

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 630**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 35/18</b>	(2015.01)
<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/30</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/46</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/078</b>	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2012 PCT/EP2012/069584**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050445**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2012 E 12766999 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2903640**

54 Título: **Eliminación de células tumorales de la recuperación de sangre autóloga intraoperatoria**

30 Prioridad:

**04.10.2011 EP 11183851**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.10.2019**

73 Titular/es:

**LINDIS BLOOD CARE GMBH (100.0%)  
Stolzingstrasse 54  
13465 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**LINDHOFER, HORST;  
STROEHLEIN, MICHAEL y  
HEISS, MARKUS**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 727 630 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**

Eliminación de células tumorales de la recuperación de sangre autóloga intraoperatoria

**5 Campo de la invención**

**[0001]** La invención se refiere a un procedimiento que se realiza ex vivo para la eliminación de células tumorales de la recuperación de sangre recolectada intraoperatoriamente, al uso de dicho procedimiento ex vivo para la eliminación de células tumorales de la recuperación de sangre recolectada intraoperatoriamente, seguido por la reintroducción de dicha recuperación de sangre purificada obtenida o de las concentraciones de eritrocitos purificadas mediante dicho procedimiento en un paciente de quien se obtuvo dicha sangre recolectada intraoperatoriamente.

**Antecedentes de la invención**

**[0002]** Desde la epidemia del SIDA a principios de los años 1980, el interés en las alternativas a las transfusiones de sangre alogénicas ha crecido, en particular para la cirugía electiva. Una alternativa que actualmente representa más del 5 % de la sangre donada en los Estados Unidos y algunos países de Europa es la transfusión autóloga, obtenida principalmente mediante la donación preoperatoria. Además de la donación de sangre preoperatoria, la recuperación de sangre intraoperatoria (RSI) (Tabla 1) del campo quirúrgico representa una opción importante para la cobertura de las demandas de transfusión. A lo largo de este procedimiento de RSI, se recolecta la sangre que un paciente pierde en el quirófano y después se la limpia y pone a disposición para su reinfusión a ese paciente.

**[0003]** En pocas palabras, la sangre eliminada en el campo quirúrgico es aspirada de este sitio hacia un contenedor especialmente diseñado. Se le añade un anticoagulante de citratos o heparina y los contenidos son centrifugados y/o filtrados para eliminar los leucocitos, coágulos y desechos. Los dispositivos de RSI usados pueden variar entre simples y económicos frascos estériles llenos de anticoagulantes hasta sofisticados y costosos dispositivos de lavado de células de alta velocidad (por ejemplo, Medtronic Sequestra 1000, Cobre BRAT 2, Medtronic Autolog, Haemonetics Cell Saver-5 ® y Fresenius CATS®; Bentzien y col., *Anaesthesist* 49: 505, 2000; Serrick y col., *J. Extra Corpor. Technol.* 35(1): 28, 2003; Carless y col., *The Cochrane Review*, En: *The Cochrane Library*, John Wiley & Sons, Ltd., 3ra edición, páginas 1-180, 2010). Usado en cerca de un millón de cirugías cada año en los EE.UU., el procedimiento de RSI se ha convertido en una parte integral de los programas de manejo y conservación de sangre en los hospitales.

**Tabla 1. Puntos de referencia de la recuperación de sangre intraoperatoria en la cirugía de cáncer**

Recuperación de sangre eficiente	Liberación de recursos sanguíneos
Compatibilidad	Suministro de sangre
Rápida disponibilidad	Terapia óptima para la pérdida de sangre
Rentabilidad	Aplicación dependiente de la pérdida de sangre
Ausencia de exceso de transfusión sanguínea	Después de al menos 1 l de pérdida de sangre
Menos deficiencias en la transfusión sanguínea	Eficacia mejorada de la quimioterapia/radioterapia
Alta calidad de la sangre	Eritrocitos lavados y frescos
Aumento de seguridad	Reducción de los riesgos de la transfusión (por ejemplo, infección, error de transfusión, difíciles pruebas de histocompatibilidad cruzada)
Ausencia de la necesidad de una predonación autóloga	Reducción del costo de unidades desperdiciadas
	Más práctico para los médicos clínicos

**[0004]** Además del aumento de incidencia de la anemia preoperatoria, la donación sanguínea previa a la cirugía genera serias preguntas económicas adicionales debido a las altas tasas de transfusión en general (Carless y col., *Transfus. Med.* 14: 123, 2004). Además, alrededor del 30 % de las donaciones de sangre autólogas preoperatorias deben descartarse en Italia porque los productos sanguíneos autólogos no requeridos se excluyen de las transfusiones de sangre alogénicas *per se* según las pautas reglamentarias. En cuanto a esto, la RSI y la posterior autotransfusión generalmente representan medidas seguras y más costo-efectivas en el manejo de sangre.

**45 Ventajas de la recuperación de sangre intraoperatoria**

5 **[0005]** En contraste con las transfusiones de glóbulos rojos alogénicas, la RSI es considerada como una alternativa segura y eficaz. Resulta importante que, más allá del excelente diagnóstico viral, el riesgo de transferir una infección por VIH es de 1 en 493.000 transfusiones de sangre alogénicas; el riesgo de transferir una infección por el virus de la hepatitis C es de 1 por 103.000; y el riesgo de transmitir una infección por el virus de la hepatitis B es de 1 en 63.000 (Schreiber y col., N. Engl. J. Med. 334: 1685, 1996). Los resultados de un estudio titulado "Los peligros graves de las transfusiones" (*Serious Hazards of Transfusions*) realizado entre 1996 y 2001 documentaron estos riesgos de las incidencias de las transfusiones alogénicas (Dzik y col., Transfusion 43: 1190, 2003). Sorprendentemente, la transmisión de enfermedades infecciosas por medio de transfusiones de sangre contaminada parece ser un riesgo menor en comparación con los enormes riesgos de la sangre incompatible con ABO debido a la

10 falla administrativa o humana a lo largo del procedimiento de transfusión y donación de sangre (Sazama, Transfusion 30: 583, 1990; Dzik y col., Transfusion 43: 1190, 2003). Más del 70 % de las incidencias de transfusión podrían atribuirse a componentes de sangre incorrectos transfundidos principalmente como resultado de fallas administrativas y errores en las muestras, prescripciones y recolección de componentes (Dzik y col., Transfusion 43: 1190, 2003). La autotransfusión pre e intraoperatoria de glóbulos rojos evita *per se* estos riesgos inherentes de la transfusión de sangre alogénica. En general, las técnicas de recuperación de sangre autóloga ofrecen ventajas pero no requieren de

15 infusiones de cristaloides o coloides a fin de preservar el volumen sanguíneo (Tabla 1). Es posible recuperar muchos litros de sangre intraoperatoriamente durante un gran sangrado, muchos más que con otras técnicas autólogas.

#### 20 **Idoneidad de los pacientes para la RSI**

**[0006]** La recuperación de sangre intraoperatoria lleva disponible más de 25 años. Se usa ampliamente en la cirugía cardiotorácica, vascular y de traumatismos, así como en el trasplante de hígado. Las contraindicaciones de su uso son las infecciones bacterianas y las células tumorales probablemente eliminadas dentro de la sangre del campo quirúrgico, y el uso de colágeno microfibrilar u otro material extraño en el sitio de operación. En la actualidad, debido

25 a la escasez de donantes de sangre y los miedos de infecciones transmitidas, el uso de la RSI también gana un gran interés en la cirugía de cáncer con altas pérdidas de sangre. La reticencia de los cirujanos al uso de la autotransfusión en la cirugía de cáncer ha decrecido, ya que los informes no hallaron ningún incremento en la recurrencia local o enfermedad metastásica en la comparación con los datos estándares de supervivencia (Klimberg y col. Arch. Surg. 212: 1326, 1986; Perseghin y col., Vox Sang. 72: 221, 1997). Según la reseña de Vanderlinde y col. (BMJ 324: 772,

30 2002) las autotransfusiones de glóbulos rojos recolectadas de las donaciones de sangre preoperatoria podrían llevar significativamente a incidencias de infección y recurrencia reducidas durante la cirugía de cáncer colorrectal, en comparación con las transfusiones alogénicas (Tabla 2). Algunos de estos ensayos clínicos revisados son incluso más importantes, ya que las cirugías colorrectales han sido excluidas *per se* de las recomendaciones de la RSI debido al riesgo inherente de la transmisión de infecciones bacterianas.

35

**Tabla 2. Resultado clínico de ensayos aleatorizados de transfusión autóloga versus alogénica \*  
% de casos que desarrollaron complicaciones después de la transfusión**

Estudio	Nº. de pacientes	Tipo de cirugía	Intervención	Tipo de complicación	Valor P para la reducción en complicaciones posoperatorias		
					Autóloga	Alogénica	
Busch y col., 1993 <sup>9</sup>	423	Colorrectal	Donación autóloga predeposición	Infección	27	25	NS
N. Engl. J. Med. 328: 1372, 1993				Recurrencia	37	34	NS
Heiss y col., 1993 y 1994 <sup>10,14</sup>	120	Colorrectal					
Lancet 342: 1328, 1993							
J. Clin. Oncol. 12: 1859, 1994				Recurrencia	17	29	0,11
Newman y col., 1997 <sup>11</sup>	70	Artroplastia de rodilla	Recuperación autóloga posoperatoria	Infección	6	34	<0,05
J. Bone Joint Surg. Br. 79: 630, 1997							
Farrer y col., 1997 <sup>12</sup>	50	Vascular	Recuperación autóloga intraoperatoria	Infección	13	44	0,029
J. Vase. Nurs. 15: 111, 1997							
Thomas y col., 2001 <sup>13</sup>	231	Artroplastia de rodilla	Recuperación autóloga posoperatoria	Infección	ND	ND	0,036
Br. J. Anaesth 86: 669, 2001				Reingreso	ND	ND	0,008

NS= no significativo.

ND= no disponible (es decir, no informado).

\* La tabla fue extraída de Vanderlinde y col., BMJ 324: 772, 2002.

**[0007]** Sin embargo, un estudio mostró con claridad que las células tumorales podían detectarse en el campo quirúrgico, aunque su impacto en la recurrencia del cáncer permanecía poco claro (Hansen y col., Arch. Surg. 130: 387, 1995). Por ejemplo, se comparó el número de células tumorales en la sangre periférica y la RSI de 61 pacientes con cirugía de cáncer de un tumor maligno abdominal, ortopédico, urológico, ginecológico o de cabeza y cuello. En 5 de 61 de pacientes, se detectaron células tumorales en la sangre eliminada durante la cirugía oncológica. Estas células tumorales fueron identificadas por la capacidad de proliferación, invasividad y tumorigenicidad con una sensibilidad de 10 células tumorales por 500 ml de sangre (Hansen y col., Arch. Surg. 130: 387, 1995). De modo interesante, el número de células tumorales en la sangre eliminada no era correlativa a la cantidad de sangre perdida y solo en 26 % de estos pacientes fue posible detectar células tumorales circulantes en la sangre periférica. Por lo tanto, se estima que el número de células tumorales en la sangre eliminada en el campo quirúrgico podría variar de 10 a 10<sup>7</sup>. Estos resultados también fueron independientemente confirmados por Dale y col., Br. J. Surg. 75: 581, 1988 y Muller y col., Anaesthetist 45: 834, 1996.

**[0008]** Para seguir abordando las preocupaciones de seguridad en cuanto al riesgo de las células tumorales residuales en muestras de RSI, se necesitan estrategias adicionales para eliminar las células tumorales contaminantes de manera efectiva:

- Un procedimiento que se usa en combinación con los dispositivos de RSI automáticos, como Cell Saver-5®, está representado por la filtración adicional de muestras a través de filtros de reducción de leucocitos (por ejemplo, Pall RC400, RCEZ1T), RC XL-1) (Bontadini y col., Transfusion 34: 531, 1994; Yaprak y col., Turk. J. Pediatr. 40: 89, 1998; Gwak y col., Liver Transplant. 11: 331, 2005). Como se ha evaluado en varios ensayos, la transfusión segura de eritrocitos recolectados mediante RSI no afecta el resultado clínico (Edelman y col., Urology 47: 179, 1996; Perseghin y col., Vox Sang. 72: 221, 1996; Davis y col., BJU International 91: 474, 2003).

- En una estrategia diferente de RSI, las muestras se irradian a 50 Gy debido al principio básico de radiosensibilidad de células cancerosas nucleadas y debido a la radiorresistencia de los glóbulos rojos anucleados.

**[0009]** Debido a la compleja demanda logística de la RSI/estrategia de irradiación incluyendo el requerimiento de personal adicional, problemas de dosimetría, equipos de irradiación adecuados y certificados en el departamento clínico, este último procedimiento no está a favor de la aplicación generalizada. Por el contrario, el procedimiento de filtración para la disminución de leucocitos representa una estrategia elegante para reducir las células tumorales residuales durante la RSI, aunque esta técnica aún presenta el riesgo inherente de que haya células tumorales residuales que incluso pasen el filtro.

**[0010]** El documento de Edmund A.M. Neugebauer: "Jahresbericht 2010, Institut für Forschung in der Operativen Medizin", Universität Witten / Herdecke, 1 de marzo de 2011 (2011-03-01), páginas 1-98 describe el anticuerpo trifuncional Catumaxomab para la eliminación de células tumorales libres de la sangre recolectada intraoperatoriamente de heridas para la autotransfusión durante la cirugía oncológica.

**[0011]** El documento de Alexandra Schoberth: "Entwicklung und Verbesserung von Methoden zur Charakterisierungdisseminierter Tumorzellen bei soliden Tumoren", Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, 9 de diciembre de 2004 (2004-12-09) describe la eliminación (la purga de células tumorales de productos de aféresis de células madres autólogas (para su readministración) ex vivo usando anticuerpos trifuncionales.

**[0012]** El documento de Schoberth A. y col.: "A new class of trifunctional bispecific antibodies mediated efficient immunological purging of peripheral blood stem cells", European Journal of Cancer, Vol. 37, 1 de setiembre de 2001 (2001-09-01), página S51 describe que los anticuerpos bispecíficos trifuncionales podrían usarse eficientemente para la purga inmunológica de células madre de sangre periférica.

### **Problemas que ha de resolver la presente invención**

**[0013]** Por lo tanto, para una seguridad mejorada en la cirugía de cáncer para eliminar células tumorales residuales, todos los procedimientos conocidos para la reintroducción de sangre autóloga obtenida, por ejemplo, durante una cirugía de heridas de pacientes con tumores, debe mejorarse a fin de proporcionar una eliminación confiable de células tumorales posiblemente contaminantes; dicha mejora debe ser capaz de implementarse de manera sencilla en, por ejemplo, dispositivos como Cell Saver-5® o CATS®, o con cualquier otro procedimiento para la reintroducción de sangre de pacientes que se han sometido a una cirugía.

### **Resumen de la invención**

**[0014]** La innovadora estrategia descubierta por los presentes inventores se basa en la formación, mediada por anticuerpos, de complejos multicelulares, es decir, asociados, que comprenden células tumorales reconocidas mediante el reconocimiento de antígenos asociados a un tumor impulsado por un anticuerpo, y opcionalmente también mediante el reconocimiento de células inmunitarias (leucocitos) como células T y células accesorias positivas para el

receptor Fc y/o también células tumorales, seguido de la eliminación de dichos asociados por medio de, por ejemplo, etapas de centrifugación y/o filtración. También es posible usar andamios de proteínas con anticuerpos miméticos en combinación con los anticuerpos como se describe en la reivindicación 1.

## 5 Breve descripción de las figuras

**[0015]** La invención se ilustrará con más detalles también mediante las figuras adjuntas. Las figuras muestran:

**Figura 1:** Se muestra el principio de formación de grandes complejos multicelulares, inducidos por anticuerpos trifuncionales. La formación de dicho complejo permite la eliminación de células tumorales por medio de etapas de procedimiento específicos del dispositivo para la muestra de sangre intraoperatoria.

**Figura 2:** Dibujos esquemáticos de los formatos de anticuerpos representativos con la capacidad de formar complejos multicelulares que consisten en células tumorales y leucocitos de sangre periférica (es decir, células inmunitarias). Los dibujos han sido extraídos de Jin P y Z Zhu En: Bispecific Antibodies. Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, páginas 151-170 (2011) y han sido ligeramente modificados. La invención solo comprende aquellos anticuerpos cubiertos por la presente reivindicación 1; cualquier otro formato de anticuerpo se describe solo para fines informativos.

**Figura 3:** Realización ejemplar de un procedimiento de la invención que usa catumaxomab.

## Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas

**[0016]** La siguiente discusión se incluye para los fines de describir la presente invención e ilustrar las realizaciones preferidas de la misma.

**[0017]** A menos que se expliquen de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en esta invención tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece esta descripción. Los términos singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales, a menos que el contexto claramente indique lo contrario. De manera similar, se pretende que la palabra "o" incluya "y", a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Aunque los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta invención se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente descripción, a continuación se describen los procedimientos y materiales adecuados. El término "comprende" significa que "incluye". Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otra bibliografía mencionadas en esta invención se incorporan como antecedentes en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de los términos. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son ilustrativos solamente y no pretenden ser limitantes.

**[0018]** La presente invención tiene que ver con un procedimiento ex vivo para la eliminación de células tumorales de la recuperación de sangre obtenida intraoperatoriamente que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar la sangre recuperada intraoperatoriamente, la cual puede contener células tumorales;
- poner en contacto dicha sangre recuperada intraoperatoriamente con
- al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional que comprende las siguientes propiedades:

- a) unión a una célula T;
- b) unión a un antígeno asociado a un tumor o a una célula tumoral;
- c) unión por medio de su porción Fc a una célula positiva de un receptor Fc,

siendo dicho anticuerpo capaz de formar una red tridimensional con las células tumorales contenidas en la sangre, donde dicho al menos un anticuerpo entra en contacto con la sangre recuperada intraoperatoriamente por un período de tiempo de 10 a 180 minutos, lo cual es suficiente para reticular células tumorales y opcionalmente células inmunitarias y/u otras células tumorales a fin de obtener asociados y/o agregados, donde dichas células tumorales, tales otras células tumorales y las células inmunitarias antes mencionadas están potencialmente presentes en la sangre recuperada intraoperatoriamente, y donde dichas células tumorales son específicamente reconocidas por dicho al menos un anticuerpo; y

- eliminar mecánicamente dichos asociados y/o agregados de dicha sangre recuperada intraoperatoriamente.

**[0019]** Además, la invención se refiere al uso de un anticuerpo trifuncional biespecífico con las siguientes propiedades:

- a) unión a una célula T;
- b) unión a un antígeno asociado a un tumor o a una célula tumoral;
- c) unión por medio de su porción Fc a una célula positiva de un receptor Fc,

siendo dicho anticuerpo capaz de formar una red tridimensional con células tumorales contenidas en la sangre, en un procedimiento ex vivo como se describe en la reivindicación 1.

**[0020]** En la siguiente descripción y los ejemplos en combinación con las figuras, se describen otras realizaciones preferidas. A partir de las reivindicaciones, es posible obtener más características preferidas.

**[0021]** El procedimiento descrito en esta invención se practica *ex vivo*, es decir, fuera del cuerpo humano. La recuperación de sangre intraoperatoria (RSI) es muy conocida en la técnica y también se describe como "recuperación de sangre autóloga". La sangre que se pierde durante la cirugía es recuperada y reinfundida al mismo paciente del cual se obtuvo la sangre perdida durante la cirugía.

**[0022]** El procedimiento descrito en esta invención apunta a la eliminación de células tumorales que potencialmente podrían contaminar la recuperación de sangre obtenida intraoperatoriamente. La sangre se obtiene de pacientes que se someten a un tratamiento quirúrgico y sufren de tumores o que se sospecha que albergan células que podrían considerarse como tumorigénicas.

**[0023]** En general, el procedimiento comienza con la aspiración de la sangre del campo quirúrgico por parte del cirujano. Generalmente, la etapa de recolección se realiza a través de un dispositivo de succión. Después, la sangre aspirada se mezcla con un anticoagulante a fin de evitar la coagulación de la sangre. La sangre aspirada se recolecta en un reservorio hasta que haya sangre suficiente para su procesamiento.

**[0024]** La referencia a un "anticoagulante" incluye clases de anticoagulantes como anticoagulantes, medicamentos antiplaquetarios, medicamentos trombolíticos y fibrinolíticos y agentes quelantes de iones metálicos como, por ejemplo, citrato, citrato dextrosa (ACD), etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) y oxalato. En un aspecto relacionado, los anticoagulantes incluyen heparina y glicosaminoglicanos como la heparina de bajo peso molecular, como la Bemiparina, Certoparina, Dalteparina, Enoxaparina, Nadroparina, Pamaparina, Reviparina y Tinzaparina, y heparinoides como el Danaparoiide, la Sulodexida y el Dermatán sulfato; Inhibidores directos de la trombina (II), como Argatroban, Bivalirudina, Dabigatrán, Desirudina, Hirudina, Lepirudina, Melagatrán, Ximelagatrán; inhibidores del factor Xa (como el Péptido anticoagulante Tick), como Apixabán, Otamixabán, Rivaroxabán y oligosacáridos como el Fondaparinux y el Idraparinux; antagonistas de la vitamina K, como el Acenocumarol, la Clorindiona, el Cumatetrilil, el Dicumarol, la Difenadiona, el Biscumacetato de Etilo, el Fenprocumón, la Fenindiona, el Tioclomarol y la Warfarina.

**[0025]** En una realización de la presente invención, la recuperación de sangre recolectada como se dijo, puede probarse en búsqueda de la presencia de células tumorales, donde, particularmente de preferencia, se determina el tipo de antígeno asociado a un tumor mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la reacción específica de anticuerpos etiquetados ante epítopes de antígenos asociados a tumores, a fin de determinar el tipo de antígeno de tumor al que se une dicho anticuerpo y que debe aplicarse en la invención.

**[0026]** Los ejemplos de tumores incluidos en la presente invención (aunque no se limitan a la misma) comprenden sarcomas y carcinomas, incluyendo el fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, el sinovioma, mesotelioma, el tumor de Ewing, leiomiomas, rhabdomiomas, carcinoma de colon, tumor maligno linfóide, cáncer de páncreas, de mamas (incluyendo el carcinoma de mama basal, el carcinoma ductal y el carcinoma de mama lobular), cánceres de pulmón, cáncer de ovario, de próstata, hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de tiroides medular, carcinoma de tiroides papilar, feocromocitomas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del ducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, semioma, cáncer de vejiga y tumores del sistema nervioso central (como glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma). Los ejemplos adicionales incluyen tumores epiteliales, hematológicos y neuroendocrinos.

**[0027]** La recuperación de sangre intraoperatoria después se pone en contacto con un anticuerpo o un andamio de proteína adecuado que es capaz de detectar específicamente al menos un epítipo de al menos un antígeno asociado a un tumor de al menos una célula tumoral.

**[0028]** Como un requerimiento adicional, dicho anticuerpo debe ser capaz de formar una red tridimensional de al menos dichos anticuerpos y tales células tumorales contenidas en la sangre a fin de obtener agregados o asociados que consisten en dichos anticuerpos y células tumorales. En una realización más particularmente preferida de la presente invención, dicho anticuerpo también es capaz de unirse a otras células tumorales y/o células inmunitarias a fin de formar una red tridimensional de anticuerpos y células tumorales y opcionalmente células inmunitarias y más opcional o adicionalmente otras células tumorales. Debido a la composición, estructura y tamaño de dichos asociados que resultan de la formación de complejos multicelulares, los asociados son capaces de ser eliminados de dicha RSI mediante centrifugación o filtración, o una combinación de las mismas. Debe entenderse que la filtración y centrifugación son procedimientos preferidos, mientras que el experto en la materia podría reconocer otros

procedimientos a fin de eliminar eficientemente dichos asociados que comprenden células tumorales residuales.

**[0029]** La invención por lo tanto se concentra en la eliminación mecánica de asociados y agregados formados mediante la asociación y agregación de anticuerpos con antígenos asociados a tumores en células tumorales y 5 opcionalmente células inmunitarias y/u otras células tumorales y no en la disminución de células tumorales llevando antígenos asociados a tumores mediante la destrucción de dichas células tumorales por medio de interacciones específicas de los anticuerpos y efectos inmunológicos. Mientras el uso de anticuerpos en un modo convencional como agentes inmunológicos a fin de destruir células tumorales por medio de la interacción con células inmunitarias, la invención se vuelve beneficiosa solo por la capacidad de los anticuerpos de ser capaces de hacer reticulaciones con 10 antígenos que están, en el presente caso, ubicadas en células tumorales o fragmentos de las mismas. Por lo tanto, los efectos de la invención solo se logran por, y consisten en, la interacción de los anticuerpos con dichas células tumorales y la eliminación de la red tridimensional antes mencionada mediante procedimientos de separación centrífuga y/o de filtración.

15 **[0030]** Si bien en los procedimientos conocidos en la materia los anticuerpos o moléculas del tipo de anticuerpos pueden unirse a componentes magnéticos como perlas magnéticas u otros elementos estructurales que facilitan la eliminación de complejos de anticuerpos por medio de dichos elementos estructurales, o las células tumorales son eliminadas por procedimientos de clasificación de células como la citometría de flujo, estas realizaciones han sido excluidas de la presente invención. Solo debido a la formación de una red tridimensional de anticuerpos con 20 antígenos, como los antígenos asociados a un tumor, en células tumorales o fragmentos de las mismas, y, opcionalmente, células inmunitarias y/u otras células tumorales, una eliminación mecánica de dichos asociados resulta posible. Por consiguiente, el anticuerpo o la proteína de andamiaje no se asocia con ningún otro componente estructural como perlas magnéticas o moléculas fluorescentes que pueden facilitar dicha eliminación.

25 **[0031]** La presente invención se describe y reivindica en esta invención con respecto a anticuerpos biespecíficos trifuncionales dentro de las limitaciones de la reivindicación 1, particularmente con respecto al anticuerpo biespecífico trifuncional catumaxomab, que se dirige contra el antígeno EpCAM asociado a un tumor, y que se une adicionalmente a una célula T mediante CD3 y a las células positivas del receptor Fc por medio de su porción Fc. Las realizaciones específicas que se describen en los ejemplos deben entenderse como realizaciones ejemplares que 30 proporcionan evidencias para la factibilidad de la presente invención. Habiendo proporcionado evidencia de la excelente eliminación de células tumorales de la RSI mediante catumaxomab, se ha dado prueba del concepto para el principio en el que se basa el procedimiento reivindicado. Habiendo proporcionado esta evidencia, el experto en la materia inevitablemente tendrá la posibilidad de extender el concepto a otros tumores y otros anticuerpos en la medida cubierta por la presente reivindicación 1, que son capaces de interactuar con dichas células tumorales y las células 35 inmunitarias antes mencionadas a fin de proporcionar una red tridimensional, es decir, complejos multicelulares que pueden eliminarse, por ejemplo, mediante centrifugación y/o filtración.

**[0032]** Los anticuerpos de la presente invención son específicamente seleccionados de anticuerpos biespecíficos trifuncionales. Un anticuerpo biespecífico se define como un anticuerpo capaz de unirse a dos tipos 40 diferentes de antígenos; un anticuerpo trispecífico se caracteriza por unirse a tres tipos diferentes de antígenos; Un anticuerpo tetraespecífico se caracteriza por unirse a cuatro tipos diferentes de antígenos mientras que un anticuerpo multiespecífico se define como aquel capaz de unirse a múltiples tipos diferentes de antígenos. El anticuerpo biespecífico catumaxomab se define por la unión al antígeno EpCAM asociado a un tumor, por un lado, y al CD3 de una célula T, por el otro, así como también a células accesorias por medio de su parte Fc. La invención solo cubre 45 aquellos anticuerpos que presentan el formato biespecífico trifuncional como se describe en la reivindicación 1. Todos los demás anticuerpos se describen solo para fines informativos.

**[0033]** Los anticuerpos bi-, tri-, tetra- y multiespecíficos que se describen arriba pueden ser monovalentes, divalentes, trivalentes, tetravalentes o multivalentes. Un anticuerpo con una propiedad de unión monovalente se 50 define como un anticuerpo que es capaz de unirse a un antígeno asociado a un tumor. Un anticuerpo monoclonal bivalente se define como un anticuerpo que es capaz de unirse a dos antígenos asociados a un tumor o un antígeno asociado a un tumor y un antígeno asociado a una célula inmunitaria. Un anticuerpo monoclonal trivalente se define como un anticuerpo que es capaz de unirse a tres antígenos diferentes asociados a un tumor o dos antígenos 55 asociados a un tumor y un antígeno asociado a una célula inmunitaria o un antígeno asociado a un tumor y dos antígenos asociados a una célula inmunitaria. Un anticuerpo monoclonal tetravalente se define como un anticuerpo capaz de unirse a cuatro antígenos diferentes asociados a un tumor o dos antígenos diferentes asociados a un tumor, siendo que cada uno presenta dos brazos de unión de antígenos idénticos, o dos/tres antígenos asociados a un tumor y un antígeno asociado a una célula inmunitaria o dos antígenos asociados a un tumor y dos antígenos asociados a una célula inmunitaria. Un anticuerpo monoclonal multivalente se define como un anticuerpo capaz de unirse a uno o 60 más antígenos asociados a un tumor y/o uno o más antígenos asociados a una célula inmunitaria. El término "unirse a un antígeno asociado a un tumor" se define como la unión a un epítipo de dicho antígeno asociado a un tumor en una célula tumoral. La invención solo cubre aquellos anticuerpos que presentan el formato biespecífico trifuncional como se describe en la reivindicación 1. Todos los demás anticuerpos se describen solo para fines informativos.

65 **[0034]** Los ejemplos de anticuerpos con formatos biespecíficos o trispecíficos (formatos trifuncionales con

propiedades de unión bivalente, trivalente y tetravalente a un antígeno asociado a un tumor y a uno o más antígenos superficiales de leucocitos, es decir, células del sistema inmunitario) descritos en Kontermann RE (ed.) Springer Heidelberg Dordrecht London New York, páginas 1-28 (2011) son importantes para esta solicitud de patente. La invención solo cubre aquellos anticuerpos que presentan el formato biespecífico trifuncional como se describe en la  
5 reivindicación 1. Todos los demás anticuerpos se describen solo para fines informativos.

• Formatos de anticuerpos biespecíficos con características de unión bivalente a antígenos:

por ejemplo, scFv (por ejemplo, clase BiTE), Db, scDb, dsDb, DART, dAb<sub>2</sub>/VHH<sub>2</sub>, derivados de botón en ojal, SEED-IgG, heteroFc- scfv, Fab-scFv, CrossMabs

10

• Formatos bi- (tri-) específicos con características de unión trivalente a antígenos:

por ejemplo, cuerpo triple, DNL-F(ab)<sub>3</sub>, scFv<sub>2</sub>-CH1/CL, dAb<sub>3</sub>, Fab-scFv<sub>2</sub>, IgG-scFab

• Formatos bi- (tri-) específicos con características de unión tetravalente a antígenos:

15 por ejemplo, IgG-scFv, scFv-IgG, scFv-Fc, F(ab')<sub>2</sub>-scFv<sub>2</sub>, sDb-Fc, scDb-C<sub>H</sub>3, Db-Fc, scFv<sub>2</sub>-H/L, DVD-Ig, tandAb, scFv-dhIx- scFv, dAb<sub>2</sub>-IgG, mAb dos en uno, mAb<sup>2</sup>, dAb-IgG, dAb-Fc-dAb.

[0035] En la Figura 2 incluida, se muestran ejemplos adicionales de anticuerpos.

20 [0036] En la siguiente bibliografía se describen anticuerpos adicionales:

Muller D. y RE Kontermann. En: Bispecific Antibodies. Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, páginas 83-100 (2011)

25 scFv (BiTE)

[0037] Baeuerle PA, Zugmaier G y D Ruttinger. En: Bispecific Antibodies. Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, páginas 273-288 (2011)

30 DVD-Ig

[0038] Tarcsa E., Fraunhofer W., Ghayur T., Salfeld J. y J. Gu. En: Bispecific Antibodies. Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, páginas 171-186 (2011)

35 Derivados de DNL

[0039] Chang C-H, Rossi EA, Sharkey RM, DM Goldenberg. En: Bispecific Antibodies. Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, páginas 199-216 (2011)

40 Anticuerpos dos en uno

[0040] Koeing P y G Fuh. En: Bispecific Antibodies. Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, páginas 187-198 (2011)

45 CrossMabs

[0041] Schaefer y col. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 108: 11187 (2011)

50 [0042] En una realización preferida de la invención, los anticuerpos biespecíficos trifuncionales usados en la presente invención son anticuerpos monoclonales.

[0043] Lo siguiente describe en mayor detalle los anticuerpos biespecíficos y triespecíficos trifuncionales donde solo los biespecíficos trifuncionales se usan en la invención. La invención solo cubre aquellos anticuerpos que presentan el formato biespecífico trifuncional como se describe en la reivindicación 1. Todos los demás anticuerpos  
55 se describen solo para fines informativos.

[0044] Además, cabe señalar que los anticuerpos biespecíficos y triespecíficos trifuncionales se describen en esta invención también con respecto a su modo de acción en el cuerpo humano, a fin de proporcionar una definición completa de estos anticuerpos monoclonales. Sin embargo, las propiedades intrínsecas de dichos anticuerpos biespecíficos y triespecíficos trifuncionales no tienen efecto en la invención reivindicada en este documento, ya que  
60 los anticuerpos son eliminados casi por completo de la RSI, al menos hasta una medida indetectable, de modo tal que no proporcionan ningún modo de acción en el cuerpo humano después de la reinfusión de la RSI en la que se han disminuido las células tumorales. Específicamente, el procedimiento descrito en esta invención se realiza *in vitro* fuera del cuerpo humano, de modo tal que no pueda producirse ninguna actividad biológica intrínseca de los anticuerpos.  
65 Sin embargo, para una descripción completa, se cree que debería proporcionarse una descripción del rol que estos

anticuerpos podrían desempeñar in vivo.

**[0045]** Los anticuerpos trifuncionales a usar en la presente invención son conocidos en la técnica y se describen en varios documentos. Se hace referencia, por ejemplo, a los documentos US 6.551.592, US2003223999, 5 US2002051780 y US6210668 y a los artículos antes indicados.

**[0046]** Los anticuerpos a usar en la presente invención se caracterizan preferentemente por los efectos adicionales de:

- 10 - la activación de la célula positiva del receptor Fc mediante la unión a la misma por medio de receptores Fc $\gamma$  de tipo I, IIa y III (CD64 y CD16) (18) y, de este modo, la iniciación o incremento de la expresión de citocinas y/o antígenos coestimuladores; y  
 - la transferencia de, al menos, una segunda señal de activación, requerida para la activación fisiológica de la célula T, a la célula T por medio de antígenos coestimuladores y/o citocinas, con esta activación siendo indicada por la  
 15 regulación hacia arriba de los marcadores de activación, destruyendo la célula tumoral y/o la proliferación de células T.

**[0047]** Preferentemente, los anticuerpos usados en el procedimiento y la composición de la presente invención también son capaces de activar células T específicas de un tumor, reconociendo un péptido específico de un tumor  
 20 presentado en las células tumorales por la clase MHC I y/o II mediante su receptor de células T, tras la unión del anticuerpo biespecífico o trispecífico trifuncional, como se describe en esta invención.

**[0048]** La unión a la célula T ocurre mediante CD3, CD2, CD5, CD28 y/o CD44. Las células positivas del receptor Fc presentan al menos un receptor Fc $\gamma$  I, IIa o III.

25 **[0049]** El anticuerpo usado según la invención es capaz de unirse a monocitos, macrófagos, células dendríticas, células destructoras naturales, neutrófilos y/o células eosinófilas que son células positivas del receptor Fc $\gamma$ .

**[0050]** Los anticuerpos usados según la invención llevan al inicio o incremento de la expresión de CD40, CD80, 30 CD86, ICAM-1 y/o LFA-3 siendo antígenos coestimuladores y/o la secreción de citocinas por parte de la célula positiva del receptor Fc. Preferentemente, las citocinas son IL-1, IL-2.

**[0051]** Preferentemente, la unión a las células T ocurre por medio del complejo del receptor de células T de la célula T. Dicho al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional reconoce un marcador superficial de células T  
 35 seleccionadas del grupo que consiste en CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD6, CD8 y CD28.

**[0052]** Dicho antígeno asociado a un tumor al que se une el anticuerpo o proteína de andamiaje, preferentemente un anticuerpo biespecífico trifuncional, se selecciona de un grupo que consiste en: EpCAM, Her2neu, EGFR, CD30, CD20, CD22, MUC1, MUC1\*, PSMA, CD33, MCSP, cMet, EphA2, Endosialina, Carboanhidrasa IX, IGF-  
 40 1R, FAP-alfa, CD19, CD52, GD2, CEA, FR, proteoglicanos, G250, GC182, GT468, GT512.

**[0053]** El anticuerpo biespecífico trifuncional usado en la invención, es preferentemente un anticuerpo de antígeno asociado a un anti-tumor X anti-CD3 y/o un anticuerpo de antígeno asociado a un anti-tumor X anti-CD2 y/o un anticuerpo de antígeno asociado a un anti-tumor X anti-CD5 y/o un anticuerpo de antígeno asociado a un anti-  
 45 tumor X anti-CD28 y/o un anticuerpo de antígeno asociado a un anti-tumor X anti-CD44.

**[0054]** El anticuerpo trispecífico descrito en esta invención, pero no reivindicado, es un anticuerpo de antígeno asociado a un anti-tumor X anti-CD3 y/o un anticuerpo de antígeno asociado a un anti-tumor X anti-CD2 y/o un anticuerpo de antígeno asociado a un anti-tumor X anti-CD5 y/o un anticuerpo de antígeno asociado a un anti-tumor  
 50 X anti-CD28 y/o un anticuerpo de antígeno asociado a un anti-tumor X anti-CD44 que presenta un brazo de unión anti-receptor Fc adicional.

**[0055]** Los anticuerpos preferidos son anticuerpos biespecíficos trifuncionales heterólogos, preferentemente monoclonales, seleccionados de entre una o más de las siguientes combinaciones de isotipos:

- 55
- IgG2b de rata/IgG2a de ratón,
  - IgG2b de rata/IgG2b de ratón, IgG2b de rata/IgG3 de ratón;
  - IgG2b de rata/IgG1 de humano,
  - IgG2b de rata/IgG2 de humano
  - 60 • IgG2b de rata/IgG3 de humano [alotipo oriental G3m(st)=con unión a la proteína A], IgG2b de rata/IgG4 de humano; IgG2b de rata/IgG2c de rata;
  - IgG2a de ratón/IgG3 de humano [alotipos caucásicos G3m(b+g)= sin unión a la proteína A, indicado en lo siguiente como \*] IgG2a de ratón/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG1 de humano-[bisagra]-IgG3\* de humano-[CH2-CH3] IgG2a de ratón/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 de humano-[bisagra]-IgG3\* de humano-[CH2-CH3] IgG2a de ratón/[VH-CH1, VL-  
 65 CL] de humano-IgG1 de humano-[bisagra]-IgG3\* de humano-[CH2-CH3]

- [VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG1 de humano/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 de humano-[bisagra]-IgG3\* de humano-[CH2-CH3] [VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG4 de humano/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG4 de humano-[bisagra]-IgG4 de humano [región de extremo N de CH2]-IgG3\* de humano [región de extremo C de CH2:>posición aa 251]-IgG3\* de humano [CH3] IgG2b de rata/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG1 de humano-[bisagra-CH2-CH3]
- 5 • IgG2b de rata/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG2 de humano-[bisagra-CH2-CH3]
- IgG2b de rata/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG3 de humano-[bisagra-CH2-CH3, alotipo oriental] IgG2b de rata/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG4 de humano-[bisagra-CH2-CH3]
- IgG1 de humano/[VH-CH1, VL-CL] de humano-IgG1 de humano-[bisagra]-IgG3\* de humano-[CH2-CH3] IgG1 de humano/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 de humano-[bisagra]-IgG4 de humano [región de extremo N de CH2]-IgG3\*
- 10 de humano [región de extremo C de CH2:>posición aa 251]-IgG3\* de humano [CH3]
- IgG1 de humano/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG1 de humano-[bisagra]-IgG4 de humano [región de extremo N de CH2]-IgG3\* de humano [región de extremo C de CH2:>posición aa 251]-IgG3\* de humano [CH3]
- IgG1 de humano/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 de humano-[bisagra]-IgG2 de humano [región de extremo N de CH2]-IgG3\* de humano [región de extremo C de CH2:>posición aa 251]-IgG3\* de humano [CH3]
- 15 • IgG1 de humano/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG1 de humano-[bisagra]-IgG2 de humano [región de extremo N de CH2]-IgG3\* de humano [región de extremo C de CH2:>posición aa 251]-IgG3\* de humano [CH3]
- IgG1 de humano/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 de humano-[bisagra]-IgG3\* de humano-[CH2-CH3] IgG1 de humano/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG1 de humano-[bisagra]-IgG3\* de humano-[CH2-CH3] IgG2 de humano/[VH-CH1, VL-CL] de humano-IgG2 de humano-[bisagra]-IgG3\* de humano-[CH2-CH3] IgG4 de humano/[VH-CH1, VL-CL]
- 20 de humano-IgG4 de humano-[bisagra]-IgG3\* de humano-[CH2-CH3] IgG4 de humano/[VH-CH1, VL-CL] de humano-IgG4 de humano-[bisagra]-IgG4 de humano [región de extremo N de CH2]-IgG3\* de humano [región de extremo C de CH2:>posición aa 251]-IgG3\* de humano [CH3]
- IgG2b de ratón/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 de humano-[bisagra]-IgG3\* de humano-[CH2-CH3] IgG2b de ratón/[VH-CH1, VL-CL] de humano-IgG1 de humano-[bisagra]-IgG3\* de humano-[CH2-CH3] IgG2b de ratón/[VH-CH1,
- 25 VL-CL] de ratón-IgG1 de humano-[bisagra]-IgG3\* de humano-[CH2-CH3]

**[0056]** El anticuerpo biespecífico trifuncional con especificidades de unión monovalente usado en la presente invención cuenta con las siguientes propiedades:

- 30 a) unión a una célula T;
- b) unión a un antígeno asociado a un tumor o a una célula tumoral;
- c) unión por medio de su porción Fc a una célula positiva de un receptor Fc;

el anticuerpo biespecífico trifuncional es más preferentemente seleccionado de un grupo de anticuerpos con las siguientes combinaciones

de isotipos:

- 40 IgG2b de rata/IgG2a de ratón,
- IgG2b de rata/IgG2b de ratón,
- IgG2b de rata/IgG1 de humano,
- [VH-CH1; VL-CL] de ratón-IgG1 de humano/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 de humano [bisagra]-IgG3\* de humano-[CH2-CH3] [\* = G3m(b+g) de alotipos caucásicos = sin unión a la proteína A].

45 **[0057]** Resulta específicamente preferido un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo biespecífico trifuncional y/o una proteína de andamiaje dirigida contra EpCAM y CD3 con la combinación de isotipos IgG2b de rata/IgG2a de ratón. Un ejemplo preferido para dicho anticuerpo biespecífico trifuncional es catumaxomab. Preferentemente, dicho anticuerpo es monoclonal.

50 **[0058]** Preferentemente, los anticuerpos según la invención son anticuerpos intactos monoclonales, quiméricos, recombinantes, sintéticos, semisintéticos o químicamente modificados que presentan, por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, scFV o F (ab)<sub>2</sub>.

55 **[0059]** En el procedimiento de la presente invención, también es posible usar anticuerpos o derivados o fragmentos de origen humano, o bien anticuerpos modificados a fin de que sean adecuados para el uso en humanos (los denominados "anticuerpos humanizados") (véase, por ejemplo, Shalaby y col., J. Exp. Med. 175 (1992), 217; Mocikat y col., Transplantation 57 (1994), 405).

60 **[0060]** La preparación de los diferentes tipos de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos mencionados anteriormente resultará obvia para un profesional experto. La preparación de anticuerpos monoclonales preferentemente de origen mamífero, por ejemplo, de humanos, ratas, ratones, conejos o cabras, puede llevarse a cabo usando procedimientos convencionales, por ejemplo, como aquellos descritos en Kohler y Milstein (Nature 256 (1975), 495), in Harlow y Lane (Antibodies, A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor) o en Galfre (Meth. Enzymol. 73 (1981), 3).

65

**[0061]** Incluso es posible preparar los anticuerpos descritos por medio de tecnología de ADN recombinante según las técnicas obvias para el profesional experto (véase Kurucz y col., J. Immunol. 154 (1995), 4576; Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90 (1993), 6444).

5 **[0062]** La preparación de anticuerpos que presentan dos especificidades diferentes, los denominados anticuerpos biespecíficos, puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando tecnología de ADN recombinante, pero también mediante la denominada técnica de fusión de hibridoma híbrido (véase, por ejemplo, Millstein y col., Nature 305 (1983), 537). Esta técnica consiste en fusionar líneas celulares de hibridoma, en las que cada una de ellas produce anticuerpos que presentan una de las especificidades deseadas, e identificar y aislar las líneas celulares recombinantes que producen anticuerpos que presentan ambas especificidades.

**[0063]** Según la invención, hay anticuerpos biespecíficos intactos usados. Los anticuerpos biespecíficos intactos se componen de dos semimoléculas de anticuerpo (donde cada una presenta una cadena de inmunoglobulina H y una L), con cada una representando una especificidad, y adicionalmente como anticuerpos normales presentando una porción Fc que realiza las bien conocidas funciones de efector. Preferentemente se preparan usando la tecnología de cuadro de cuadros. Este procedimiento de preparación se ejemplifica en DE-A-44 19 399. Para su completa descripción, este documento es incorporado en su totalidad como bibliografía al respecto de una definición de anticuerpos biespecíficos. Debe entenderse que otros procedimientos de preparación también resultan útiles si llevan a los anticuerpos biespecíficos intactos según la definición anterior requerida según la invención.

20 **[0064]** Por ejemplo, es posible producir anticuerpos biespecíficos intactos en cantidades suficientes usando un procedimiento de preparación recientemente desarrollado (Lindhofer y col., J. Immunology, 155:219 (1995)). La combinación de dos anticuerpos biespecíficos dirigidos contra dos antígenos diferentes asociados a un tumor (por ejemplo, c-erb-B2, EpCAM, como GA-733-2=C215) en las células de carcinoma mamario minimiza el riesgo de que las células tumorales que expresan solo uno de los antígenos permanece sin identificar.

**[0065]** De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, los anticuerpos o las proteínas de andamiaje que reconocen los antígenos asociados a un tumor en una célula tumoral no se unen a o por cualquier medio como partículas o perlas magnéticas que podrían haber sido usadas en la técnica como una herramienta a fin de eliminar asociados que se forman por medio de la unión de dichos anticuerpos a tales células tumorales y, opcionalmente, a células inmunitarias. Además, la técnica anterior describe el etiquetado de las células tumorales o los anticuerpos con, por ejemplo, sustancias cromogénicas como fluorocromas seguidos de una clasificación celular, como la citometría de flujo. Al contrario de eso, el principio de la invención recae en la formación de redes tridimensionales (asociados) como se describió anteriormente de un tamaño suficiente para ser retenidas por los filtros o separadas por las fuerzas centrífugas y para la eliminación directa de dichas redes a través de medios mecánicos como filtración o centrifugación o una combinación de las mismas. El tamaño de los asociados formados por la interacción de los anticuerpos presenta una magnitud que permite su eliminación mediante filtración o centrifugación. Las realizaciones con perlas magnéticas o herramientas similares que se unen a los anticuerpos o las células tumorales como medios auxiliares indirectos para eliminar los asociados entre los anticuerpos y las células tumorales han sido excluidas de la presente invención. Los procedimientos de separación como los procedimientos citométricos de flujo donde las células tumorales son separadas de las normales también han sido excluidos de la invención.

**Puesta en contacto del anticuerpo y/o proteína de andamiaje con la RSI**

45 **[0066]** En el entendido de que cualquiera de los anticuerpos no pueda unirse a las células inmunitarias salvo que sean antígenos diferentes o idénticos asociados a un tumor, es de crucial importancia que haya una reticulación entre al menos dos células tumorales diferentes a fin de obtener asociados entre el anticuerpo y al menos dos células tumorales.

50 **[0067]** Los términos "asociados", "complejos multicelulares" y "agregados" se usan indistintamente y siempre definen una red tridimensional entre anticuerpos, células tumorales y/o células inmunitarias y/o más células tumorales a fin de formar células tumorales reticulares que pueden ser eliminadas por centrifugación o filtración, o una combinación de las mismas. Dichos asociados específicamente comprenden:

- 55 a) anticuerpos, células tumorales y células inmunitarias y/o  
b) anticuerpos y células tumorales.

**[0068]** Dicho al menos un anticuerpo se pone en contacto con dicha recuperación de sangre obtenida interoperatoriamente por un período de tiempo que es suficiente para reticular células tumorales y opcionalmente células inmunitarias y/u otras células tumorales a fin de obtener asociados. Dichas células tumorales y las células inmunitarias antes mencionadas están potencialmente presentes en tal recuperación de sangre obtenida intraoperatoriamente. Dichas células tumorales son específicamente reconocidas por dicho al menos un anticuerpo de dicha al menos única proteína de andamiaje.

65 **[0069]** El período de tiempo necesario para alcanzar dicha reticulación puede ser determinado por un experto

en la materia a través de procedimientos de rutina. El período de tiempo usado en la invención es de 10 a 180 minutos. En general, un período de contacto es de 10 a 118 minutos, preferentemente de entre 20 y 90 minutos y más preferentemente de 30 a 60 minutos. La temperatura es preferentemente ambiente, la cual puede oscilar entre 19 y 25°C, preferentemente alrededor de 21°C.

5

**[0070]** La cantidad de anticuerpos que deban aplicarse a fin de obtener dichos asociados que comprendan anticuerpos puede ser determinados por un experto en la materia a través de mediciones rutinarias. La cantidad de anticuerpo y/o proteína de andamiaje a aplicar generalmente depende de la afinidad de unión y/o proteína de andamiaje a dicho antígeno de tumor. Más cantidades son de 1 µg a 20 µg por litro de RSI, más preferentemente de 10 µg a 10 µg por litro de RSI, de 1 µg a 5 µg por litro de RSI o de 1 µg a 2 µg por litro de RSI.

10

**[0071]** A fin de optimizar dicho procedimiento, se aplican al menos dos anticuerpos y/o proteínas de andamiaje diferentes, de los que la especificidad del antígeno del tumor o especificidad del marcador de superficie de célula T difiere entre sí, siempre que al menos alguno de los anticuerpos caiga dentro de las limitaciones de la reivindicación

15 1.

### **Eliminación de células tumorales y asociados de anticuerpos/proteínas de andamiaje de la RSI**

**[0072]** Los asociados son eliminados finalmente de dicha recuperación de sangre obtenida intraoperatoriamente (RSI) a fin de obtener una RSI que se encuentra esencialmente libre de células tumorales. La disminución de dichos agregados celulares se logra preferentemente por centrifugación, filtración o una combinación de las mismas. En un procedimiento preferido, se incluye al menos una etapa de centrifugación y más preferentemente al menos una etapa de filtración.

20

**[0073]** La filtración es, generalmente, una reducción de leucocitos o filtración de disminución donde todos los leucocitos contaminados por dichas células tumorales son eliminados mientras los eritrocitos pasan el filtro y son recolectados. Los filtros pueden seleccionarse entre filtros de pantalla con tamaños de poros entre 20 y 40 µm, los cuales retienen los asociados formados por el procedimiento de la invención y también, por ejemplo, hebras de fibrina y mata de células muertas. Los eritrocitos que presentan alrededor de 8 µm de tamaño pueden pasar a través de los

25

30

**[0074]** Una revisión que describe los dispositivos de recuperación de células, incluyendo los procedimientos de separación es la de Carless PA, Henry DA, Moxey AJ, O'Connell D, Brown T, Fergusson DA, Cell salvage for minimizing perioperative allogeneic blood transfusion, 2010, The Cochrane Collaboration, John Wiley & Sons, Ltd. la cual ha sido incorporada en su totalidad en la bibliografía.

35

**[0075]** Un ejemplo de un filtro de sangre de microagregados a fin de recibir solo una fracción que contiene eritrocitos es el Filtro de transfusión sanguínea Pall SQ 40S.

40

**[0076]** La centrifugación se realiza generalmente mediante una etapa de centrifugación en gradiente de densidad seguida de un lavado con suero fisiológico por un tiempo y con una velocidad de rotación suficiente para eliminar dichos asociados que comprenden las células tumorales y para separar los eritrocitos de dichos asociados de células tumorales y, opcionalmente, de los leucocitos.

45

**[0077]** La filtración se realiza generalmente por un período de tiempo suficiente para eliminar dichos asociados que comprenden las células tumorales y para separar los eritrocitos de tales asociados de células tumorales y, opcionalmente, de los leucocitos.

50

**[0078]** En una realización preferida, dicho concentrado de eritrocitos libre de células tumorales contaminantes se usa sin la adición de suero fisiológico.

**[0079]** Pueden usarse etapas de filtración adicionales a fin de eliminar asociados residuales y/o leucocitos.

55

**[0080]** Como la tecnología de filtración de leucocitos subyacentes es diferente de los procedimientos de filtración clasificados por micrones, incluyendo los problemas de obstrucción, esta estrategia de eliminación de células tumorales parece ser factible.

60

**[0081]** Uno de los beneficios de la invención es que el tiempo involucrado para dicha eliminación de células tumorales se reduce drásticamente con la invención, en comparación con la disminución de células tumorales mediante la destrucción de anticuerpos o por la eliminación con perlas magnéticas o procedimientos de clasificación de células.

65

**[0082]** Los productos sanguíneos obtenidos con el uso del procedimiento de la invención después son

readministrados al paciente del que se obtuvo la muestra de sangre inicial.

**Ejemplos**

**5 Eliminación de células tumorales mediada por anti-EpCAM a través de la disminución de complejos multicelulares por centrifugación y/o filtración durante la RSI**

**[0083]** Los perfiles de expresión de la glicoproteína transmembrana EpCAM clasificada por teñido de micromatrices de tejido ocurre en carcinomas de varios tumores (Tabla 3). Este patrón EpCAM de amplia expresión representa una interesante marca distintiva de carcinomas que podría ser no solo considerable para su aplicación terapéutica, sino también para protocolos mejorados de RSI durante cirugías de cáncer. Sin embargo, cabe señalar que la mayoría de los tumores de tejidos blandos y todos los linfomas fueron completamente negativos para EpCAM.

**Tabla 3. Micromatriz de tejido: Perfil de expresión en varias entidades tumorales**

Entidad tumoral	Número de muestras (n)	Expresión negativa (%)	Expresión débil/moderada# (%)	Expresión fuerte* (%)
<b>Prostática<sup>1</sup></b>				
	414	11,9	10,9	87,2
<b>Colon<sup>1</sup></b>				
	1186	0,3	1,9	197,7
<b>Pulmón<sup>1</sup></b>				
	1287	13,5	22,5	63,9
<b>Gástrica<sup>1</sup></b>				
	473	2,5	6,8	90,7
<b>Ovárica<sup>2</sup></b>				
	272	2,6	12,1	85,3
<sup>1</sup> Datos extraídos de Went y col., Brit. J. Cancer 94: 128, 2006. <sup>2</sup> Datos extraídos de Spizzo y col., Gynecological Oncology 103: 483, 2006. # Puntuación 1-4; La expresión de EpCAM se definió mediante el cálculo de la puntuación total de teñido como el producto de una puntuación de proporción (0-4) y una puntuación de intensidad (0-3) La puntuación de proporción describe la fracción estimada de células tumorales teñidas positivas (0, ninguna; 1, <10 %; 2, 10-50 %; 3, 50-80 %; 4, >80 %). La puntuación de intensidad representa la intensidad de teñido estimada (0, sin teñido; 1, débil; 2, moderada; 3, fuerte). * Puntuación > 4; la puntuación de expresión total osciló entre 0 y 12, por consiguiente, la sobreexpresión de EpCAM se definió como una puntuación total de > 4.				

15

**3.1. Cálculos para la aplicación *in vitro* de catumaxomab anti-EpCAM durante la RSI**

**[0084]** Nuestra hipótesis de investigación es que las células tumorales, presentes en grandes complejos multicelulares mediados por catumaxomab (véanse las Fig. 1 y 2), podrían eliminarse de manera eficiente mediante centrifugación y/o filtros de leucocitos (por ejemplo, el RC400 u otros filtros de disminución de leucocitos de tecnología de punta de Pall), en contraste con las células tumorales que solo flotan en suspensiones celulares simples antes de la filtración.

**[0085]** En base a los cálculos siguientes, daremos especificaciones para la formación mediada por catumaxomab de grandes complejos celulares. Un litro de sangre recolectada intraoperatoriamente (sangre periférica) contiene aproximadamente  $5 \times 10^{12}$  eritrocitos,  $5 \times 10^9$  leucocitos (incluyendo una proporción de 34 % linfocitos con aproximadamente un 80 % de células T CD3+) (Hansen, TATM 2: 472, 2003; Labor und Diagnose editado por L. Thomas, TH-Books Verlagsgesellschaft mbh, Frankfurt/Main, 2000). Por consiguiente, los adultos jóvenes presentan alrededor de  $1.3 \times 10^9$  células T CD3+ por litro de sangre periférica o RSI. El volumen de sangre RSI de una cirugía de cáncer también podría contener células tumorales residuales en un  $10^6$  a un  $10^7$ . Suponiendo que una célula T muestra alrededor de  $10^5$  moléculas CD3 en su superficie (Ginaldi y col. Br. J. Haematol. 93: 921, 1996) y que solo el 3 % de las moléculas CD3 son suficientes para el redireccionamiento mediado por catumaxomab de las células T a las células tumorales, por consiguiente, se requerirá al menos 1  $\mu$ g (que representa  $10^{12}$  moléculas) del anticuerpo anti-EpCAM/anti-CD3 biespecífico trifuncional catumaxomab para la unión cuantitativa a  $1.3 \times 10^9$  células T. Según estos cálculos, debería usarse 1-5  $\mu$ g de catumaxomab por 1 litro de muestra de RSI para la formación de grandes complejos celulares que consisten en  $10^7$  (hasta  $10^8$  células tumorales en base a las consideraciones de seguridad) células

35

tumorales que expresan EpCAM unidas a alrededor de  $10^9$  células T CD3. Además, en una proporción similar, catumaxomab también interactuaría con el receptor Fc gamma tipo I, IIa y tipo III de células accesorias como macrófagos, células destructoras naturales y monocitos que podrían agrandar estos complejos multicelulares incluso en mayor medida.

5

En resumen, la concentración de catumaxomab de 1-5 µg por litro de RSI aseguraría la formación de grandes complejos celulares que contengan hasta  $10^8$  células tumorales.

**[0086]** Cabe señalar que los filtros de reducción de leucocitos no se clasifican por micrones, sino por su efectividad para reducir leucocitos. La filtración se basa principalmente en un número de mecanismos, incluyendo la adsorción de los leucocitos al medio de filtración. Las reivindicaciones de efectividad para los filtros de reducción de leucocitos de alta efectividad Pall Purecell® se basan en los datos de rendimiento, usando conteos residuales de leucocitos promedios (véase el Apéndice). Por el contrario, los filtros de microagregados Pall SQ40S para la transfusión sanguínea se clasifican en 40 micrones. Los filtros de microagregados Pall son un filtro de tipo pantalla, y la filtración se basa en la intercepción directa a fin de retener partículas y microagregados. Los filtros de microagregados Pall son indicados para la transfusión de sangre almacenada, concentrados de glóbulos rojos, plaquetas y una solución de limpieza de órganos y almacenamiento. Si bien los filtros Pall SQ40S retienen microagregados que consisten en leucocitos no viables, no alcanzan los bajos niveles residuales posibles con los filtros de reducción de leucocitos Pall (véase el Apéndice).

10  
15  
20

**[0087]** A fin de analizar la capacidad de eliminación de células tumorales de una estrategia combinada de catumaxomab/disminución de leucocitos durante la RSI con un dispositivo automático (por ejemplo, Cell-Saver-5®), se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

25 **Paciente 1:**

**[0088]** Se recolectaron 1500 ml de sangre del paciente con la adición de anticoagulantes durante la cirugía. 100 ml de 1500 ml de sangre fueron tomados y enviados al laboratorio (muestra 1: Sangre). 400 ml de los 1400 ml de sangre restantes se centrifugaron en el sistema de recuperación de sangre y la concentración emergente de eritrocitos se envió al laboratorio (muestra 2: CE). Los 1000 ml de sangre restantes se incubaron por 1 h con 2 µg de catumaxomab. Después de la incubación, 500 ml de sangre fueron centrifugados nuevamente en la máquina de recuperación de sangre y la concentración emergente de eritrocitos se envió al laboratorio (muestra 3: CE + anticuerpo). Los 500 ml restantes también fueron centrifugados con el sistema de recuperación de sangre, purificados con un filtro de leucocitos y la CE fue enviada al laboratorio (muestra 4: CE + anticuerpo + Filtro).

30  
35

**[0089]** El laboratorio analizó las 4 muestras para un conteo de células tumorales, la secreción de citocinas y anticuerpos catumaxomab libres. A partir de la centrifugación de densidad y/o lisis de eritrocitos se obtuvieron células nucleares. Se muestrearon los sobrenadantes a fin de analizar la secreción de citocinas y hacer mediciones de catumaxomab libre. Las células fueron transferidas a diapositivas de Cytospin ( $2.5 \times 10^5$  células por diapositiva) y 6 diapositivas fueron teñidas con el anticuerpo anti-EpCAM VU1D9, reconociendo un epítipo diferente de catumaxomab para eliminar un bloqueo potencial o efectos de enmascaramiento. Después del teñido, las células tumorales fueron contadas por medio de un sistema de análisis por imagen computarizada y revisadas por un operador calificado. Por medio del uso de tecnología Luminex se midieron las citocinas y se determinaron los niveles de catumaxomab por medio de la técnica ELISA sensible. La tabla 1-3 muestra los resultados del paciente 1:

40  
45

Tabla 1: Conteo de células tumorales:

Conteo de células tumorales	Muestra 1: Sangre	Muestra 2: EC	Muestra 3: CE + anticuerpo	Muestra 4: CE + anticuerpo + Filtro
	5.2 x 10e2	40	0	0
Todos los resultados son extrapolados a los volúmenes sanguíneos originales; CE: concentración de eritrocitos				

Tabla 2: Secreción de citocinas

Secreción de citocinas pg/ml	Muestra 1: Sangre	Muestra 2: EC	Muestra 3: CE + anticuerpo	Muestra 4: CE + anticuerpo + Filtro
	IL10: 46; IL2:DLC; IL4: DLC; IL6:1003; IL8:189; IFNg: DLC; FNTa: 5	IL10: DLC; IL2:DLC; IL4: DLC; IL6:119; IL8:43; IFNg: DLC; FNTa: 3	IL10: 4; IL2:DLC; IL4:10; IL6:114; IL8:48; IFNg: DLC; FNTa: 4	n.d.
CE: concentración de eritrocitos; Límite de cuantificación 3 pg/ml				

Tabla 3: Catumaxomab libre

Catumaxomab en pg/ml	Muestra 1: Sangre	Muestra 2: EC	Muestra 3: CE + anticuerpo	Muestra 4: CE + anticuerpo + Filtro
	DLC	DLC	DLC	DLC
CE: concentración de eritrocitos; DLC: Debajo del límite de cuantificación límite de cuantificación: 250 pg/ml				

5 **Paciente 2**

**[0090]** Se recolectaron 1100 ml de sangre del paciente con la adición de anticoagulantes durante la cirugía. 100 ml de los 1100 ml

10 de sangre fueron tomados y enviados al laboratorio (muestra 1: Sangre). Los 1000 ml de sangre restantes se incubaron por 1 h con 2 µg de catumaxomab. Después de la incubación, 100 ml de sangre fueron tomados y enviados al laboratorio (muestra 2: Sangre + anticuerpo). Después, los 900 ml de sangre restantes se centrifugaron en el sistema de recuperación de sangre y la concentración emergente de eritrocitos se envió al laboratorio (muestra 3: CE + anticuerpo).

15

**[0091]** El laboratorio analizó las 3 muestras para un conteo de células tumorales, la secreción de citocinas y anticuerpos catumaxomab libres. A partir de la centrifugación de densidad y/o lisis de eritrocitos se obtuvieron células nucleares. Se muestrearon los sobrenadantes a fin de analizar la secreción de citocinas y hacer mediciones de catumaxomab libre. Las células fueron transferidas a diapositivas de Cytospin (2.5x10e5 células por diapositiva) y 6 diapositivas fueron teñidas con el anticuerpo anti-EpCAM VU1D9, reconociendo un epítope diferente de catumaxomab para eliminar un bloqueo potencial o efectos de enmascaramiento. Después del teñido, as células tumorales fueron contadas por medio de un sistema de análisis por imagen computarizada y revisadas por un operador calificado. Por medio del uso de tecnología Luminex se midieron las citocinas y se determinaron los niveles de catumaxomab por medio de la técnica ELISA sensible. La tabla 1-3 muestra los resultados del paciente 2:

25

Tabla 1: Conteo de células tumorales:

Conteo de células tumorales	Muestra 1: Sangre	Muestra 2: Sangre + anticuerpo	Muestra 3: CE + anticuerpo
	2.8 x 10e3	2.0 x 10e3	0
Todos los resultados son extrapolados a los volúmenes sanguíneos originales; CE: concentración de eritrocitos			

Tabla 2: Secreción de citocinas

Secreción de citocinas pg/ml	Muestra 1: Sangre	Muestra 2: Sangre + anticuerpo	Muestra 3: CE + anticuerpo
	IL10: 41; IL2:DLC; IL4:DLC; IL6:1011; IL8:347; IFNg: 9; FNTa: 4	IL10: 145; IL2:DLC; IL4:DLC; IL6: 5464; IL8:295; IFNg: 17; FNTa: 6	IL10: 5; IL2:DLC; IL4:10; IL6: 152; IL8:42; IFNg: DLC; FNTa: DLC
CE: concentración de eritrocitos; IL: Interleucina; IFN: Interferón; FNT: Factor de necrosis tumoral; Límite de cuantificación 3 pg/ml			

Tabla 3: Catumaxomab libre

Catumaxomab en pg/ml	Muestra 1: Sangre	Muestra 2: Sangre + anticuerpo	Muestra 3: CE + anticuerpo
	DLC	289	DLC
CE: concentración de eritrocitos; DLC: Debajo del límite de cuantificación límite de cuantificación: 250 pg/ml			

**Resumen**

5 **[0092]** Ambas muestras de sangre de pacientes con cáncer, purificadas con el sistema de recuperación de células y catumaxomab no mostrar ninguna célula tumoral restante (0) en la concentración de eritrocitos. Además, las citocinas que son secretadas durante la cirugía son claramente disminuidas en la concentración de eritrocitos después del procedimiento descrito, revelando la ausencia de problemas de seguridad para el paciente. Lo que resulta importante, es que el catumaxomab residual no pudo ser detectado en la concentración producida de eritrocitos, incluso con un procedimiento ELISA muy sensible (límite de detección: 250 pg/ml) confirmando la seguridad para pacientes potenciales que reciben estas concentraciones autólogas purificadas de eritrocitos.

**Conclusiones**

15 **[0093]** Debido a la infección y otros riesgos que presentan las transfusiones de sangre alogénicas, el aumento de la demanda y las necesidades económicas, aumenta el interés de los programas de gestión de sangre de los hospitales en la recuperación de sangre intraoperatoria. Sin embargo, el uso de la autotransfusión intraoperatoria en cirugías mayores de cáncer ha sido limitado debido a la probabilidad de que las células tumorales sean reinfundadas al paciente, llevando, por lo tanto, a mayores incidencias de recurrencia.

20 **[0094]** Se ha descubierto que el anticuerpo catumaxomab EpCAM específico con su capacidad de unirse a las células de carcinomas, células T y células accesorias, media la formación de grandes complejos multicelulares que podrían ser sencillamente eliminados por centrifugación y/o filtración de leucocitos, etapas convencionales para la eliminación de leucocitos. La invención muestra la capacidad de eliminación de leucocitos/células tumorales mediada por catumaxomab durante la recuperación de sangre intraoperatoria mediante el uso de, por ejemplo, dispositivos automáticos como Cell Saver-5® o CATS®. La aplicación *in vitro* de catumaxomab representa, además, su uso terapéutico como un uso secundario como dispositivo médico y producto médico, respectivamente, durante el procedimiento de recuperación de sangre intraoperatoria en la cirugía de cáncer.

30 **[0095]** Comenzando por estos datos fundamentados en experimentos, resulta evidente para un experto en la materia que este concepto probado experimentalmente también puede transferirse efectivamente a otros anticuerpos monoclonales, siempre y cuando sean capaces de interactuar con células tumorales y, opcionalmente, con células inmunitarias y/o tumorales a fin de formar agregados o asociados que puedan eliminarse mediante, por ejemplo, filtración o centrifugación. Por estos motivos, la presente invención no se limita a anticuerpos biespecíficos trifuncionales como catumaxomab, que reconoce el antígeno EpCAM asociado a un tumor y las células T mediante CD3 y las combinaciones de isotipos específicos que se presentan en esta invención; habiendo descrito en esta invención el concepto de la presente invención, el mismo puede ser fácilmente trasladado a otros anticuerpos y antígenos asociados con tumores, como se describe en esta invención, mientras sean capaces de reconocer antígenos asociados a un tumor y presenten la habilidad de formar asociados capaces de ser eliminados.

40 **[0096]** En conjunto, la aplicación del procedimiento de la presente invención, por ejemplo, mediante el uso de catumaxomab para minimizar el riesgo de células tumorales autólogas residuales, podría ser un requisito previo para la realización de la RSI durante la cirugía de cáncer.

45 **Filtros de transfusión sanguínea para los laboratorios/cabeceras de hospitales**

([www.pall.com/medical\\_6595.asp](http://www.pall.com/medical_6595.asp))

Producto(s)	Indicación	Rendimiento (leucocitos/unidades residuales)
Glóbulos rojos Purecell® RCEZ (gravity prime), Purecell RCQ (gravity prime/ rápida configuración de flujo), Purecell RCXL1	Filtración en el lecho de un conjunto de glóbulos rojos concentrados o sangre total	Consistentemente en un promedio de <2 x 10 <sup>5</sup>
Purecell RCXL2	Filtración en el lecho de dos conjuntos de glóbulos rojos concentrados o una unidad de sangre total	Consistentemente en un promedio de <2 x 10 <sup>5</sup>

ES 2 727 630 T3

<b>Plaquetas</b> Purecell® PXLA	Filtración de un único conjunto de plaquetas de aféresis producidas en sistemas por medio del uso de protocolos diseñados para producir un nivel inicial de reducción de leucocitos.	Consistentemente en un promedio de $<3 \times 10^4$
Purecell PL6 (gravity prime)	Filtración en el lecho de un conjunto de hasta 6 plaquetas o una unidad de aféresis estándar de un donante aleatorio	Consistentemente en un promedio de $<5 \times 10^5$
Purecell PXL8	Filtración en el lecho de un conjunto de 3 a 8 plaquetas o una unidad de aféresis estándar de un donante aleatorio	Consistentemente en un promedio de $<5 \times 10^5$
Purecell PXL12	Filtración en el lecho de un conjunto de 8 a 12 plaquetas o una unidad de aféresis estándar de un donante aleatorio	Consistentemente en un promedio de $<5 \times 10^5$
<b>Plasma</b> Purecell LPS2	Filtración de hasta 1600 ml de plasma fresco congelado	Consistentemente en un promedio de $<4 \times 10^4$
<b>Filtro de microagregados</b> Filtro Pall SQ40S de transfusión sanguínea de microagregados	Para la transfusión de sangre total, glóbulos rojos concentrados, plaquetas y concentrados de granulocitos y filtración de la Solución ViaSpan® de almacenamiento en frío (ViaSpan es una marca registrada de Dupont Merck Pharmaceutical Co.)	No aplicable
<b>Transfusión pediátrica/neonatal</b> Purecell NEO	Filtración de una alícuota de hasta 60 ml de glóbulos rojos concentrados	Consistentemente en un promedio de $<2 \times 10^5$
Purecell PL1	Filtración de un conjunto de concentrados plaquetarios de una unidad de sangre total	Consistentemente en un promedio de $<4,5 \times 10^4$
<b>Filtración del laboratorio del hospital</b> Purecell BPF (gravity prime)	Filtración de laboratorio de un conjunto de glóbulos rojos concentrados o sangre total	Consistentemente en un promedio de $<5 \times 10^4$
Purecell LRF	Filtración de laboratorio de un conjunto de hasta 6 concentrados plaquetarios o una unidad de aféresis estándar de un donante aleatorio	Consistentemente en un promedio de: $<5 \times 10^5$ (conjunto de plaquetas) $<2 \times 10^5$ (unidad de aféresis estándar)
Pall LRF10	Filtración de laboratorio de un conjunto de hasta 10 concentrados plaquetarios o una unidad de aféresis estándar de un donante aleatorio	Consistentemente en un promedio de $<5 \times 10^5$

LISTADO DE SECUENCIAS

[0097]

5

<110> Trion Pharma GmbH

<120> Eliminación de células tumorales de la recuperación de sangre autóloga intraoperatoria

10 <130> P23236-WO

<150> EP11183851.2

<151> 2011-10-04

15 <160> 1

<170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1

5 <211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> secuencia de ligador

<400> 1

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento ex vivo para la eliminación de células tumorales de la sangre recuperada intraoperatoriamente que comprende las siguientes etapas:
- 5
- proporcionar la sangre recuperada intraoperatoriamente, la cual puede contener células tumorales;
  - poner en contacto dicha sangre recuperada intraoperatoriamente con
  - al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional que comprende las siguientes propiedades:
- 10 a) unión a una célula T;
- b) unión a un antígeno asociado a un tumor o a una célula tumoral;
- c) unión por medio de su porción Fc a una célula positiva de un receptor Fc,
- siendo dicho anticuerpo capaz de formar una red tridimensional con las células tumorales contenidas en la sangre,
- 15 donde dicho al menos un anticuerpo entra en contacto con la sangre recuperada intraoperatoriamente por un período de tiempo de 10 a 180 minutos, lo cual es suficiente para la reticulación de células tumorales y, opcionalmente, células inmunitarias y/u otras células tumorales a fin de obtener asociados y/o agregados, donde dichas células tumorales, tales otras células tumorales y las células inmunitarias antes mencionadas están potencialmente presentes en la sangre recuperada intraoperatoriamente, y donde dichas células tumorales son específicamente reconocidas por dicho
- 20 al menos un anticuerpo; y
- eliminar mecánicamente dichos asociados y/o agregados de dicha sangre recuperada intraoperatoriamente.
2. Procedimiento ex vivo según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo biespecífico tridimensional es seleccionado de un grupo de anticuerpos con las siguientes combinaciones de isotipos:
- 25
- IgG2b de rata/IgG2a de ratón,
  - IgG2b de rata/IgG2b de ratón,
  - IgG2b de rata/IgG1 de humano,
  - [VH-CH1; VL-CL] de ratón-IgG1 de humano/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 de humano [bisagra]-IgG3\* de humano-
- 30 [CH2-CH3] [\* = G3m(b+g) de alotipos caucásicos = sin unión a la proteína A].
3. Procedimiento ex vivo según la reivindicación 1 a 2, donde dicho antígeno asociado a un tumor es seleccionado de un grupo que consiste en: EpCAM, Her2neu, EGFR, CD30, CD20, CD22, MUC1, MUC1\*, PSMA, CD33, MCSP, cMet, EphA2, Endosialina, Carboanhidrasa IX, IGF-1R, FAP-alfa, CD19, CD52, GD2, CEA, FR,
- 35 proteoglicanos, G250, GC182, GT468, GT512.
4. Procedimiento ex vivo según una o más de las reivindicaciones 1 a 3 anteriores donde se aplican al menos dos anticuerpos diferentes, cuya especificidad de antígenos tumorales o especificidad de marcador de superficie de célula T difieren entre sí.
- 40
5. Procedimiento ex vivo según una o más de las reivindicaciones 1 a 4 anteriores, donde dichos asociados comprenden
- 45 a) anticuerpos, células tumorales y células inmunitarias y/o
- b) anticuerpos y células tumorales.
6. Procedimiento ex vivo según una o más de las reivindicaciones 1 a 5 anteriores, donde dichos anticuerpos se aplican en una cantidad de  $\mu\text{g}$  hasta  $20\mu\text{g}$ , preferentemente 1 a  $10\mu\text{g}$  o 1 a  $5\mu\text{g}$  o 1 a  $2\mu\text{g}$  por litro de sangre recuperada intraoperatoriamente.
- 50
7. Procedimiento ex vivo según una o más de las reivindicaciones 1 a 6 anteriores, donde dichos anticuerpos se dirigen contra EpCAM y CD3.
8. Procedimiento ex vivo según una o más de las reivindicaciones 1 a 7 anteriores donde dicho
- 55 procedimiento comprende al menos una de las siguientes etapas adicionales:
- a) mezclar la sangre recuperada intraoperatoriamente antes de la adición de dicho al menos un anticuerpo con al menos un agente anticoagulante;
  - b) separar los eritrocitos de dichos asociados y/o agregados y componentes adicionales de la sangre por medio de la centrifugación, preferentemente por medio de centrifugación en gradiente de densidad;
  - 60 c) opcionalmente, filtrar dicha mezcla para eliminar agregados y/o asociados potencialmente residuales y complejos celulares residuales; y
  - c) recolectar la fracción que contiene eritrocitos y componentes adicionales de la sangre en contenedores separados.
- 65 9. Procedimiento ex vivo según una o más de las reivindicaciones 1 a 8 anteriores, donde el tiempo de

incubación del anticuerpo con dicha sangre recuperada intraoperatoriamente se ubica entre 20 y 90 minutos, más preferentemente entre 30 y 60 minutos, opcionalmente donde dicha incubación se realiza a una temperatura de entre 19 y 25°C preferentemente a temperatura ambiente.

5 10. Procedimiento ex vivo según una o más de las reivindicaciones 1 a 9 anteriores, donde dicha eliminación de asociados es por centrifugación, filtración o una combinación de las mismas.

11. Procedimiento ex vivo según una o más de las reivindicaciones 1 a 10 anteriores, donde los complejos celulares que contienen leucocitos y/o células tumorales celulares son eliminados en una etapa separada usando un  
10 filtro de adsorción de leucocitos.

12. Uso de un procedimiento ex vivo según una o más de las reivindicaciones 1 a 11 anteriores, donde dichas células tumorales son de tumores epiteliales, hematológicos o neuroectodérmicos.

15 13. Uso de un anticuerpo trifuncional biespecífico con las siguientes propiedades:

- a) unión a una célula T;
- b) unión a un antígeno asociado a un tumor o a una célula tumoral;
- c) unión por medio de su porción Fc a una célula positiva de un receptor Fc,

20 siendo dicho anticuerpo capaz de formar una red tridimensional con células tumorales contenidas en la sangre, en un procedimiento ex vivo según una o más de las reivindicaciones anteriores 1 a 12.

Figura 1:

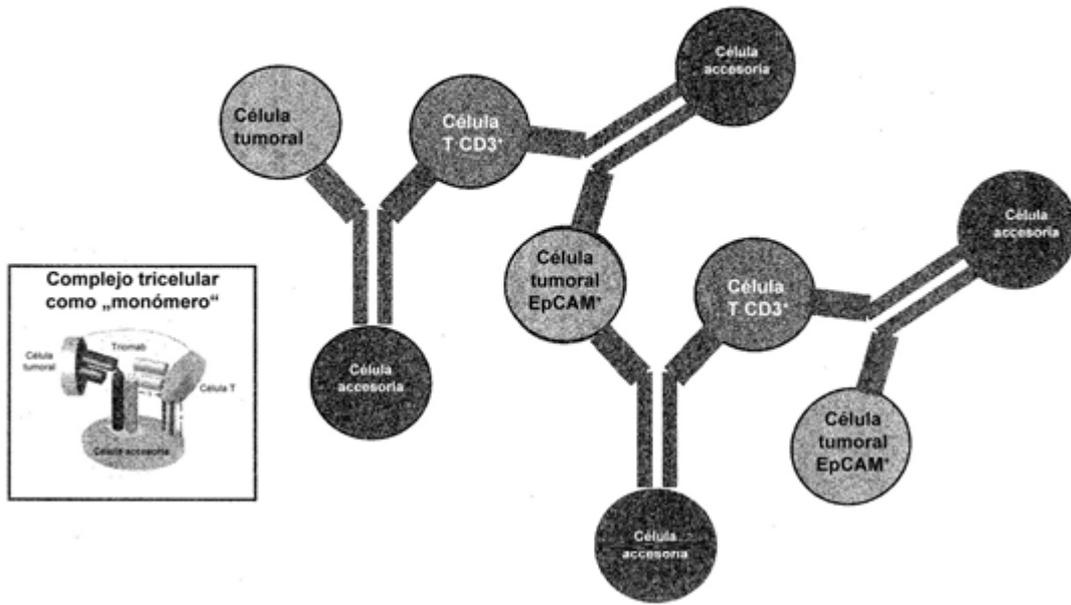


Figura 2:

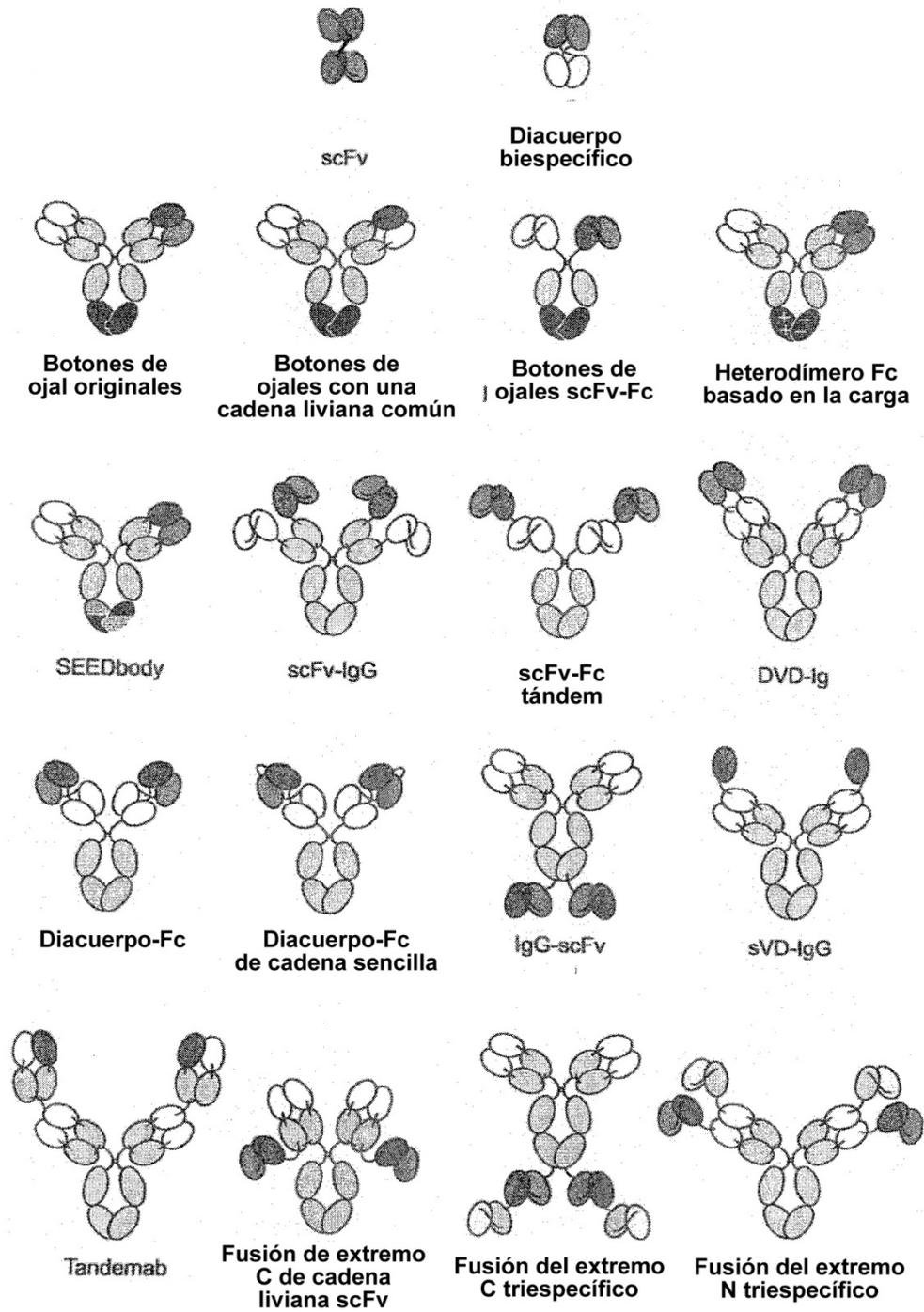


Figura 3:

