedad cancerosa hasta el resultado positivo. Por el contrario, según la invención, un paciente en riesgo obtiene ya el tratamiento profiláctico correspondiente para descartar una diseminación de células tumorales debido a la propia biopsia.

20 El fármaco utilizado según la invención es en sí mismo muy compatible y se administra al paciente con tumor habitualmente sólo una sola vez. Por tanto, la profilaxis también es conveniente cuando aún no se ha confirmado el riesgo de una enfermedad cancerosa y se lleva a cabo la intervención quirúrgica para la determinación acerca de la malignidad de un tumor. Además del diagnóstico habitual mediante el resultado patológico, según la invención existe además la posibilidad de determinar los inmunocomplejos generados y de este modo obtener un indicador de la malignidad del tumor. Esto presupone que el anticuerpo utilizado está dirigido contra un TAA que diferencia el tejido tumoral benigno del maligno.

25 En el caso de una enfermedad cancerosa, según la invención se obtienen inmunocomplejos con tejido tumoral o células tumorales que pueden determinarse no sólo en el tejido tumoral tras la resección tumoral, sino también en líquidos corporales periféricos. Así pueden examinarse cualitativa y/o cuantitativamente muestras de sangre o de suero del paciente tras el tratamiento para determinar inmunocomplejos. Los métodos de análisis son en sí métodos de análisis habituales con fraccionamiento y concentración de los inmunocomplejos y/o inmunorreacción con un anticuerpo específico, por ejemplo dirigido contra la parte Fc del anticuerpo utilizado para el tratamiento. Cuando el anticuerpo utilizado presenta estructuras murinas, éste también puede unirse con un anticuerpo anti-murino, en el sentido de una etapa de "captura". La detección de la unión tiene lugar habitualmente con un marcaje de anticuerpo correspondiente, por ejemplo con un marcador fluorescente o una reacción colorimétrica.

30 Se describe adicionalmente un kit para el tratamiento intraoperatorio de pacientes con un tumor, que contiene

- 35 a) un fármaco a base de un anticuerpo, dirigido contra un antígeno asociado con un tumor, y
- 40 b) un agente para la determinación diagnóstica de células tumorales malignas, que están inmunocomplejadas con el anticuerpo.

45 A este respecto, el anticuerpo del kit es preferentemente un anticuerpo nativo, es decir uno funcionalmente activo. Por tanto, este anticuerpo preferentemente no está dotado de un marcador u otro agente de detección, para no perjudicar la funcionalidad.

50 La utilización según la invención se lleva a cabo con anticuerpos que están dirigidos contra Lewis Y. Dado el caso se selecciona un TAA de células de tumores sólidos o una selección ("panel") de TAA, en particular TAA individuales del tumor del respectivo paciente. Pueden tratarse pacientes con tumores primarios del mismo modo que pacientes con tumores secundarios.

55 Por regla general debe partirse de la base de que por un antígeno, que imita un epítipo proteico de un TAA, debe entenderse un polipéptido de por lo menos cinco aminoácidos.

60 Entre epítipos descritos adicionales se encuentran epítipos de un antígeno humano escogidos del grupo de los

péptidos o proteínas, en particular EpCAM, NCAM, CEA y péptidos de células T, que se derivan preferentemente de antígenos asociados con un tumor, además los hidratos de carbono, en particular Lewis Y, sialil-Tn, GloboH y los glicolípidos, en particular GD2, GD3 y GM2. Los epítomos preferidos se derivan de antígenos que son específicos para tumores epiteliales y aparecen por ejemplo de manera aumentada en el caso de cáncer de mama, cáncer de estómago y de intestino, de próstata, de páncreas, de ovarios y de pulmón. Entre los epítomos preferidos se encuentran aquéllos que provocan sobre todo una respuesta inmunitaria humoral, es decir una formación de anticuerpos específica *in vivo*. El anticuerpo inmunógeno según la invención puede desencadenar preferentemente también una respuesta inmunitaria específica para células T, con lo que como reacción a la administración del anticuerpo no sólo se forman anticuerpos por ejemplo de la clase IgM, sino también de la clase IgG.

Alternativamente, también pueden seleccionarse como epítomos especialmente los antígenos que generan una respuesta inmunitaria específica para células T. Entre éstos pueden encontrarse sobre todo también estructuras intracelulares o péptidos de células T. Por ejemplo, un tratamiento intraoperatorio descrito adicionalmente puede utilizarse también para reducir el volumen de un derrame pleural, es decir una acumulación de líquido en la cavidad pleural. Los derrames pleurales aparecen con frecuencia en pacientes que padecen cáncer epitelial.

Epítomos proteicos descritos adicionales, que se expresan especialmente en células cancerosas de tumores sólidos, son por ejemplo TAG-72, MUC1, proteína de unión a folato A-33, CA125, HER-2/neu, receptores de EGF, PSA, MART, etc. (véase por ejemplo Sem. Cancer Biol. 6 (1995), 321). Adicionalmente, también pueden servir los denominados péptidos de epítomos de células T (Cancer Metastasis Rev. 18 (1999), 143; Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 442; Curr. Opin. Immunol. 8 (1996), 651).

Epítomos descritos adicionales se expresan por lo menos en un 20%, preferentemente por lo menos en un 30% de los casos de células tumorales de un determinado tipo de cáncer, más preferentemente en por lo menos un 40%, en particular en por lo menos un 50% de los pacientes.

Epítomos de hidrato de carbono descritos adicionales son estructuras de hidrato de carbono asociadas con un tumor, como los antígenos Lewis, por ejemplo estructuras de Lewis x, Lewis b y Lewis y, así como estructuras de Lewis x sializadas. Adicionalmente también estructuras de GloboH, KH1, antígeno Tn, antígeno TF, el epítomo de alfa-1-3-galactosilo son también estructuras de antígeno hidrato de carbono conocidas.

La diana para el anticuerpo utilizado según la invención es el antígeno Lewis Y. Se prefiere especialmente un anticuerpo humanizado, tal como se describe en el documento EP 0 528 767. Este anticuerpo reconoce el antígeno Lewis Y en células tumorales o receptores superficiales de células tumorales.

Se ha comprobado que los receptores superficiales de una célula tumoral con una glicosilación aberrante forman epítomos relevantes en el sentido de la invención, con lo que esta glicosilación puede bloquearse funcionalmente mediante anticuerpos. Esto se refiere no sólo a un determinado receptor superficial, como el receptor de EGF o el receptor de Her-2/neu. También se bloquean al mismo tiempo todos los receptores específicos de tumor que están caracterizados por la glicosilación aberrante. Entre ellos están por ejemplo todos los receptores de la familia de receptores de EGF, el receptor de CD55 (791Tgp72/DAF - factor acelerador de la degradación), el receptor de transferrina y la glicoproteína P. Con ello se ataca la célula tumoral basándose en diferentes mecanismos de acción.

También se ha comprobado que anticuerpos, que están dirigidos contra una glicosilación aberrante, se unen de manera funcional a varios receptores de la familia de los receptores de EGF y con ello puede bloquearse eficazmente la cascada de señales para la inducción del crecimiento celular. En la solicitud austriaca A 995/2002, n.º de publicación AT 413486, pudo mostrarse que en particular las isoformas erk1 y erk2 de la MAP cinasa pueden unirse funcionalmente mediante los anticuerpos utilizados según la invención. La unión de los factores de crecimiento a los receptores se impidió o redujo de este modo. Este tratamiento es más específico en comparación con la inmunoterapia con anticuerpos frente a la parte extracelular proteica del receptor de EGF, dado que las estructuras de hidrato de carbono asociadas con un tumor poco comunes están ausentes en receptores de EGF de células normales. Por otro lado, el tratamiento es más universal, dado que al mismo tiempo se bloquean diferentes receptores con la misma glicosilación aberrante.

Por consiguiente, mediante esta utilización según la invención se impide también la estimulación mitogénica de una célula cancerosa mediante EGF o herregulina. La unión específica de los anticuerpos a una glicosilación de Lewis Y de células cancerosas bloquea la interacción de los receptores de factores de crecimiento con sus ligandos fisiológicos e inhibe la transducción de señales mediante estos receptores y con ello el crecimiento celular.

Al mismo tiempo, un anticuerpo de este tipo puede atacar específicamente la célula tumoral mediante su acción dentro del sistema inmunitario humoral y celular. Las células tumorales, que expresan el receptor de EGF o receptores de la familiar del receptor de EGF, se unen específicamente según la invención y pueden lisarse.

El experto conoce procedimientos para encontrar estructuras de antígeno adecuadas, para la modelización y producción de los péptidos, polipéptidos o proteínas o ácidos nucleicos que codifican para los mismos, derivados de TAA, además lipoproteínas, glicolípidos, hidratos de carbono o lípidos, y pueden ponerse a disposición sin un

esfuerzo experimental desmedido para la respectiva estructura específica de tumor. Adicionalmente, se conocen los procedimientos para la producción de los anticuerpos específicos.

5 En una forma de realización especial se utiliza una mezcla de anticuerpos de diferentes anticuerpos con especificidad para TAA, en particular para por lo menos dos epítomos iguales o diferentes de una proteína de adhesión, por ejemplo de una proteína de membrana celular homófila, como EpCAM. A este respecto, la invención se refiere a una combinación de anticuerpos con especificidad para por lo menos un epítomo Lewis Y.

10 El anticuerpo relevante se utiliza según la invención principalmente para la inmunización pasiva, y en particular únicamente se administra una sola vez. Así, por ejemplo no se espera ningún efecto secundario particular, tampoco cuando el anticuerpo según la invención se deriva de una especie no humana, como por ejemplo un anticuerpo murino. Sin embargo, se espera que un anticuerpo recombinante, quimérico, así como uno combinado con componentes murinos y humanos, humanizado o humano sea especialmente compatible para la administración a seres humanos.

15 Por el término "anticuerpo" se entienden anticuerpos de todo tipo, en particular anticuerpos monoclonales monoespecíficos o poliespecíficos, o también anticuerpos producidos químicamente, bioquímicamente o mediante biología molecular, o anticuerpos policlonales con una determinada especificidad, por ejemplo un inmunosuero o una fracción de un inmunosuero.

20 El anticuerpo utilizado según la invención es habitualmente un anticuerpo nativo, que eventualmente puede aislarse de un organismo o paciente. Los anticuerpos nativos son glicoproteínas heterotetraméricas, que están compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas.

25 Sin embargo, también puede utilizarse un derivado de anticuerpo, preferentemente del grupo de los fragmentos y conjugados de anticuerpos, homólogos o derivados, pero también complejos con funciones efectoras adicionales. En cualquier caso, se prefiere que el derivado de anticuerpo contenga por lo menos partes del fragmento Fab, preferentemente junto con por lo menos partes del fragmento F(ab')₂, y/o partes de la región bisagra y/o de la parte Fc de un anticuerpo lambda o kappa.

30 Adicionalmente, también puede recurrirse a un derivado de anticuerpo de una cadena, por ejemplo un denominado anticuerpo "monocatenario" con funciones efectoras en el sentido de la invención. El anticuerpo según la invención es preferentemente del tipo de una inmunoglobulina, por ejemplo de una IgG, IgM, IgA o IgD.

35 Según la invención, el anticuerpo se une directamente a una célula tumoral o a metástasis o micrometástasis. Un inmunocomplejo formado de este modo del anticuerpo es condición previa para las actividades humorales y celulares del sistema inmunitario, expresadas mediante una función efectora de "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" (ADCC) y/o una de "citotoxicidad dependiente de complemento" (CDC). Estas funciones efectoras se determinan con pruebas convencionales.

40 Según la invención se prefieren anticuerpos con alta afinidad. En particular se utilizan anticuerpos que se unen con una afinidad de manera correspondiente a una constante de disociación por debajo de un valor K_d de 10⁻⁶ mol/l, preferentemente inferior a 10⁻⁷ mol/l, lo más preferentemente 10⁻⁸ mol/l o inferior.

45 Una posible finalidad de tratamiento es la unión y reducción eficaz de células tumorales, para impedir su diseminación en la medida de lo posible. Al mismo tiempo se atacan también en particular las células tumorales diseminadas. El número de células tumorales o de micrometástasis que pueden detectarse en la sangre, en la médula ósea o en órganos se reduce significativamente según la invención desde el punto de vista profiláctico y terapéutico. Se pretende de este modo retardar la formación de metástasis y por lo menos ralentizar su crecimiento.
50 Por tanto, mediante la inmunoterapia según la invención puede prolongarse el periodo de vida sin recidiva y con ello también el tiempo de supervivencia total de los pacientes. Un indicador del éxito del tratamiento es la reducción significativa de células tumorales en la sangre, en el suero o en la médula ósea.

55 El fármaco utilizado según la invención se encuentra ventajosamente en una formulación adecuada. Preferentemente, tales formulaciones son con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Éste comprende, por ejemplo, excipientes, tampones, sales y agentes conservantes. Preferentemente se pone a disposición una disolución para infusión acabada.

60 Después de que un anticuerpo sea relativamente estable, los fármacos a base de anticuerpos o sus derivados presentan la ventaja esencial de que pueden comercializarse como disolución estable en almacenamiento o formulación en una forma lista para usar ("ready-to-use"). Ésta es preferentemente estable en almacenamiento en su formulación a de temperaturas de frigorífico a temperatura ambiente. Sin embargo, el fármaco utilizado según la invención también puede ponerse a disposición en forma congelada o liofilizada, que en caso necesario puede descongelarse o reconstituirse.

65 La disolución de anticuerpo puesta a disposición puede como administrarse como inyección en bolo o también en

forma diluida por vía intravenosa. El fármaco puede producirse como preparación para infusión por ejemplo en una dilución de aproximadamente 1:10 a 1:100 con solución salina fisiológica.

5 Para la saturación de los antígenos superficiales relevantes de las células tumorales se administra habitualmente una dosis alta de por lo menos 50 mg, preferentemente por lo menos 100 mg, lo más preferentemente por lo menos 200 mg por paciente. La dosis máxima está limitada por la compatibilidad del anticuerpo y depende de su especificidad y avidéz. Los anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos son los más compatibles. Una dosis de hasta 1 g o en algunos casos de hasta 2 g por paciente y tratamiento puede ser absolutamente ventosa.

10 Habitualmente se sigue examinando al paciente tras la intervención quirúrgica, para dado el caso llevar a cabo un tratamiento contra el cáncer adecuado. Si tras la intervención quirúrgica se mostrase que el tumor presenta los TAA relevantes, puede seguir tratándose directamente con los mismos anticuerpos que se utilizaron de manera intraoperatoria y/o con otros anticuerpos inmunoterapéuticamente eficaces.

15 El tratamiento habitual para la inmunoterapia pasiva comprende repetidas infusiones a intervalos regulares, por ejemplo semanalmente durante un periodo de tiempo de 6-24 semanas, con una dosis en el intervalo de desde 1 hasta 10 mg/kg, preferentemente en el intervalo de desde 2 hasta 6 mg/kg. El tratamiento se repite preferentemente a determinados intervalos de tiempo, de manera correspondiente a la semivida del anticuerpo utilizado, que se encuentra habitualmente en el intervalo de desde 5 hasta 30 días. Mediante una derivatización particular del anticuerpo es posible prolongar la semivida hasta varios meses y de este modo prolongar los intervalos de tratamiento de manera correspondiente.

25 La concentración de la sustancia farmacológica depende de su compatibilidad. A este respecto, puede administrarse directamente al paciente una preparación especialmente compatible a base de un anticuerpo humanizado en una alta concentración sin dilución adicional. Mediante la concentración preferida en el intervalo de desde el 0,1% hasta el 10%, preferentemente del 1%-5%, es posible mantener reducidos el volumen administrado y el tiempo de infusión correspondiente.

30 La combinación con métodos de tratamiento adyuvantes conocidos es absolutamente habitual. Entre ellos se encuentran agentes para la radioterapia o quimioterapia, tales como la monoterapia o la politerapia. Debido a los diferentes mecanismos de acción, la inmunoterapia se combina preferentemente con la poli-quimioterapia. Agentes utilizados preferentemente para la quimioterapia son preparaciones farmacéuticas alquilantes. Así, se prefieren por ejemplo agentes que contienen taxano, antraciclina o platino. Todas las preparaciones habituales que pueden utilizarse para los diferentes tratamientos contra el cáncer pueden combinarse según la invención. Los agentes quimioterápicos se administran habitualmente por vía intravenosa o por vía oral. Las formas de administración por vía oral de los agentes quimioterápicos pueden administrarse eventualmente también con una forma oral para la inmunoterapia según la invención como preparación de combinación.

40 A continuación se describe a modo de ejemplo la preparación de un fármaco producido según la invención así como su aplicación intraoperatoria. Los siguientes ejemplos y figuras pretenden explicar adicionalmente la presente invención, pero no limitarla:

45 La figura 1 muestra la inhibición del crecimiento del xenoinjerto mediante IGN311 y ABL364 tras la inoculación con 1×10^6 células A431 en ratones.

La figura 2 muestra la inhibición del crecimiento del xenoinjerto mediante IGN311 tras la inoculación con 3×10^6 células A431 en ratones. El tratamiento con los anticuerpos tuvo lugar en el plazo de un día tras la diseminación de las células tumorales.

50 La figura 3 muestra los pesos del tumor sin y con tratamiento mediante IGN311 y ABL364.

La figura 4 muestra la reducción de las células positivas para EpCAM en circulación en sangre tras el tratamiento con un Acm anti-IgG2a murino con propiedades que imitan las de EpCAM.

55 Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de un anticuerpo anti-Lewis Y IGN311:

60 IGN311 es un anticuerpo humanizado, derivado del anticuerpo anti-IgG3 murino BR55-2. Este anticuerpo murino procede de la línea celular de hibridoma BR55-2 (BR55-2/IgG3), que se depositó el 17/2/1987 en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville MD 20852, EE.UU. bajo ATCC HB 9324.

65 En anticuerpo humanizado se produjo mediante injerto de CDR (Cancer Research 56, 118-1125, 1 de marzo de 1996). Como región constante de la cadena pesada se recurrió a IgG1 humana. La humanización se realizó según el documento EP 0 528 767. El anticuerpo se produjo en células SP2/0.

El IGN311 obtenido demostró ser muy activo: el complemento humano se activó con una CDC aumentada aproximadamente 10 veces con respecto al anticuerpo murino, para lisar células tumorales positivas para Lewis Y. Se estudió la actividad del IGN311 frente a una selección de líneas celulares tumorales humanas positivas para Lewis Y en presencia de complemento humano (CDC) (SKBR5, cáncer de mama, SW948, cáncer de colon; SW2, cáncer de pulmón de células pequeñas; y MCF7, cáncer de mama). Se estudió asimismo la ADCC frente a una determinada selección de líneas celulares tumorales. La afinidad de unión permaneció aproximadamente igual también tras la humanización.

Se formuló el producto en solución salina tamponada con fosfato y se envasó a una concentración de 10 mg/ml. Esta disolución madre se diluye antes de su empleo en función de la utilización. Para el producto i.v. se diluye la disolución 1:50 con solución salina fisiológica. En caso de que se aplique la preparación localmente en la zona de herida, la preparación se utiliza sin diluir.

Aplicación durante la resección tumoral

Se preparan pacientes con cáncer de intestino diagnosticado para la extirpación operatoria del tumor. Antes del tratamiento se extrae una muestra de sangre. El tratamiento con el producto i.v. tiene lugar directamente antes de la operación a lo largo de un periodo de tiempo de 2 horas. La dosis administrada ascendió a 50 mg. Después se extirpa el tumor en el plazo de 4 horas.

Se extraen muestras de sangre directamente tras la inducción de la anestesia, tras la resección tumoral y 24 horas tras la operación. Se concentran las células tumorales de las muestras de sangre recientes, se colocan sobre portaobjetos y se almacenan hasta el análisis inmunocitoquímico a -20°C.

Se prepara una muestra del tejido tumoral retirado para el estudio inmunohistoquímico.

Determinación de tumor y células tumorales

Se recomienda una determinación inmunohistoquímica de antígeno Lewis Y para el tejido tumoral extirpado de manera operatoria. Para la determinación histológica del antígeno Lewis Y se incuba tejido desparafinado con el anticuerpo murino BR55-2 y a continuación con un anticuerpo de cabra biotinilado anti-IgG de ratón (Vector Laboratories). Se bloquean los puntos de unión no específica con suero de cabra normal. Para la determinación del inmunocomplejo se añade peroxidasa del rábano-estreptavidina (1:325 en solución salina fisiológica tamponada con fosfato) y se lleva a cabo una tinción. (Véase a este respecto J.E. Beesley; capítulo 2.5.: Avidin-biotin methods in Immunocytochemistry editado por Oxford Univ. Press, 1993).

Las células tumorales diseminadas se determinan a partir de las muestras de sangre de la siguiente manera.

1. Concentración de células tumorales:

Se centrifugaron 25 ml de sangre periférica a 1600 x g 20 min a 4°C en un tubo OncoQuick® (Greiner bio-one, Altmünster, Austria). La fase que contiene células tumorales se pasó a un tubo de centrifugación adicional y se obtuvo un sedimento celular mediante centrifugación. Se resuspendió este sedimento. Se centrifugó la fracción celular de la suspensión sobre un portaobjetos para estudio microscópico. Se almacenó el portaobjetos a -20°C hasta su evaluación.

2. Determinación de células tumorales

Sobre el portaobjetos con las células tumorales aisladas y concentradas se aplicó una disolución con anticuerpos específicos marcados con fluorescencia. Tras un tiempo de incubación de 30 min se hicieron visibles las células tumorales marcadas por la unión de anticuerpo bajo el microscopio de fluorescencia (Axioplan Zeiss, Jena, Alemania) y se contaron. Entonces se calculó el contenido en células tumorales en sangre de manera correspondiente al factor de concentración. Se validó el método con suspensiones de células tumorales patrón.

Como anticuerpos específicos marcados se utilizan por ejemplo IGN311 (anticuerpo anti-Lewis Y) y anticuerpo anti-citoqueratina A45-B/B3: (200 µg/ml, Micromet, Martinsried, Alemania), ambos conjugados con proteínas fluorescentes.

Ejemplo 2: Inhibición del crecimiento tumoral mediante anticuerpos frente a Lewis Y en modelos de xenoinjerto en ratones desnudos

El anticuerpo IGN311 (IgG1 humanizado, por ejemplo según el documento EP0 528 767) o su precursor murino ABL364 (IgG3, documento EP 0 547 079) reconocen el antígeno Lewis Y, un resto de lactosamina-glicósido difucosilado sobre moléculas superficiales. En algunas células, en particular en células tumorales, también se modifican receptores para factores de crecimiento con antígeno Lewis Y. Esto es aplicable también para la familia de los receptores de EGF (erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, véase el documento A995/2002). Por tanto, se pretende

estudiar con líneas celulares tumorales humanas correspondientes (A431), si IGN311 también suprime *in vivo* en un modelo de xenoinjerto el desarrollo de tumores, inhibe el crecimiento de un tumor existente e impide una enfermedad diseminada. Mediante la comparación del precursor murino ABL364 con IGN311 pretende comprobarse también, si la fijación de componentes de complemento desempeña un papel en la eliminación de las células tumorales.

El objetivo es, entre otras cosas, aportar la comprobación experimental de una eficacia de IGN311 en modelos de tumor epitelial. Con ello se consigue una condición previa para la aplicación de IGN311 en la terapia de enfermedades en seres humanos.

Material y métodos:

Material:

El suero bovino fetal procede de PAA Laboratories (Linz, Austria), el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, RPMI-1640), los aminoácidos no esenciales, el β-mercaptoetanol proceden de GIBCOBRL (Grand Island, NY). La línea celular A431 se adquirió de ATCC (Manassas, VA). La L-glutamina, penicilina G y estreptomycin proceden de Sigma Chemical Co.

Cultivo celular: se cultivaron células A431 (línea celular de cáncer epidérmico humano de carcinoma de vulva) medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino al 10%, L-glutamina 4 mM, penicilina G 100 unidades/ml y estreptomycin 100 µg/ml al 5% de CO₂ y a 37°C. Se cultivaron células SKBR3 (de cáncer de mama humano) en medio RPMI-1640 al 5% de CO₂ y a 37°C, mezclándose el medio con suero bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina G 100 unidades/ml y estreptomycin 100 µg/ml.

Mantenimiento de los animales, inoculación de xenoinjerto: se utilizan hembras de ratón BALB/C nu/nu de 5-6 semanas de edad libres de patógenos para el ejemplo (fuente: Versuchstierzucht Himberg). El peso de los animales asciende a 18-20 g.

Los ratones BALB/c (nu/nu) deben mantenerse debido a su debilidad inmunitaria en condiciones libres de patógenos en jaulas con filtro especiales (jaulas Seal-Safe-IVC, Techniplast, Múnich). Se someten a autoclave jaulas con paja, agua para beber y pienso. Las manipulaciones en los animales de ensayo tienen lugar en un banco de trabajo estéril. Se comprueban las líneas celulares inyectadas para determinar la contaminación por micoplasmas (para lo que hay disponible un kit de PCR). Se añaden sobrenadantes de cultivo de células A431 a modo de prueba al azar a estos cultivos celulares murinos y se comprueba un efecto citopático; cuando éste aparece se valora como indicación de la existencia de una contaminación viral. Como es natural, estas células no se administran a los ratones desnudos antes de haber eliminado el problema de la contaminación viral.

Generación de diferentes tumores en ratones desnudos

En cada caso en 6 ratones por grupo se inyectan ~5*10⁶ células tumorales por vía subcutánea (s.c.) en la zona del flanco izquierdo: para ello se resuspenden las células A431 en 200 µl de solución salina tamponada con fosfato; tras como máximo 6 semanas se sacrifican los ratones por medio de dislocación vertical y se evalúan.

La administración de los anticuerpos tiene lugar mediante inyección intraperitoneal (2 veces a la semana). La primera administración tiene lugar al día siguiente, es decir aproximadamente 21 horas (como máximo 24 horas) tras la aplicación de las células tumorales.

Se tratan los animales con IGN311 a lo largo de 4 semanas. Después se examinan los órganos internos (en particular el pulmón) para determinar la formación de metástasis. La cuantificación tiene lugar mediante recuento de las lesiones visibles.

Análisis de los datos

El parámetro de medición es el tamaño del tumor; éste se determina a través del peso del tumor (= al final) y se calcula asimismo a partir de las dimensiones (2 veces a la semana); esto último tiene lugar basándose en la medición del diámetro longitudinal y transversal (más grande) y el grosor según la fórmula para el volumen de un elipsoide (12): Volumen = Longitud * Anchura * Altura*π/6 o en tumores pequeños, cuyo grosor no puede determinarse de manera segura: Volumen = Longitud * Anchura² * π/6. Alternativamente se establece el peso de los tumores.

Resultados:

Al inicio se realizó un estudio de titulación para determinar el número de las células tumorales que son necesarias para la inoculación. El intervalo se encontraba entre 0,5-5x10⁶ células. Se obtuvieron tumores con las células A431.

Se inocularon 4 ratones/grupo con 1×10^6 células A431, la administración de los anticuerpos tuvo lugar al día siguiente con una cantidad de 10 mg/kg de IGN311 o ABL364.

5 La figura 1 muestra la inhibición del crecimiento del xenoinjerto tumoral mediante IGN311 y ABL364. La administración de los anticuerpos se inició en el plazo de un día tras la aplicación subcutánea de células tumorales.

En el día 25 se sacrificaron los animales, se extirpó la masa tumoral y se determinó el peso.

10 En una serie de ensayos adicional se inocularon 3×10^6 células tumorales, lo que condujo a una rápida formación de tumores. En este caso se sometió a prueba si un aumento de la dosis de IGN311 desde 10 mg/kg hasta 30 mg/kg conducía a una inhibición adicional del crecimiento. Como resulta evidente a partir de la figura 2, IGN311 muestra también un efecto inhibitor a una dosis aumentada.

15 La determinación del volumen tumoral resultó ser difícil, dado que los tumores no crecieron como cuerpos elipsoides. Por tanto, se sacrificaron los animales en el día 16 y se determinó el peso de la masa tumoral. Los resultados pueden extraerse de la figura 3.

20 Basándose en los datos obtenidos puede establecerse que, en este modelo de xenoinjerto, IGN311 muestra una actividad antitumoral significativa *in vivo* y el efecto del IGN311 no se ve aumentado drásticamente por un aumento de la dosis desde 10 mg/kg hasta 30 mg/kg.

25 En un enfoque de ensayo alternativo, la comprobación de la inhibición del crecimiento tumoral o de la diseminación de las células tumorales mediante el anticuerpo tiene lugar porque los anticuerpos se administran en el plazo de como máximo 24 horas antes de la aplicación de las células tumorales por vía subcutánea o por vía intravenosa. Las células tumorales pueden aplicarse de nuevo por vía subcutánea, por vía intravenosa o directamente al pulmón de los animales de ensayo.

30 Se determina el crecimiento tumoral en los animales vivos a través de la medición del tamaño del tumor; tras varios días o semanas se sacrifican los animales mediante dislocación cervical y se determina el tamaño del tumor. Adicionalmente, se extraen los órganos y se examinan por medio de diferentes procedimientos para determinar micrometástasis y otras modificaciones condicionadas por tumor.

35 **Ejemplo 3: Comprobación de la reducción de células EpCAM en circulación en la sangre**

Pacientes, material y métodos:

40 Para la vacunación se utilizó un Acm anti-IgG2a murino, con propiedades de imitación de EpCAM. Se administró por vía subcutánea el anticuerpo a una cantidad de 0,5 mg de Acm adsorbido sobre 1,67 mg de hidróxido de aluminio en 0,5 ml de tampón.

45 Como sujetos de prueba se seleccionaron pacientes que padecían cáncer (mayores de 19 años), en los que no pudo obtenerse ningún resultado satisfactorio mediante la terapia convencional. El tratamiento tuvo lugar con 0,5 mg de anticuerpo, por vía subcutánea los días 1, 15, 29, 57.

Análisis de células tumorales en circulación en sangre periférica:

50 Se extrajeron 5 ml de sangre heparinizada los días 1, 29 y 71. Tras una lisis eritrocitaria suave se incubó el líquido restante con anticuerpo anti-EpCAM paramagnético y se separaron las células en una columna magnética (Miltenyi). Tras la elución se marcaron las células unidas con anticuerpo anti-EpCAM-FITC y se analizaron o se contaron en un microscopio de fluorescencia de inversión.

55 Los resultados pueden extraerse de la figura 4, en la que puede observarse claramente la reducción de las células EpCAM en circulación en sangre.

Ejemplo 4: Administración del IGN311 a pacientes con derrame pleural

60 En un estudio clínico se les administran a pacientes (de 18 a 80 años), que padecen cáncer y presentan un derrame pleural, 100 mg de IGN311 en una administración única por vía intravenosa como máximo 24 horas antes de la eliminación del derrame.

65 Se determinan tanto el volumen del líquido pleural, que se evacúa a través del drenaje, como la existencia de células tumorales positivas para Lewis y. La actividad biológica del IGN311 en la efusión pleural puede tener lugar mediante determinación de la CDC. Adicionalmente puede determinarse si el tiempo hasta que puede realizarse la pleurodesis, es decir hasta que se ha evacuado el líquido pleural, puede acortarse mediante la administración del anticuerpo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una preparación a base de un anticuerpo dirigido contra un Lewis Y para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento intraoperatorio de pacientes con un tumor mediante inmunocomplejación de células tumorales en el marco de intervenciones quirúrgicas, en la que se utiliza la preparación para el tratamiento profiláctico para impedir la diseminación de células tumorales, y en la que la célula tumoral es una célula tumoral epitelial, y en la que el fármaco se administra directamente durante la intervención quirúrgica o en el plazo de 24 horas antes de la intervención quirúrgica.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que el anticuerpo se utiliza en una mezcla de anticuerpos de diferentes anticuerpos con especificidad para antígenos asociados con un tumor.
- 15 3. Utilización según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que el anticuerpo activa funcionalmente el sistema inmunitario, de manera correspondiente a una función efectora ADCC y CDC.
- 20 4. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que el anticuerpo se une a Lewis Y con una afinidad correspondiente a una constante de disociación por debajo de un valor K_d de 10^{-6} mol/l, preferentemente inferior a 10^{-7} mol/l, lo más preferentemente 10^{-8} mol/l o inferior.
- 25 5. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que el anticuerpo se deriva de fuentes murinas, quiméricas, humanizadas y/o humanas.
6. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que el fármaco se utiliza sistémicamente con una dosis única de por lo menos 50 mg, preferentemente por lo menos 100 mg, lo más preferentemente por lo menos 200 mg, hasta 2 g por paciente.
- 30 7. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que el fármaco se aplica localmente al tejido tumoral y/o a la zona de la herida.
- 35 8. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que el fármaco se administra dentro del plazo de 4 horas antes de la intervención quirúrgica.
9. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada por que la intervención quirúrgica se lleva a cabo para la biopsia y/o extirpación de un tumor sólido.
- 40 10. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada por que la intervención quirúrgica se lleva a cabo para determinar la malignidad de un tumor.
11. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada por que el anticuerpo se determina tras la intervención quirúrgica en el tejido tumoral inmunocomplejado.
12. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada por que el anticuerpo se determina en células tumorales en muestras de sangre o suero.
- 45 13. Preparación a base de un anticuerpo dirigido contra un Lewis Y para su utilización en un tratamiento intraoperatorio de pacientes con un tumor mediante inmunocomplejación de células tumorales en el marco de intervenciones quirúrgicas, en la que la preparación se utiliza para el tratamiento profiláctico para evitar la diseminación de células tumorales, y en la que la célula tumoral es una célula tumoral epitelial, y en la que el fármaco se administra directamente durante o 24 horas antes de la intervención quirúrgica.
- 50 14. Preparación para su utilización según la reivindicación 13, en la que la utilización está definida asimismo como en una de las reivindicaciones 2 a 12.

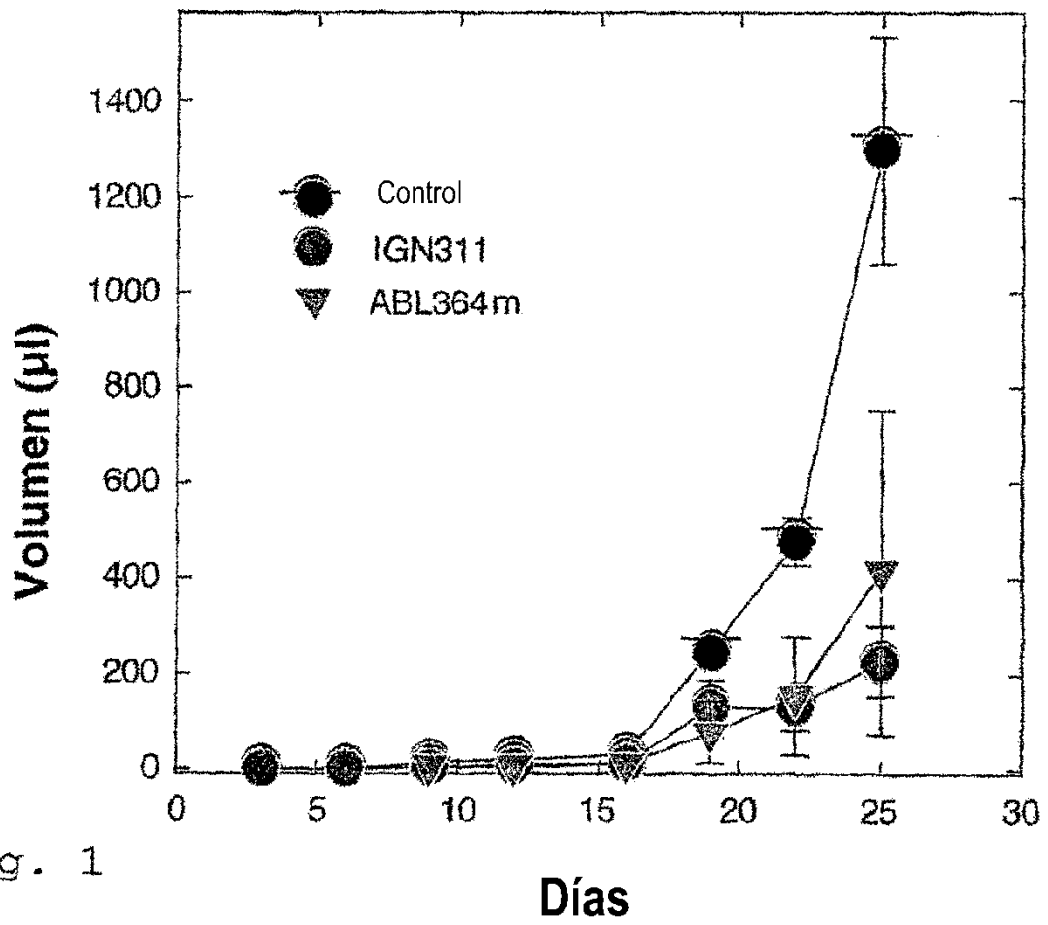


Fig. 1

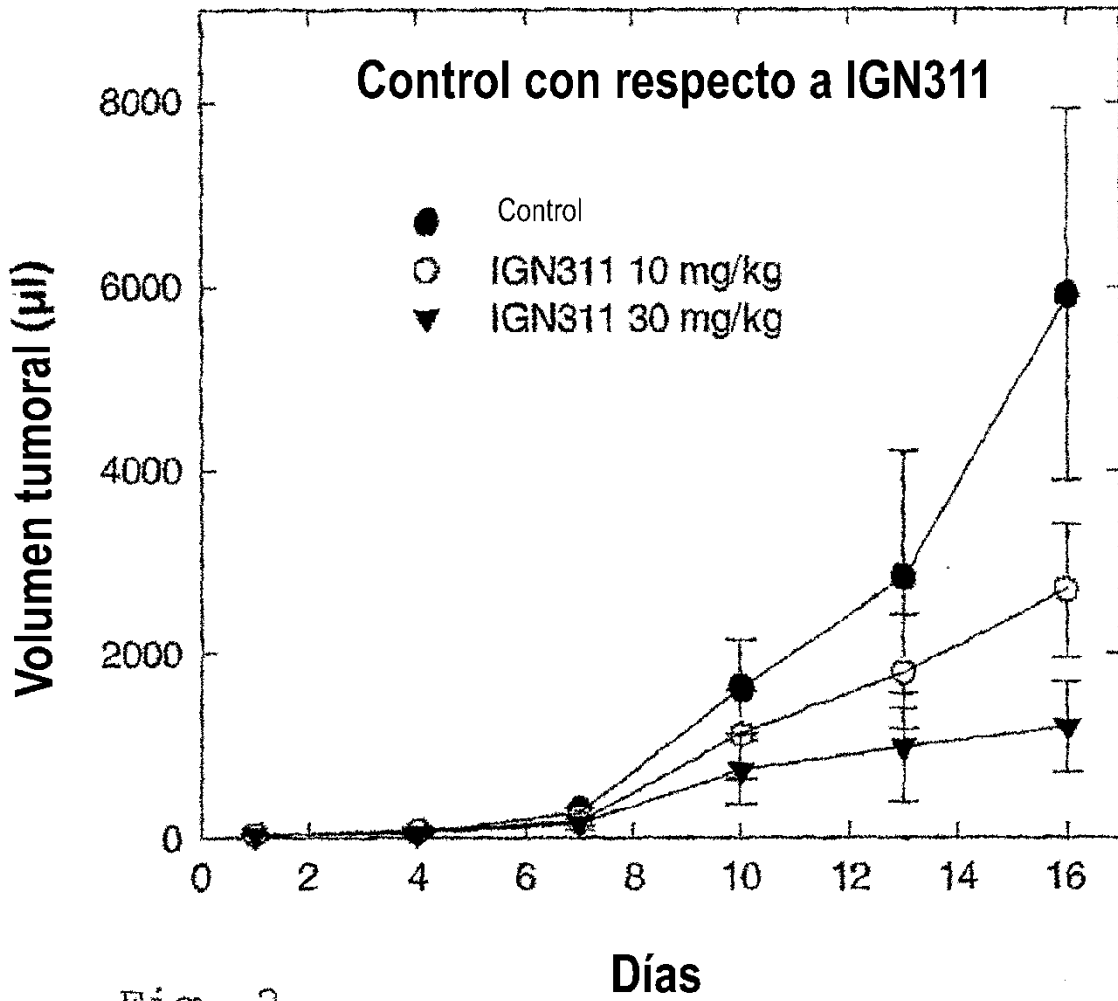


Fig. 2

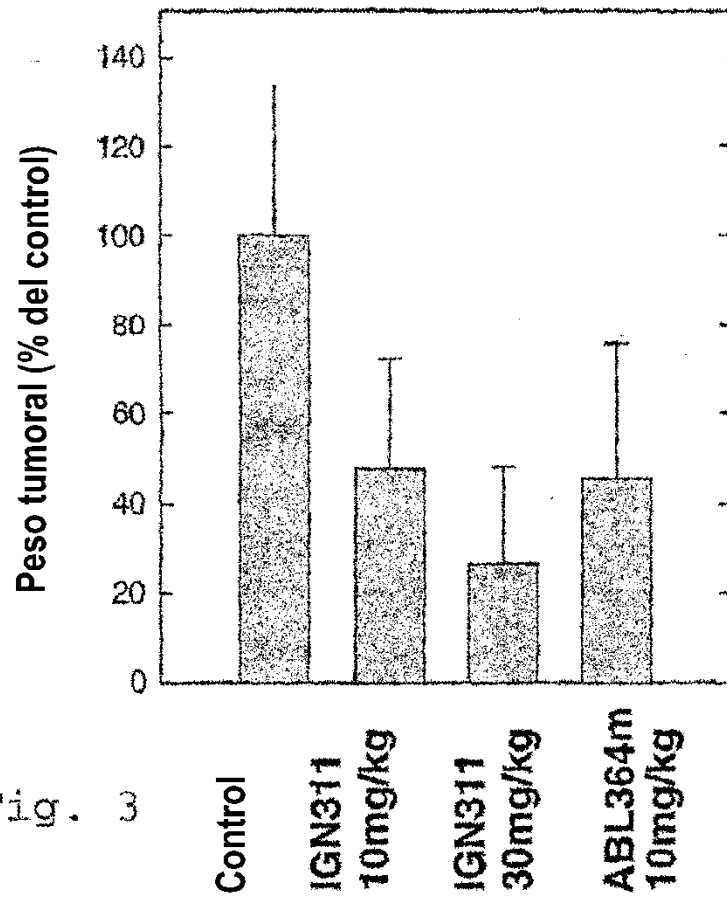


Fig. 3

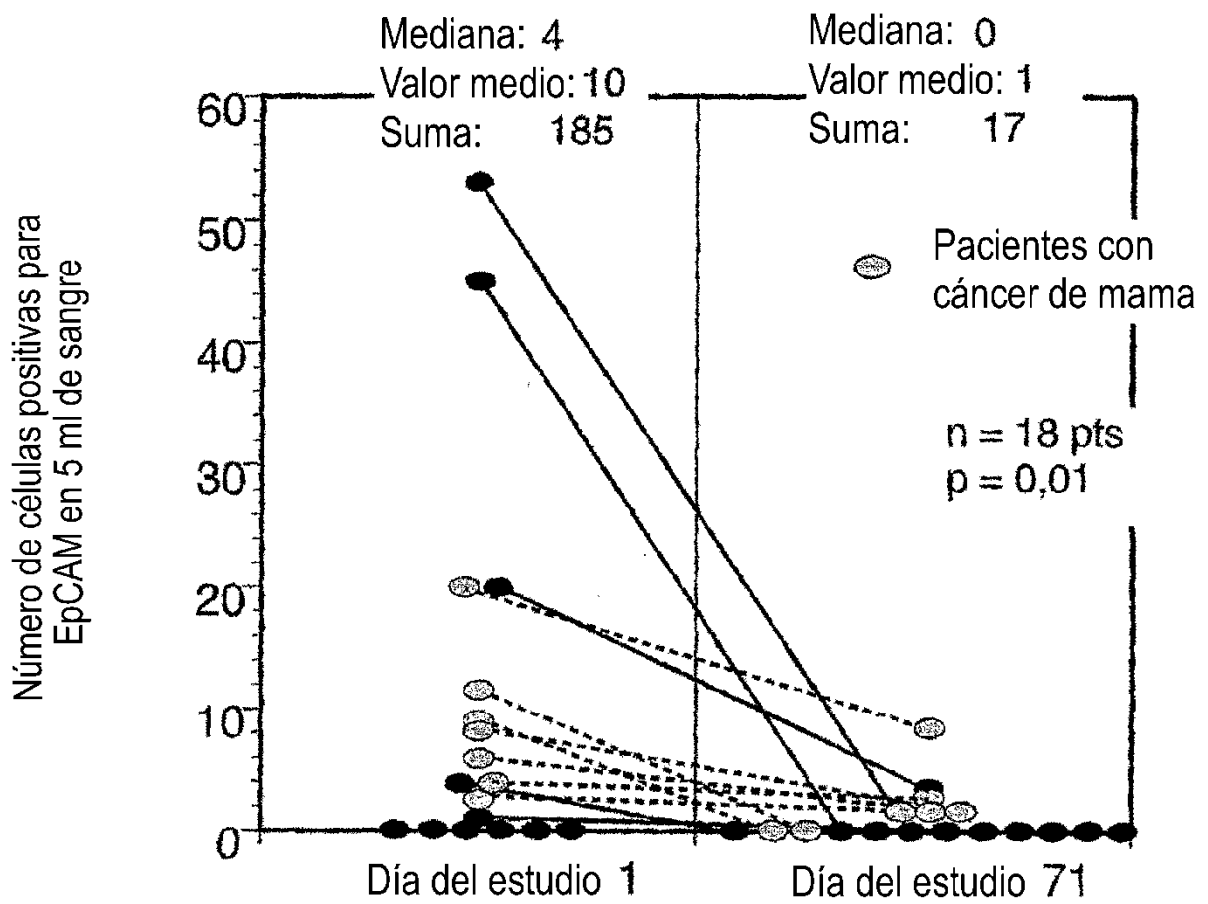


Fig. 4