

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 029 862**

51 Int. Cl.:

A61M 1/36 (2006.01)

A61M 1/38 (2006.01)

A61M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2020** **PCT/EP2020/070459**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2021** **WO21009383**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2020** **E 20740338 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2025** **EP 3986500**

54 Título: **Eliminación de células tumorales de sangre autóloga recuperada intraoperatoriamente mediante el uso de un anticuerpo trifuncional**

30 Prioridad:

18.07.2019 EP 19186959

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

25.06.2025

73 Titular/es:

LINDIS BLOOD CARE GMBH (100.00%)
Neuendorferstrasse 18b
16761 Henningsdorf, DE

72 Inventor/es:

LINDHOFER, HORST

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 3 029 862 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 sangre autóloga recuperada intraoperatoriamente mediante el uso de un anticuerpo trifuncional

Campo de la invención

La invención se refiere a un procedimiento realizado ex vivo para la eliminación de células tumorales de sangre recuperada recogida intraoperatoriamente mediante el uso de un anticuerpo biespecífico trifuncional, y a dicho anticuerpo para su uso en un procedimiento para la eliminación de células tumorales de sangre recuperada recogida intraoperatoriamente.

Antecedentes de la invención

Desde la epidemia de SIDA de principios de la década de 1980, ha crecido el interés en alternativas a la transfusión sanguínea alogénica, en particular para cirugías electivas. Una alternativa que actualmente representa más del 5 % de la sangre donada en Estados Unidos y algunos países europeos es la transfusión autóloga, obtenida principalmente mediante donación preoperatoria. Además de la donación de sangre preoperatoria, la recuperación de sangre intraoperatoria (IBS, *intraoperative blood salvage*) (Tabla 1) del campo quirúrgico representa una opción importante para cubrir la demanda de transfusión. Durante este proceso de IBS, la sangre perdida por un paciente quirúrgico se recoge, se limpia y se pone a disposición para la reinfusión a ese paciente.

De manera resumida, la sangre desprendida en el campo quirúrgico se aspira desde este sitio hacia un contenedor especialmente diseñado. Se añade anticoagulante citrato o heparina, y el contenido se centrifuga y/o filtra para eliminar leucocitos, coágulos y residuos. Los dispositivos para la IBS pueden variar desde botellas simples, económicas, estériles llenas de anticoagulante hasta costosos y sofisticados dispositivos de lavado de células de alta velocidad (por ejemplo, Medtronic Sequestra 1000, Cobe BRAT 2, Medtronic Autolog, Haemonetics Cell Saver-5® y Fresenius CATS®; Bentzien et al., *Anaesthesist* 49: 505, 2000; Serrick et al., *J. Extra Corpor. Technol.* 35(1): 28, 2003; Carless et al., *The Cochrane Review*, en: *The Cochrane Library*, John Wiley & Sons, Ltd., número 3, págs. 1-180, 2010). Utilizado en cerca de un millón de cirugías cada año en los EE. UU., el procedimiento IBS se ha convertido en una parte integral de los programas de gestión y conservación de sangre de los hospitales.

TABLA 1. *Puntos de referencia de la recuperación de sangre intraoperatoria en cirugía oncológica*

Ahorro de sangre eficiente	Alivio de los recursos sanguíneos
Compatibilidad	Suministro de sangre
Disponibilidad rápida	Terapia óptima para la pérdida de sangre
Rentabilidad	Aplicación dependiente de la pérdida de sangre
Sin exceso de transfusión sanguínea	Después de una pérdida de sangre de como mínimo 1 litro
Menos deficiencias en la transfusión sanguínea	Mayor eficacia de quimioterapia/radioterapia
Alta calidad de la sangre	Eritrocitos lavados y nuevos
Aumento de la seguridad	Menores riesgos en la transfusión (por ejemplo, infección, error en la transfusión, dificultad de emparejamiento)
Sin necesidad de donación previa autóloga	Menores costes de unidades desperdiciadas Más práctico para los sanitarios

Además del aumento de la incidencia de anemia preoperatoria, la donación de sangre antes de la cirugía plantea serias cuestiones económicas adicionales debido a las altas tasas generales de transfusión (Carless et al., *Transfus. Med.* 14: 123, 2004). Además, en Italia, aproximadamente el 30 % de las donaciones de sangre autóloga preoperatorias deben descartarse, ya que los productos sanguíneos autólogos no requeridos están excluidos de las transfusiones de sangre alogénica por se *según* las directrices regulatorias. En este sentido, la IBS y la autotransfusión posterior generalmente representan medidas seguras y más rentables para el manejo de la sangre.

Ventajas de la recuperación de sangre intraoperatoria

A diferencia de las transfusiones de glóbulos rojos alogénicos, la IBS se considera una alternativa segura y eficaz. Cabe destacar que, a pesar de los excelentes diagnósticos virales, el riesgo de transmisión de la infección por VIH es de 1 por cada 493.000 transfusiones de sangre alogénicas, el riesgo de transmisión de la infección por el virus de la hepatitis C es de 1 por cada 103.000 y el riesgo de transmisión de la infección por el virus de la hepatitis B es de 1 por cada 63.000 (Schreiber et al., *N. Engl. J. Med.* 334: 1685, 1996). Los resultados de un estudio sobre los "Graves Riesgos de las Transfusiones" realizado entre 1996 y 2001 documentaron estos riesgos de incidencia de transfusiones alogénicas (Dzik et al., *Transfusión* 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 ABO incompatible debido a fallos administrativos o humanos a lo largo del proceso de donación y transfusión de sangre. (Sazama, Transfusion 30: 583, 1990; Dzik et al., Transfusion 43: 1190, 2003). Más del 70 % de las incidencias de transfusión podrían atribuirse a componentes sanguíneos transfundidos incorrectamente, causados principalmente por fallos en la administración y errores en la toma de muestras, la prescripción y la recogida de los componentes (Dzik et al., Transfusion 43: 1190, 2003). La autotransfusión preoperatoria e intraoperatoria de glóbulos rojos evita por sí sola estos riesgos inherentes a la transfusión de sangre alogénica. En general, las técnicas de recuperación de sangre autóloga ofrecen ventajas, pero no requieren infusiones de cristaloides o coloides para conservar el volumen sanguíneo (Tabla 1). Se pueden recuperar muchos litros de sangre intraoperatoriamente durante una hemorragia extensa, mucho más que con otras técnicas autólogas.

Idoneidad de los pacientes para la IBS

La recuperación sanguínea intraoperatoria ha estado disponible durante más de 25 años. Se utiliza ampliamente en cirugía cardiotorácica, vascular y traumatológica, así como en trasplantes de hígado. Las contraindicaciones para su uso son las infecciones bacterianas y la probable liberación de células tumorales a la sangre del campo quirúrgico, así como el uso de colágeno microfibrilar u otros materiales extraños en el sitio quirúrgico. Actualmente, debido a la escasez de sangre de donantes y al temor a las infecciones de transmisión, el uso de IBS también cobra gran interés en la cirugía oncológica con alta pérdida de sangre. La reticencia de los cirujanos a utilizar la autotransfusión en cirugía oncológica ha disminuido, ya que los informes no han encontrado un aumento en la recurrencia local ni en la enfermedad metastásica en comparación con los datos de supervivencia estándar (Klimberg et al., Arch. Surg. 121: 1326, 1986; Perseghin et al., Vox Sang. 72: 221, 1997). Según lo revisado por Vanderlinde et al. (BMJ 324: 772, 2002), las autotransfusiones de glóbulos rojos recogidas de donaciones de sangre preoperatorias podrían conducir significativamente a la reducción de la incidencia de infecciones y recurrencias durante la cirugía de cáncer colorrectal, en comparación con las transfusiones alogénicas (Tabla 2). Algunos de estos ensayos clínicos revisados son aún más importantes, ya que las cirugías colorrectales se han excluido *per se* de las recomendaciones para la IBS debido al riesgo inherente de transmisión de infecciones bacterianas.

Tabla 2. Resultado clínico de ensayos aleatorizados de transfusión autóloga frente a alogénica*.

Estudio	Nº de pacientes	Tipo de cirugía	Intervención	Tipo de complicación	% de casos que desarrollan complicaciones después de la transfusión		Valor p para la reducción en complicaciones posoperatorias
					Autólogo	Alogénico	
Busch et al., 1993 ⁹	423	Colorectal	Donación autóloga predepósito	Infección	27	25	NS
N. Eng. J. Med. 328: 1372, 1993				Recurrencia	37	34	NS
Heiss et al., 1993 y 1994 ^{10,14}	120	Colorectal	Donación autóloga predepósito	Infección	12	27	< 0,05
Lancet 342: 1328, 1993 J. Clin. Oncol. 12: 1859, 1994				Recurrencia	17	29	0,11
Newman et al., 1997 ¹¹	70	Sustitución de la rodilla	Recuperación autóloga posoperatoria	Infección	6	34	< 0,05
J. Bone Joint Surg. Br : 79 : 630, 1997							
Farrer et al., 1997 ¹²	50	Vascular	Recuperación autóloga intraoperatoria	Infección	13	44	0,029
J. Vasc. Nurs. 15 : 111, 1997							
Thomas et al., 2001 ¹³	231	Sustitución de la rodilla	Recuperación autóloga posoperatoria	Infección	ND	ND	0,036
Br. J. Anaesth. 86 : 669, 2001				Readmisión	ND	ND	0,008

NS = no significativo.

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

* La tabla se toma de Vanderlinde et al., BMJ 324: 772, 2002

Sin embargo, un estudio mostró claramente que las células tumorales eran detectables en el campo quirúrgico, aunque su impacto en la recurrencia del cáncer seguía sin estar claro (Hansen et al., Arch. Surg. 130: 387, 1995). Por ejemplo, se comparó el número de células tumorales en sangre periférica e IBS de 61 pacientes sometidos a cirugía oncológica por un tumor maligno abdominal, ortopédico, urológico, ginecológico o de cabeza y cuello. En 57 de los 61 pacientes se detectaron células tumorales en la sangre desprendida durante la cirugía oncológica. Estas células tumorales se identificaron por su capacidad de proliferación, invasividad y tumorigenicidad, con una sensibilidad de 10 células

tumorales por 500 ml de sangre (Hansen et al., Arch. Surg. 130: 387, 1995). Curiosamente, la cantidad de células tumorales en la sangre desprendida no se correlacionó con la cantidad de sangre perdida, y solo en el 26 % de estos pacientes se detectaron células tumorales circulantes en la sangre periférica. Por lo tanto, se estima que la cantidad de células tumorales en la sangre desprendida en el campo quirúrgico podría variar de 10^4 a 10^7 . Estos resultados también fueron confirmados de forma independiente por Dale et al., Br. J. Surg. 75: 581, 1988 y Müller et al., Anaesthesist 45: 834, 1996.

Para abordar adicionalmente las preocupaciones de seguridad sobre el riesgo de células tumorales residuales en muestras de IBS, se necesitan enfoques adicionales para eliminar eficazmente las células tumorales contaminantes:

- Un procedimiento utilizado en combinación con dispositivos automáticos de IBS como Cell Saver-5® está representado por la filtración adicional de muestras a través de filtros de depleción de leucocitos (por ejemplo, Pall RC400, RCEZ1T), RC XL-1) (Bontadini et al., Transfusion 34: 531, 1994; Yaprak et al., Turk. J. Pediatr. 40:89, 1998; Gwak et al., Liver Transplant. 11: 331, 2005). La transfusión segura de eritrocitos recogidos por IBS no afecta el resultado clínico, tal como se evaluó en varios ensayos (Edelman et al. Urology 47: 179, 1996; Perseghin et al., Vox Sang. 72: 221, 1996; Davis et al., BJU International 91:474, 2003).
- En un enfoque IBS diferente, las muestras se irradian a 50 Gy debido al principio subyacente de la radiosensibilidad de las células cancerosas nucleadas y debido a la radioresistencia de los glóbulos rojos no nucleados.

Debido a la compleja logística que requiere este enfoque de IBS/irradiación, que incluye personal adicional, problemas de dosimetría y equipos de irradiación adecuados y certificados en el departamento clínico, este último procedimiento no se considera de aplicación generalizada. Por el contrario, el procedimiento de filtración para la depleción leucocitaria representa un enfoque eficaz para reducir las células tumorales residuales durante IBS, aunque esta técnica aún conlleva el riesgo inherente de que las células tumorales residuales pasen el filtro.

Edmund A.M. Neugebauer: "Jahresbericht 2010, Institut für Forschung in der Operativen Medizin", Universidad de Witten/Herdecke, 1 de marzo de 2011 (01/11/2011), página 1-98 divulga el anticuerpo trifuncional Catumaxomab para la eliminación de células tumorales libres de sangre recogida intraoperatoriamente de heridas para autotransfusión durante cirugía oncológica.

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 (09/12/2004) describe la eliminación (purga de células tumorales de productos de aféresis de células madre autólogas (para readministración) ex vivo utilizando anticuerpos trifuncionales.

Schoberth A et al.: "A new class of trifunctional bispecific antibodies mediated efficient immunological purging of peripheral blood stem cells", European Journal of Cancer, vol. 37, 1 de septiembre de 2001(01/09/2001), página S51 describe que los anticuerpos bispecíficos trifuncionales pueden usarse eficientemente para la purga inmunológica de células madre de sangre periférica.

El documento US2014/369985 describe un procedimiento ex vivo para la eliminación de células tumorales de sangre recuperada intraoperatoriamente utilizando anticuerpos bispecíficos trifuncionales que se unen a una célula T, a un antígeno asociado a un tumor en una célula tumoral y, a través de su parte Fc, a una célula positiva al receptor Fc. Sin embargo, la unión a células T, en particular a CD3 y CD28 como marcadores de superficie de células T, implica cierto riesgo de liberación de citocinas, y dichas citocinas podrían entrar en el concentrado de eritrocitos recogido para su reinfusión al paciente. La reinfusión de dicho concentrado de eritrocitos que comprende potencialmente citocinas podría causar reacciones inflamatorias graves en el receptor. Además, el procedimiento podría no eliminar suficientemente las células tumorales en pacientes con un número reducido de células T.

Problemas que se deben resolver con la presente invención

Por lo tanto, para una mayor seguridad en la cirugía del cáncer para eliminar células tumorales residuales, todos los procedimientos conocidos para reintroducir sangre autóloga obtenida, por ejemplo, durante la cirugía de heridas de pacientes con tumores tienen que ser mejorados con el fin de proporcionar una eliminación fiable de células tumorales posiblemente contaminantes; dicha mejora también debe incluir una alta eficiencia de eliminación de las células tumorales de la sangre autóloga de los pacientes; además, dicha mejora debe poder implementarse fácilmente en, por ejemplo, dispositivos como Cell Saver-5® o CATS® o en cualquier otro procedimiento para reintroducir sangre libre o al menos sustancialmente libre de células tumorales de pacientes que se han sometido a cirugía, en donde preferiblemente la aparición de dichos efectos se reduce significativamente.

Resumen de la invención

El nuevo enfoque encontrado por los presentes inventores se basa en la formación mediada por anticuerpos de complejos multicelulares, es decir, asociados y/o agregados, que comprenden células tumorales reconocidas por reconocimiento de antígeno asociado a tumor impulsado por anticuerpos, y además por reconocimiento de -leucocitos

y/o células accesorias positivas al receptor Fc y/o células tumorales adicionales, seguido de la eliminación de dichos asociados mediante, por ejemplo, etapas de centrifugación y/o filtración.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas

La siguiente descripción se incluye con el propósito de describir la presente invención e ilustrar realizaciones preferidas de la misma.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta divulgación. Los términos singulares "un", "una" y "el/la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la palabra "o" pretende incluir "y", a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Si bien se pueden utilizar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o las pruebas de la presente divulgación, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye". Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en este documento se incorporan por referencia 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 meramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

La presente invención se refiere a:

(1) un procedimiento ex vivo para la eliminación de células tumorales de sangre recuperada obtenida intraoperatoriamente, que comprende las siguientes etapas:

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

a) unión a un antígeno panleucocitario, que se selecciona de al menos un miembro del grupo que consiste en CD11a, CD15, CD18, CD29, CD39, CD45, CD48, CD52, CD55, CD58, CD59, CD82, CD95, CD97, CD122, CD124, CD132 y CDw137;

b) unión a un antígeno asociado a un tumor en una célula tumoral;

c) unión a través de su parte Fc a una célula positiva al receptor Fc,

siendo dicho al menos un anticuerpo capaz de formar una red tridimensional al menos con células tumorales y células leucocitarias contenidas en la sangre,

en el que dicho al menos un anticuerpo se pone en contacto con dicha sangre recuperada intraoperatoriamente durante un período de tiempo de 10 a 240 minutos, preferiblemente de 10 a 180 minutos, que es suficiente para reticular células tumorales que comprenden dicho antígeno asociado a tumor y células leucocitarias que comprenden dicho antígeno panleucocitario, y/u otras células tumorales para obtener asociados y/o agregados que comprenden dicho anticuerpo,

en el que dichas células tumorales, dichas otras células tumorales y dichas células leucocitarias están potencialmente presentes en la sangre recuperada intraoperatoriamente, y en el que dichas células tumorales son reconocidas específicamente por dicho al menos un anticuerpo; y

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

(2) Preferiblemente, dicho anticuerpo biespecífico trifuncional se selecciona de un grupo de anticuerpos con las siguientes combinaciones de isotipos:

IgG2b de rata/IgG2a de ratón,

IgG2b de rata/IgG2b de ratón,

IgG2b de rata/IgG1 humana,

[VH-CH1; VL-CL] de ratón-IgG1 humana/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 humana-[bisagra]-IgG3 humana*-[CH2-CH3]

[* = Alotipos caucásicos G3m(b+g) = sin unión a la proteína A].

(3) Preferiblemente, en el procedimiento ex vivo dicho antígeno panleucocitario es CD52.

(4) Preferiblemente, en el procedimiento ex vivo se aplican al menos dos anticuerpos diferentes cuya especificidad de antígeno tumoral y/o especificidad de antígeno panleucocitario difieren entre sí.

(5) Preferiblemente, en el procedimiento ex vivo dichos asociados están compuestos por anticuerpos, células tumorales y células leucocitarias.

(6) Preferiblemente, en el procedimiento ex vivo, dichos uno o más anticuerpos y/o proteínas de andamiaje se aplican en una cantidad de 1 µg a 20 µg, preferiblemente de 1 a 10 µg o de 1 a 5 µg o de 1 a 2 µg por litro de sangre recuperada intraoperatoriamente.

(7) Preferiblemente, el procedimiento ex vivo 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 otros componentes sanguíneos mediante centrifugación, preferiblemente mediante centrifugación en gradiente de densidad;
- c) opcionalmente, filtración de dicha mezcla para eliminar asociados y/o agregados potencialmente residuales y complejos celulares residuales; y
- d) recoger la fracción que contiene eritrocitos y otros componentes sanguíneos en recipientes separados.

(8) Preferiblemente, en el procedimiento ex vivo, el tiempo de incubación de dicho al menos un anticuerpo con dicha sangre recuperada intraoperatoriamente es entre 10 y 90 minutos, más preferiblemente entre 20 y 60 minutos, opcionalmente en el que dicha incubación se realiza a una temperatura de entre 19 a 25°C, preferiblemente a temperatura ambiente.

(9) Preferiblemente, en el procedimiento ex vivo, dicha eliminación de asociados y/o agregados es mediante centrifugación, filtración o una combinación de las mismas.

(10) Preferiblemente, en el procedimiento ex vivo, los leucocitos y/o los complejos celulares que contienen células tumorales se eliminan en una etapa separada utilizando un filtro de adsorción de leucocitos.

(11) Preferiblemente, en el procedimiento ex vivo dichas células tumorales proceden de tumores epiteliales, hematológicos o neuroectodérmicos.

(12) Preferiblemente, en el procedimiento ex vivo, en el que se administran adicionalmente anticuerpos biespecíficos trifuncionales que se unen a una célula T, a un antígeno asociado a un tumor en una célula tumoral y a través de su parte Fc a una célula positiva al receptor Fc.

(13) Preferiblemente, en el procedimiento ex vivo, dicho al menos un anticuerpo y/o dicha al menos una proteína de andamiaje comprende una propiedad de unirse a dos antígenos asociados a un tumor diferentes. Dichos dos antígenos asociados a un tumor diferentes pueden estar ubicados en dos células tumorales diferentes, respectivamente, o pueden estar ubicados en la misma célula tumoral.

(14) Utilización de un anticuerpo trifuncional biespecífico, con las siguientes propiedades:

- a) unión a un antígeno panleucocitario, que se selecciona de al menos un miembro del grupo que consiste en CD11a, CD15, CD18, CD29, CD39, CD45, CD48, CD52, CD55, CD58, CD59, CD82, CD95, CD97, CD122, CD124, CD132 y CDw137;
- b) unión a un antígeno asociado a un tumor en una célula tumoral;
- c) unión a través de su parte Fc a una célula positiva al receptor Fc,

siendo dicho anticuerpo capaz de formar una red tridimensional con células tumorales y células leucocitarias contenidas en la sangre, en un procedimiento ex vivo según uno o más de los puntos (1) a (13), en la que, preferiblemente,

dicho al menos un anticuerpo comprende una propiedad de unirse a dos antígenos asociados a un tumor diferentes. Dichos dos antígenos asociados a un tumor diferentes pueden estar ubicados en dos células tumorales diferentes, respectivamente, o pueden estar ubicados en la misma célula tumoral.

(15) Un anticuerpo biespecífico trifuncional para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- proporcionar sangre recuperada intraoperatoriamente que puede contener células tumorales;
- poner en contacto dicha sangre recuperada intraoperatoriamente con dicho anticuerpo, en el que dicho anticuerpo comprende las siguientes propiedades:

- a) unión a un antígeno panleucocitario, que se selecciona de al menos un miembro del grupo que consiste en CD11a, CD15, CD18, CD29, CD39, CD45, CD48, CD52, CD55, CD58, CD59, CD82, CD95, CD97, CD122, CD124, CD132 y CDw137;
- b) unión a un antígeno asociado a un tumor en una célula tumoral;
- c) unión a través de su parte Fc a una célula positiva al receptor Fc,

siendo dicho anticuerpo capaz de formar una red tridimensional al menos con células tumorales y células leucocitarias contenidas en la sangre,

en el que dicho un anticuerpo se pone en contacto con dicha sangre recuperada intraoperatoriamente durante un período de tiempo de 10 a 240 minutos, preferiblemente de 10 a 180 minutos, que es suficiente para reticular células tumorales que comprenden dicho antígeno asociado a tumor y células leucocitarias que comprenden dicho antígeno panleucocitario, y/u otras células tumorales para obtener asociados y/o agregados que comprenden dicho anticuerpo, en el que dichas células tumorales, dichas otras células tumorales y dichas células leucocitarias están potencialmente presentes en la sangre recuperada intraoperatoriamente, y en el que dichas células tumorales son reconocidas específicamente por dicho anticuerpo; y

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

(18) Preferiblemente, el anticuerpo para su uso según el punto (17) comprende una propiedad de unirse a dos antígenos asociados a un tumor diferentes. Dichos dos antígenos asociados a un tumor diferentes pueden estar ubicados en dos células tumorales diferentes, respectivamente, o pueden estar ubicados en la misma célula tumoral.

5 Otras realizaciones preferidas se describen en la siguiente descripción y en los ejemplos, en combinación con las figuras. El alcance de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

El procedimiento aquí descrito se realiza *ex vivo*, es decir, fuera del cuerpo humano. La recuperación de sangre intraoperatoria (IBS) es bien conocida en la técnica y también se describe como "recuperación de sangre autóloga".
10 La sangre que se pierde durante la cirugía se recupera y se reinfunde al mismo paciente del que se obtuvo la sangre perdida durante la cirugía.

El procedimiento para la eliminación de células tumorales de sangre recuperada intraoperatoriamente comprende las etapas tal como se describen en este documento para el procedimiento *ex vivo* y lo que se dijo con respecto al
15 procedimiento *ex vivo* se aplica en consecuencia a este procedimiento, cuando sea apropiado.

El procedimiento aquí descrito se dirige a la eliminación de células tumorales que podrían potencialmente contaminar la sangre recuperada obtenida intraoperatoriamente. La sangre se obtiene preferiblemente de pacientes sometidos a
20 cirugía que padecen un tumor y/o cáncer, o que se sospecha que albergan células que podrían considerarse tumorígenas.

Preferiblemente, aunque no forma parte de la invención, el procedimiento comienza con la aspiración de sangre del campo quirúrgico por parte del cirujano. La etapa de recogida se realiza preferiblemente mediante un dispositivo de succión, y también se pueden utilizar durante esta etapa diluyentes como, por ejemplo, la esterofundina. También se
25 pueden utilizar otros diluyentes, tales como NaCl al 0,9 % con heparina. La sangre aspirada se puede entonces mezclar con un anticoagulante para evitar la coagulación de la sangre. La sangre aspirada se puede recoger en un depósito hasta que haya suficiente sangre para su procesamiento.

Preferiblemente, la sangre aspirada se diluye con diluyentes como, por ejemplo, esterofundina y/o NaCl al 0,9 % con heparina.
30

La referencia a un "anticoagulante" incluye clases de anticoagulantes, tales como anticoagulantes, fármacos antiplaquetarios, fármacos trombolíticos y fibrinolíticos, y agentes quelantes de iones metálicos, tales como, por ejemplo, citrato, citrato dextrosa (ACD), EDTA y oxalato. En un aspecto relacionado, los anticoagulantes incluyen
35 heparina y glicosaminoglicanos, tales como heparinas de bajo peso molecular, tales como bemiparina, certoparina, dalteparina, enoxaparina, nadroparina, pamaparina, reviparina y tinzaparina, y heparinoides, tales como danaparoides, sulodexida y sulfato de dermatán; inhibidores directos de la trombina (II), tales como argatrobán, bivalirudina, dabigatrán, desirudina, hirudina, lepirudina, melagatrán y ximelagatrán; inhibidores del factor Xa (tales como el péptido anticoagulante de garrapatas), tales como apixabán, otamixabán, rivaroxabán y oligosacáridos, tales como
40 fondaparinux e idraparinux; antagonistas de la vitamina K, tales como acenocumarol, clorindiona, coumatetralilo, dicoumarol (dicumarol), difenadiona, biscoumacetato de etilo, fenprocumón, fenindiona, tiocloamarol y warfarina.

En una realización de la presente invención, la sangre recogida así recogida se puede analizar para detectar la presencia de células tumorales, en la que particularmente se prefiere determinar el tipo de antígeno asociado al tumor
45 mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante anticuerpos marcados que reaccionan específicamente con epítomos de antígenos asociados al tumor para determinar el tipo de antígeno tumoral al que se une dicho anticuerpo y que se va a aplicar en la presente invención.

En la presente invención, el término "célula tumoral" se refiere a cualquier célula que pueda dividirse incesantemente y formar tumores sólidos o inundar la sangre con células anormales. Preferiblemente, en la presente invención, las
50 células tumorales presentes en la sangre recuperada intraoperatoriamente pueden ser de tumores epiteliales, hematológicos o neuroectodérmicos.

Los ejemplos de tumores incluidos en la presente invención (pero sin limitarse a los mismos) comprenden sarcomas y carcinomas, incluyendo fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y otros
55 sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiosarcoma, carcinoma de colon, neoplasia linfóide, cáncer de páncreas, cáncer de mama (incluyendo carcinoma basal de mama, carcinoma ductal y carcinoma lobular de mama), cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas, carcinoma de glándulas
60 sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga y tumores del sistema nervioso central (tales como glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neurinoma del
65 acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma). Otros ejemplos incluyen tumores epiteliales, tumores hematológicos y tumores neuroectodérmicos.

Preferiblemente, en el procedimiento de la presente invención, dichas células tumorales son de tumores epiteliales, hematológicos o neuroectodérmicos.

5 En la presente invención, las "células inmunitarias" incluyen leucocitos y células positivas al receptor Fc. En la presente invención, "célula con receptor Fc" se refiere a células con receptor Fc presente en la superficie celular. Preferiblemente, "célula positiva al receptor Fc" se refiere a uno o más de monocitos, macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales, neutrófilos y células eosinófilas.

10 Preferiblemente, la sangre recuperada intraoperatoriamente se recoge en un depósito, antes de entrar en contacto con dicho anticuerpo o dicha proteína de andamiaje.

A continuación, la sangre recuperada de forma intraoperatoria se pone en contacto con un anticuerpo o un andamiaje proteico apropiado que es capaz de unirse específicamente a al menos un epítipo de al menos un antígeno asociado a un tumor de al menos una célula tumoral.

15 En la presente invención, "concentrado de eritrocitos" se refiere a glóbulos rojos empaquetados.

20 En la presente invención, "agregado(s) celular(es)" se refiere a células adheridas entre sí, y dicha expresión es intercambiable con "asociado(s)" o "asociado(s) celular(es)". De manera similar, "asociar" y "agregar" también son intercambiables.

25 Como requisito adicional, dicho anticuerpo debe ser capaz de formar una red tridimensional de al menos dichos anticuerpos y dichas células tumorales presentes en la sangre para obtener agregados o asociados que comprendan dichos anticuerpos y células tumorales. En una realización particularmente preferida de la presente invención, dicho anticuerpo también es capaz de unirse a más de una célula tumoral y/o a células inmunitarias para formar una red tridimensional de anticuerpos y células tumorales, y opcionalmente, células inmunitarias y, más opcionalmente, células tumorales adicionales. Debido a la composición, estructura y tamaño de dichos asociados resultantes de la formación de complejos multicelulares, los asociados pueden ser eliminados de la IBS mediante centrifugación o filtración o una combinación de ambas. Cabe entender que la filtración y la centrifugación son procedimientos preferidos, mientras que el experto en la materia podría reconocer otros procedimientos para eliminar eficazmente dichos asociados que comprenden células tumorales residuales.

35 Por lo tanto, la presente invención se centra preferiblemente en la eliminación mecánica de asociados y agregados formados mediante la asociación y agregación de anticuerpos con antígenos asociados a un tumor en células tumorales y, opcionalmente, células inmunitarias y/u otras células tumorales, y no en el agotamiento de células tumorales portadoras de antígenos asociados a un tumor mediante la destrucción de dichas células tumorales mediante interacciones específicas con anticuerpos y efectos inmunológicos. Si bien se utilizan anticuerpos de forma convencional como agentes inmunológicos para destruir células tumorales mediante la interacción con células inmunitarias, la presente invención se beneficia preferiblemente de la capacidad de los anticuerpos para reticular antígenos que, en este caso, se encuentran en células tumorales o fragmentos de las mismas. Los efectos de la invención se logran mediante la interacción de los anticuerpos con dichas células tumorales y, en particular, mediante la eliminación de dicha red tridimensional mediante procedimientos de separación por centrifugación y/o filtración.

45 El presente procedimiento también puede utilizarse en combinación con otros procedimientos conocidos en la técnica, en los que los anticuerpos o moléculas similares a anticuerpos pueden unirse a componentes magnéticos, como perlas magnéticas u otros elementos estructurales, que facilitan la eliminación de complejos de anticuerpos a través de dichos elementos estructurales, o bien, las células tumorales se eliminan mediante procedimientos de clasificación celular, como la citometría de flujo. Solo gracias a la formación de una red tridimensional de anticuerpos con antígenos, como los antígenos asociados a un tumor, en las células tumorales o fragmentos de las mismas, y opcionalmente, células inmunitarias y/u otras células tumorales, es posible la eliminación mecánica de dichos asociados. En este sentido, en la presente invención no es necesario involucrar otros componentes estructurales, como perlas magnéticas o moléculas fluorescentes, para facilitar dicha eliminación, lo que hace que el presente procedimiento sea más sencillo y fácil de llevar a cabo.

55 La presente invención se describe y reivindica en el presente documento en relación con anticuerpos biespecíficos trifuncionales, dentro de las limitaciones de la presente invención, y se ejemplifica con respecto al anticuerpo biespecífico trifuncional anti-CD52 x anti-EpCAM. Dicho anticuerpo biespecífico trifuncional anti-CD52 x anti-EpCAM se dirige contra el antígeno asociado a un tumor EpCAM y se une adicionalmente a CD52, un marcador panleucocitario, y a células positivas al receptor Fc mediante su parte Fc. Las realizaciones específicas descritas en los ejemplos deben entenderse como realizaciones de ejemplo que demuestran la viabilidad de la presente invención. Tras demostrar la excelente eliminación de células tumorales en la IBS con catumaxomab, se ha demostrado el principio en el que se basa el procedimiento aquí reivindicado. Aportada esta evidencia, el experto en la materia tendrá inevitablemente la posibilidad de ampliar el concepto a otros tumores y otros anticuerpos en la medida en que estén cubiertos por la presente invención y que sean capaces de interactuar con dichas células tumorales y opcionalmente

con dichas células inmunes para proporcionar una red tridimensional, es decir, complejos multicelulares que puedan eliminarse, por ejemplo, mediante centrifugación y/o filtración.

Preferiblemente, los anticuerpos de la presente invención se seleccionan específicamente entre anticuerpos trifuncionales. Preferiblemente, el anticuerpo trifuncional de la presente invención puede ser un anticuerpo biespecífico, triespecífico, tetraespecífico y multiespecífico. El anticuerpo trifuncional descrito anteriormente se refiere a un anticuerpo biespecífico trifuncional. Sin embargo, si los anticuerpos triespecíficos, tetraespecíficos y multiespecíficos también presentan las mismas propiedades o efectos, dicho anticuerpo trifuncional también puede referirse a un anticuerpo triespecífico, tetraespecífico y multiespecífico trifuncional, tal como se utiliza en el presente documento.

Los anticuerpos de la presente invención se seleccionan específicamente entre anticuerpos trifuncionales. Un anticuerpo biespecífico se define como un anticuerpo capaz de unirse a dos tipos diferentes de antígenos, preferiblemente a través de su región variable; un anticuerpo triespecífico se caracteriza por unirse a tres tipos diferentes de antígenos, preferiblemente a través de su región variable; un anticuerpo tetraespecífico se caracteriza por unirse a cuatro tipos diferentes de antígenos, preferiblemente a través de su región variable; mientras que un anticuerpo multiespecífico se define como capaz de unirse a múltiples tipos diferentes de antígenos, preferiblemente a través de su región variable. Como ejemplo específico, el anticuerpo biespecífico trifuncional anti-CD52 x anti-EpCAM se define por unirse al antígeno asociado a tumor EpCAM, por un lado, y al marcador panleucocitario CD52, por otro, así como con células accesorias mediante su parte Fc.

Los anticuerpos biespecíficos, triespecíficos, tetraespecíficos y multiespecíficos descritos anteriormente pueden ser monovalentes, divalentes, trivalentes, tetravalentes o multivalentes. Un anticuerpo con propiedad de unión monovalente se define como aquel capaz de unirse a un antígeno asociado a un tumor. Un anticuerpo monoclonal bivalente se define como aquel capaz de unirse a dos antígenos asociados a un tumor o a un antígeno asociado a un tumor y un antígeno asociado a una célula inmunitaria. Un anticuerpo monoclonal trivalente se define como aquel capaz de unirse a tres antígenos asociados a un tumor diferentes, o a dos antígenos asociados a un tumor y un antígeno asociado a una célula inmunitaria, o a un antígeno asociado a un tumor y dos antígenos asociados a una célula inmunitaria. Un anticuerpo monoclonal tetravalente se define como aquel capaz de unirse a cuatro antígenos asociados a un tumor diferentes, o a dos antígenos asociados a un tumor diferentes, cada uno con dos brazos de unión idénticos, o a dos/tres antígenos asociados a un tumor y un antígeno asociado a una célula inmunitaria, o a dos antígenos asociados a un tumor y dos antígenos asociados a una célula inmunitaria. Un anticuerpo monoclonal multivalente se define como un anticuerpo que es capaz de unirse a uno o más antígenos asociados a un tumor y/o a uno o más antígenos asociados a células inmunitarias. El término "unión a un antígeno asociado a un tumor/tumores" se define como la unión a un epítipo de dicho antígeno asociado a un tumor en una célula tumoral. La invención solo abarca los anticuerpos con el formato biespecífico trifuncional descrito en la reivindicación 1. Todos los demás anticuerpos se describen solo con fines informativos.

La descripción general de los anticuerpos bifuncionales o trifuncionales está descrita por Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht Londres Nueva York, págs. 1-28 (2011.) que tienen formatos biespecíficos o triespecíficos (formatos trifuncionales con propiedades de unión bivalentes, trivalentes y tetravalentes a un antígeno asociado a un tumor y a uno o más antígenos de superficie de leucocitos (es decir, células del sistema inmunitario) son de importancia para esta solicitud de patente.

Formatos de anticuerpos biespecíficos con características de unión a antígenos bivalentes:

Por ejemplo, scFv (por ejemplo, clase BiTE), Db, scDb, dsDb, DART, dAb₂/VHH₂, derivados de botón en ojal ("knob into hole"), SEED-IgG, heteroFc-scFv, Fab-scFv, Mabs cruzados

Formatos de anticuerpos bi(tri)específicos con características de unión a antígeno trivalente:

por ejemplo, triple cuerpo, DNL-F(ab)₃, scFv_{2-CH1/CL}, dAb₃, Fab-scFv₂, IgG-scFab

Formatos de anticuerpos bi(tri)específicos con características de unión a antígenos tetravalentes:

por ejemplo, IgG-scFv, scFv-IgG, scFv-Fc, F(ab')₂-scFv₂, sDb-Fc, scDb-CH₃, Db-Fc, scFv₂-H/L, DVD-Ig, tandAb, scFv-dhix-scFv, dAb₂-IgG, mAb dos-en-uno, mAb², dAb-IgG, dAb-Fc-dAb.

En la figura 2 adjunta se muestran ejemplos adicionales de anticuerpos que se utilizarán según la invención.

Anticuerpos adicionales que se utilizarán de acuerdo con la invención se describen en las siguientes referencias:

Müller D y RE Kontermann. En: Bispecific Antibodies. Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht Londres Nueva York, págs. 83-100 (2011)

scFv (BiTE)

Baeuerle PA, Zugmaier G y D Rüttinger. En: Bispecific Antibodies. Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht Londres Nueva York, págs. 273-288 (2011)

DVD-Ig

Tarcsa E, Fraunhofer W, Ghayur T, Salfeld J y J Gu. En: Bispecific Antibodies. Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht Londres Nueva York, págs. 171-186 (2011)

Derivados de DNL

Chang C-H, Rossi EA, Sharkey RM, DM Goldenberg. En: Bispecific Antibodies. Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht Londres Nueva York, págs. 199-216 (2011))

Anticuerpos dos en uno

Koeing P y G Fuh. En: Bispecific Antibodies. Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht Londres Nueva York, págs. 187-198 (2011)

Mabs cruzados

Schaefer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108: 11187 (2011).

Preferiblemente, se pueden combinar dos o más anticuerpos trifuncionales con diferentes especificidades para mediar la formación de dichos asociados.

El anticuerpo biespecífico trifuncional utilizado en la presente invención se dirige contra un antígeno panleucocitario, que se selecciona de un grupo que consiste en CD11a, CD15, CD18, CD29, CD39, CD45, CD48, CD52, CD55, CD58, CD59, CD82, CD95, CD97, CD122, CD124, CD132 y CDw137.

Preferiblemente, los anticuerpos biespecíficos trifuncionales utilizados en la presente invención se dirigen contra CD11a, CD18, CD45, CD52, CD82 o CD97. En otra realización preferida, el anticuerpo se dirige contra CD52.

En una realización preferida, los anticuerpos utilizados en la presente invención son anticuerpos monoclonales. Esto es específicamente cierto a los anticuerpos biespecíficos trifuncionales descritos en detalle en este documento.

Las proteínas que tienen estructuras tridimensionales relativamente definidas se conocen comúnmente como andamiajes proteicos. Estos andamiajes proteicos pueden utilizarse como reactivos para el diseño de anticuerpos diseñados artificialmente. Estos andamiajes suelen contener una o más regiones susceptibles a variaciones de secuencia específicas o aleatorias, y dicha aleatorización de secuencias se lleva a cabo a menudo para producir bibliotecas de proteínas, de las cuales se pueden seleccionar los andamiajes de anticuerpos deseados. Dichos andamiajes son particularmente útiles en el campo del diseño de anticuerpos.

Estos andamiajes de anticuerpos son proteínas no inmunoglobulinas que imitan las propiedades de un anticuerpo monoclonal con respecto a su actividad de unión, por ejemplo, a células tumorales y células inmunitarias. Los andamiajes incluyen a menudo bucles o dominios que forman la cara de unión de dicho andamiaje de anticuerpo. Estos miméticos de anticuerpos pueden utilizarse con el objetivo de diseñar proteínas que son capaces de unirse a prácticamente cualquier compuesto de interés. Este enfoque de evolución dirigida da como resultado la producción de moléculas similares a anticuerpos con alta afinidad por los antígenos de interés. Además, estos andamiajes pueden utilizarse para mostrar bucles expuestos definidos (por ejemplo, bucles previamente aleatorizados y seleccionados en función de la unión al antígeno) con el fin de dirigir la evolución de moléculas que se unen a dichos bucles introducidos. Se conocen en la técnica procedimientos para obtener proteínas de andamiaje similares a anticuerpos. A continuación, se describe un posible enfoque para obtener una proteína de andamiaje similar a anticuerpos.

Un primer procedimiento de cribado, útil para el aislamiento o identificación de proteínas aleatorias o mutadas de interés, implica: (a) poner en contacto un compuesto de interés con una proteína candidata, siendo la proteína candidata una proteína no anticuerpo derivada que incluye un dominio que tiene un plegamiento similar al de una inmunoglobulina, derivando la proteína no anticuerpo de una proteína de referencia al tener una secuencia de aminoácidos mutada en donde la proteína no anticuerpo se une con una Kd al menos tan fuerte como 1 microM a un compuesto que no se une tan fuertemente por la proteína de referencia, en donde el contacto se lleva a cabo bajo condiciones que permiten la formación de complejos compuesto-proteína; y (b) obtener, a partir del complejo, la proteína derivada que se une al compuesto.

El segundo procedimiento de cribado es para aislar o identificar un compuesto que se une a una proteína asociada a tumor de interés. Este procedimiento comienza con una proteína no anticuerpo que incluye un dominio que tiene un plegamiento similar al de una inmunoglobulina y que deriva de una proteína de referencia al tener una secuencia de aminoácidos mutada, en donde la proteína no anticuerpo se une con una Kd al menos tan fuerte como 1 μM a un compuesto que no se une tan fuertemente a la proteína de referencia. Esta proteína derivada se pone en contacto a continuación con un compuesto candidato (antígeno asociado a tumor o un epítipo del mismo), donde el contacto se

lleva a cabo bajo condiciones que permiten la formación de complejos compuesto-proteína, y el compuesto que se une a la proteína derivada se obtiene a partir del complejo. De nuevo, esta técnica general puede llevarse a cabo con cualquier proteína.

5 A continuación, se describen otros procedimientos para obtener proteínas no anticuerpo que se unen a compuestos de interés (antígeno asociado a un tumor o un epítipo del mismo). Uno de estos procedimientos implica: (a) proporcionar una proteína de andamiaje no anticuerpo que incluya un plegamiento similar al de una inmunoglobulina, donde la proteína de andamiaje no se une al compuesto con una Kd tan fuerte como 1 μ M; (b) generar derivados mutados de la proteína de andamiaje no anticuerpo, produciendo así una biblioteca de proteínas mutadas; (c) poner
10 en contacto la biblioteca con el compuesto; (d) seleccionar de la biblioteca al menos una proteína derivada que se una al compuesto con una Kd al menos tan fuerte como 1 μ M; y (e) opcionalmente, repetir las etapas (b) a (d) sustituyendo la proteína de andamiaje no anticuerpo en la etapa (b) repetida por el producto de la etapa (d) anterior. De nuevo, esta técnica general puede llevarse a cabo con cualquier proteína.

15 Las proteínas de andamiaje así producidas imitan la función de un anticuerpo, como se describe anteriormente y posteriormente, y pueden utilizarse en lugar de un anticuerpo basado en inmunoglobulina o en combinación con él. En la presente invención, dicho anticuerpo trifuncional puede sustituirse por dicha proteína de andamiaje, siempre que ambos presenten la misma función en cuanto a la unión a un leucocito, la unión a un antígeno asociado a un tumor en una célula tumoral y la unión, a través de su parte Fc, a una célula positiva al receptor Fc, para obtener sangre
20 recuperada intraoperatoriamente que contiene agregados celulares.

En la presente invención, dicho anticuerpo trifuncional y dicha proteína de andamiaje pueden aplicarse solos o en combinación.

25 A continuación, se describen con más detalle los anticuerpos biespecíficos y triespecíficos trifuncionales.

Preferiblemente, el anticuerpo utilizado según la invención comprende un sitio de unión en su parte Fc para el receptor Fc γ (Fc gamma) tipo I, II y/o III.

30 Preferiblemente, el anticuerpo utilizado según la invención es capaz de unirse a monocitos, macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales, neutrófilos y/o células eosinófilas que son células positivas al receptor Fc γ .

En la presente invención, el antígeno asociado al tumor se refiere a una sustancia antigénica producida en células tumorales.

35 Preferiblemente, dicho antígeno asociado a tumor al que se une el anticuerpo o proteína de andamiaje, anticuerpo biespecífico trifuncional, se selecciona del grupo que consiste en: EpCAM, Her2neu, EGFR, CD30, CD20, CD22, MUC1, MUC1* con patrón de glicosilación cambiado, PSMA, CD33, MCSP, cMet, EphA2, endosialina, carboanhidrasa, IGF-1R, FAP-alfa, CD19, GD2, CEA, FR, proteoglicanos, G250, GC182, GT468, GT512.

40 Más preferiblemente, dicho antígeno asociado a tumor al que se une el anticuerpo o proteína de andamiaje, el anticuerpo biespecífico trifuncional de la presente invención es EpCAM, Her2neu, MUC1, EGFR, EphA2, GD2 o CD20.

45 Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico trifuncional de la presente invención se dirige contra un antígeno panleucocitario y un antígeno asociado a un tumor, donde dicha combinación de dos antígenos se selecciona de un grupo que consiste en EpCAM/CD11a, EpCAM/CD15, EpCAM/CD18, EpCAM/CD29, EpCAM/CD39, EpCAM/CD45, EpCAM/CD48, EpCAM/CD52, EpCAM/CD55, EpCAM/CD58, EpCAM/CD59, EpCAM/CD82, EpCAM/CD95, EpCAM/CD97, EpCAM/CD122, EpCAM/CD124, EpCAM/CD132, EpCAM/CDw137, Her2neu/CD11a, Her2neu/CD15, Her2neu/CD18, Her2neu/CD29, Her2neu/CD39, Her2neu/CD45, Her2neu/CD48, Her2neu/CD52, Her2neu/CD55, Her2neu/CD58, Her2neu/CD59, Her2neu/CD82, Her2neu/CD95, Her2neu/CD97, Her2neu/CD122, Her2neu/CD124, Her2neu/CD132, Her2neu/CDw137, EGFR/CD11a, EGFR/CD15, EGFR/CD18, EGFR/CD29, EGFR/CD39, EGFR/CD45, EGFR/CD48, EGFR/CD52, EGFR/CD55, EGFR/CD58, EGFR/CD59, EGFR/CD82, EGFR/CD95, EGFR/CD97, EGFR/CD122, EGFR/CD124, EGFR/CD132, EGFR/CDw137, CD30/CD11a, CD30/CD15, CD30/CD18, CD30/CD29, CD30/CD39, CD30/CD45, CD30/CD48, CD30/CD52, CD30/CD55, CD30/CD58, CD30/CD59, CD30/CD82, CD30/CD95, CD30/CD97, CD30/CD122, CD30/CD124, CD30/CD132, CD30/CDw137, CD20/CD11a, CD20/CD15, CD20/CD18, CD20/CD29, CD20/CD39, CD20/CD48, CD20/CD55, CD20/CD58, CD20/CD59, CD20/CD82, CD20/CD95, CD20/CD97, CD20/CD122, CD20/CD124, CD20/CD132, CD20/CDw137, CD22/CD11a, CD22/CD15, CD22/CD18, CD22/CD29, CD22/CD39, CD22/CD45, CD22/CD48, CD22/CD52, CD22/CD55, CD22/CD58, CD22/CD59, CD22/CD82, CD22/CD95, CD22/CD97, CD22/CD122, CD22/CD124, CD22/CD132, CD22/CDw137, MUC1/CD11a, MUC1/CD15, MUC1/CD18, MUC1/CD29, MUC1/CD39, MUC1/CD45, MUC1/CD48, MUC1/CD52, MUC1/CD55, MUC1/CD58, MUC1/CD59, MUC1/CD82, MUC1/CD95, MUC1/CD97, MUC1/CD122, MUC1/CD124, MUC1/CD132, MUC1/CDw137, MUC1*/CD11a, MUC1*/CD15, MUC1*/CD18, MUC1*/CD29, MUC1*/CD39, MUC1*/CD45, MUC1*/CD48, MUC1*/CD52, MUC1*/CD55, MUC1*/CD58, MUC1*/CD59, MUC1*/CD82, MUC1*/CD95, MUC1*/CD97, MUC1*/CD122, MUC1*/CD124, MUC1*/CD132, MUC1*/CDw137, PSMA/CD11a, PSMA/CD15, PSMA/CD18, PSMA/CD29, PSMA/CD39, PSMA/CD45, PSMA/CD48, PSMA/CD52, PSMA/CD55, PSMA/CD58, PSMA/CD59, PSMA/CD82, PSMA/CD95, PSMA/CD97, PSMA/CD122, PSMA/CD124,

PSMA/CD132, PSMA/CDw137, CD33/CD11a, CD33/CD15, CD33/CD18, CD33/CD29, CD33/CD39, CD33/CD45, CD33/CD48, CD33/CD52, CD33/CD55, CD33/CD58, CD33/CD59, CD33/CD82, CD33/CD95, CD33/CD97, CD33/CD122, CD33/CD124, CD33/CD132, CD33/CDw137, MCSP/CD11a, MCSP/CD15, MCSP/CD18, MCSP/CD29, MCSP/CD39, MCSP/CD45, MCSP/CD48, MCSP/CD52, MCSP/CD55, MCSP/CD58, MCSP/CD59, MCSP/CD82, MCSP/CD95, MCSP/CD97, MCSP/CD122, MCSP/CD124, MCSP/CD132, MCSP/CDw137, cMet/CD11a, cMet/CD15, cMet/CD18, cMet/CD29, cMet/CD39, cMet/CD45, cMet/CD48, cMet/CD52, cMet/CD55, cMet/CD58, cMet/CD59, cMet/CD82, cMet/CD95, cMet/CD97, cMet/CD122, cMet/CD124, cMet/CD132, cMet/CDw137, EphA2/CD11a, EphA2/CD15, EphA2/CD18, EphA2/CD29, EphA2/CD39, EphA2/CD45, EphA2/CD48, EphA2/CD52, EphA2/CD55, EphA2/CD58, EphA2/CD59, EphA2/CD82, EphA2/CD95, EphA2/CD97, EphA2/CD122, EphA2/CD124, EphA2/CD132, EphA2/CDw137, Endosialina/CD11a, Endosialina/CD15, Endosialina/CD18, Endosialina/CD29, Endosialina/CD39, Endosialina/CD45, Endosialina/CD48, Endosialina/CD52, Endosialina/CD55, Endosialina/CD58, Endosialina/CD59, Endosialina/CD82, Endosialina/CD95, Endosialina/CD97, Endosialina/CD122, Endosialina/CD124, Endosialina/CD132, Endosialina/CDw137, Carboanhidrasa/CD11a, Carboanhidrasa/CD15, Carboanhidrasa/CD18, Carboanhidrasa/CD29, Carboanhidrasa/CD39, Carboanhidrasa/CD45, Carboanhidrasa/CD48, Carboanhidrasa/CD52, Carboanhidrasa/CD55, Carboanhidrasa/CD58, Carboanhidrasa/CD59, Carboanhidrasa/CD82, Carboanhidrasa/CD95, Carboanhidrasa/CD97, Carboanhidrasa/CD122, Carboanhidrasa/CD124, Carboanhidrasa/CD132, Carboanhidrasa/CDw137, IGF-1R/CD11a, IGF-1R/CD15, IGF-1R/CD18, IGF-1R/CD29, IGF-1R/CD39, IGF-1R/CD45, IGF-1R/CD48, IGF-1R/CD52, IGF-1R/CD55, IGF-1R/CD58, IGF-1R/CD59, IGF-1R/CD82, IGF-1R/CD95, IGF-1R/CD97, IGF-1R/CD122, IGF-1R/CD124, IGF-1R/CD132, IGF-1R/CDw137, FAP-alfa/CD11a, FAP-alfa/CD15, FAP-alfa/CD18, FAP-alfa/CD29, FAP-alfa/CD39, FAP-alfa/CD45, FAP-alfa/CD48, FAP-alfa/CD52, FAP-alfa/CD55, FAP-alfa/CD58, FAP-alfa/CD59, FAP-alfa/CD82, FAP-alfa/CD95, FAP-alfa/CD97, FAP-alfa/CD122, FAP-alfa/CD124, FAP-alfa/CD132, FAP-alfa/CDw137, CD19/CD11a, CD19/CD15, CD19/CD18, CD19/CD29, CD19/CD39, CD19/CD45, CD19/CD48, CD19/CD52, CD19/CD55, CD19/CD58, CD19/CD59, CD19/CD82, CD19/CD95, CD19/CD97, CD19/CD122, CD19/CD124, CD19/CD132, CD19/CDw137, CD52/CD11a, CD52/CD15, CD52/CD18, CD52/CD29, CD52/CD39, CD52/CD45, CD52/CD48, CD52/CD52, CD52/CD55, CD52/CD58, CD52/CD59, CD52/CD82, CD52/CD95, CD52/CD97, CD52/CD122, CD52/CD124, CD52/CD132, CD52/CDw137, GD2/CD11a, GD2/CD15, GD2/CD18, GD2/CD29, GD2/CD39, GD2/CD45, GD2/CD48, GD2/CD52, GD2/CD55, GD2/CD58, GD2/CD59, GD2/CD82, GD2/CD95, GD2/CD97, GD2/CD122, GD2/CD124, GD2/CD132, GD2/CDw137, CEA/CD11a, CEA/CD15, CEA/CD18, CEA/CD29, CEA/CD39, CEA/CD45, CEA/CD48, CEA/CD52, CEA/CD55, CEA/CD58, CEA/CD59, CEA/CD82, CEA/CD95, CEA/CD97, CEA/CD122, CEA/CD124, CEA/CD132, CEA/CDw137, FR/CD11a, FR/CD15, FR/CD18, FR/CD29, FR/CD39, FR/CD45, FR/CD48, FR/CD52, FR/CD55, FR/CD58, FR/CD59, FR/CD82, FR/CD95, FR/CD97, FR/CD122, FR/CD124, FR/CD132, FR/CDw137, proteoglicanos/CD11a, proteoglicanos/CD15, proteoglicanos/CD18, proteoglicanos/CD29, proteoglicanos/CD39, proteoglicanos/CD45, proteoglicanos/CD48, proteoglicanos/CD52, proteoglicanos/CD55, proteoglicanos/CD58, proteoglicanos/CD59, proteoglicanos/CD82, proteoglicanos/CD95, proteoglicanos/CD97, proteoglicanos/CD122, proteoglicanos/CD124, proteoglicanos/CD132, proteoglicanos/CDw137, G250/CD11a, G250/CD15, G250/CD18, G250/CD29, G250/CD39, G250/CD45, G250/CD48, G250/CD52, G250/CD55, G250/CD58, G250/CD59, G250/CD82, G250/CD95, G250/CD97, G250/CD122, G250/CD124, G250/CD132, G250/CDw137, GC182/CD11a, GC182/CD15, GC182/CD18, GC182/CD29, GC182/CD39, GC182/CD45, GC182/CD48, GC182/CD52, GC182/CD55, GC182/CD58, GC182/CD59, GC182/CD82, GC182/CD95, GC182/CD97, GC182/CD122, GC182/CD124, GC182/CD132, GC182/CDw137, GT468/CD11a, GT468/CD15, GT468/CD18, GT468/CD29, GT468/CD39, GT468/CD45, GT468/CD48, GT468/CD52, GT468/CD55, GT468/CD58, GT468/CD59, GT468/CD82, GT468/CD95, GT468/CD97, GT468/CD122, GT468/CD124, GT468/CD132, GT468/CDw137, GT512/CD11a, GT512/CD15, GT512/CD18, GT512/CD29, GT512/CD39, GT512/CD45, GT512/CD48, GT512/CD52, GT512/CD55, GT512/CD58, GT512/CD59, GT512/CD82, GT512/CD95, GT512/CD97, GT512/CD122, GT512/CD124, GT512/CD132 y GT512/CDw137.

Más preferiblemente, el anticuerpo biespecífico trifuncional de la presente invención está dirigido contra dos antígenos, en el que dicha combinación de dos antígenos se selecciona de un grupo que consiste en EpCAM/CD11a, EpCAM/CD18, EpCAM/CD45, EpCAM/CD52, EpCAM/CD82, EpCAM/CD97, Her2neu/CD11a, Her2neu/CD18, Her2neu/CD45, Her2neu/CD52, Her2neu/CD82, Her2neu/CD97, MUC1/CD11a, MUC1/CD18, MUC1/CD45, MUC1/CD52, MUC1/CD82, MUC1/CD97, EGFR/CD11a, EGFR/CD18, EGFR/CD45, EGFR/CD52, EGFR/CD82, EGFR/CD97, EphA2/CD11a, EphA2/CD18, EphA2/CD45, EphA2/CD52, EphA2/CD82, EphA2/CD97, GD2/CD11a, GD2/CD18, GD2/CD45, GD2/CD52, GD2/CD82, GD2/CD97, CD20/CD11a, CD20/CD18, CD20/CD82 y CD20/CD97.

Los anticuerpos preferidos son anticuerpos biespecíficos trifuncionales heterólogos, preferiblemente monoclonales, seleccionados de una o más de las siguientes combinaciones de isotipos:

- IgG2b de rata/IgG2a de ratón,
- IgG2b de rata/IgG2b de ratón,
- IgG2b de rata/IgG3 de ratón;
- IgG2b de rata/IgG1 humana,
- IgG2b de rata/IgG2 humana
- IgG2b de rata/IgG3 humana [alotipo oriental G3m(st)=unión a proteína A], IgG2b de rata/IgG4 humana;
- IgG2b de rata/IgG2c de rata;
- IgG2a de ratón/IgG3 humana [alotipos caucásicos G3m(b+g) = sin unión a la proteína A, en lo sucesivo indicados como *]
- IgG2a de ratón/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG 1 humana-[bisagra]-IgG3*humana-[CH2-CH3]

- IgG2a de ratón/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG 1 humana-[bisagra]-IgG3*humana-[CH2-CH3]
- IgG2a de ratón/[VH-CH1, VL-CL] humana-IgG1 humana-[bisagra]-IgG3* humana-[CH2-CH3]
- [VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG1 humana/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 humana-[bisagra]-IgG3* humana-[CH2-CH3]
- [VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG4 humana/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG4 humana-[bisagra]-IgG4 humana [región N-terminal de CH2]-IgG3* humana[región C-terminal de CH2: >posición aa 251]-IgG3* humana[CH3]
- IgG2b de rata/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG1 humana-[bisagra]-CH2-CH3]
- IgG2b de rata/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG2 humana-[bisagra]-CH2-CH3]
- IgG2b de rata/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG3 humana-[bisagra]-CH2-CH3, alotipo oriental]
- IgG2b de rata/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG4 humana-[bisagra]-CH2-CH3]
- IgG1 humana/[VH-CH1, VL-CL] humana-IgG 1 humana-[bisagra]-IgG3* humana-[CH2-CH3]
- IgG1 humana/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 humana-[bisagra]-IgG4 humana [región N-terminal de CH2]-IgG3* humana [región C-terminal de CH2:>posición aa 251]-IgG3 humana*[CH3]
- IgG1 humana/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG 1 humana-[bisagra]-IgG4 humana [región N-terminal de CH2]-IgG3* humana [región C-terminal de CH2:>posición aa 251]-IgG3 humana*[CH3]
- IgG1 humana/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG1 humana-[bisagra]-IgG2 humana [región N-terminal de CH2]-IgG3* humana [región C-terminal de CH2: >posición aa 251]-IgG3 humana*[CH3]
- IgG1 humana/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG1 humana-[bisagra]-IgG2 humana [región N-terminal de CH2]-IgG3* humana [región C-terminal de CH2: >posición aa 251]-IgG3 humana*[CH3]
- IgG1 humana/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 humana-[bisagra]-IgG3* humana-[CH2-CH3]
- IgG1 humana/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG1 humana-[bisagra]-IgG3* humana-[CH2-CH3]
- IgG2 humana/[VH-CH1, VL-CL] humana-IgG2 humana-[bisagra]-IgG3* humana-[CH2-CH3]
- IgG4 humana/[VH-CH1, VL-CL] humana-IgG4 humana-[bisagra]-IgG3* humana-[CH2-CH3]
- IgG4 humana/[VH-CH1, VL-CL] humana-IgG4 humana-[bisagra]-IgG4 humana [región N-terminal de CH2]-IgG3* humana [región C-terminal de CH2:>posición aa 251]-IgG3 humana*[CH3]
- IgG2b de ratón/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG 1 humana-[bisagra]-IgG3* humana-[CH2-CH3]
- IgG2b de ratón/[VH-CH1, VL-CL] humana-IgG 1 humana-[bisagra]-IgG3* humana-[CH2-CH3]
- IgG2b de ratón/[VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG 1 humana-[bisagra]-IgG3* humana-[CH2-CH3]

- El anticuerpo biespecífico trifuncional con especificidades de unión monovalentes utilizado en una realización particularmente preferida por la presente invención tiene las siguientes propiedades:
- a) unión a un antígeno panleucocitario, que se selecciona de al menos un miembro del grupo que consiste en CD11a, CD15, CD18, CD29, CD39, CD45, CD48, CD52, CD55, CD58, CD59, CD82, CD95, CD97, CD122, CD124, CD132 y CDw137;
 - b) unión a un antígeno asociado a un tumor en una célula tumoral;
 - c) unión a través de su parte Fc a una célula positiva al receptor Fc;

- el anticuerpo biespecífico trifuncional se selecciona además preferiblemente de un grupo de anticuerpos con las siguientes combinaciones de isotipos:
- IgG2b de rata/IgG2a de ratón,
 - IgG2b de rata/IgG2b de ratón,
 - IgG2b de rata/IgG1 humana,
 - [VH-CH1; VL-CL] de ratón-IgG1 humana/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 humana-[bisagra]-IgG3 humana*-[CH2-CH3]
- [* = Alotipos caucásicos G3m(b+g) = sin unión a la proteína A].

- Se prefiere específicamente un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo biespecífico trifuncional y/o una proteína de andamiaje dirigida contra EpCAM y CD52 con la combinación de isotipos IgG2b de rata/IgG2a de ratón. Un ejemplo preferido de dicho anticuerpo biespecífico trifuncional es el anticuerpo anti-CD52 x anti-EpCAM. Preferiblemente, dicho anticuerpo es monoclonal.

- Preferiblemente, los anticuerpos según la invención son anticuerpos monoclonales, quiméricos, recombinantes, sintéticos, semisintéticos o intactos modificados químicamente que tienen, por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, scFv o F(ab)₂.

- En el procedimiento de la presente invención también se pueden utilizar anticuerpos o derivados o fragmentos de origen humano, o anticuerpos modificados para que sean adecuados para el uso en humanos (los denominados "anticuerpos humanizados") (véase por ejemplo, Shalaby et al., J. Exp. Med. 175 (1992), 217; Mocikat et al., Trasplantation 57 (1994), 405).

- La preparación de los diferentes tipos de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos mencionados anteriormente es evidente para el experto en la materia. La preparación de anticuerpos monoclonales, preferiblemente de origen mamífero, por ejemplo, humano, de rata, de ratón, de conejo o de cabra, puede realizarse mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, los descritos en Köhler y Milstein (Nature 256 (1975), 495), en Harlow y Lane (Antibodies, A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor) o en Galfré (Meth. Enzymol. 73 (1981), 3).

Además, es posible preparar los anticuerpos descritos mediante tecnología de ADN recombinante de acuerdo con técnicas obvias para el experto en la materia (véase Kurucz et al., J. Immunol. 154 (1995), 4576; Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 6444).

La preparación de anticuerpos que tienen dos especificidades diferentes, los denominados anticuerpos biespecíficos, se puede realizar por ejemplo utilizando tecnología de ADN recombinante, pero también mediante la denominada técnica de fusión de hibridoma híbrido (véase por ejemplo, Milstein et al., Nature 305 (1983), 537). Esta técnica comprende la fusión de líneas celulares de hibridoma que producen cada una anticuerpos que tienen una de las especificidades deseadas y la identificación y aislamiento de líneas celulares recombinantes que producen anticuerpos que tienen ambas especificidades.

El problema que forma la base de la invención puede superarse utilizando, en realizaciones preferidas, anticuerpos biespecíficos trifuncionales o anticuerpos triespecíficos trifuncionales si presentan las propiedades y efectos descritos en este documento. La presente invención se describe en particular mediante anticuerpos biespecíficos trifuncionales. Sin embargo, se entiende que también abarca los siguientes anticuerpos triespecíficos que presentan efectos similares. A pesar de lo anterior, los términos "anticuerpo" o "proteína de andamiaje" pueden referirse a un anticuerpo biespecífico trifuncional, se entiende que también abarca los siguientes anticuerpos triespecíficos que presentan efectos similares.

La preparación de anticuerpos que muestran tres especificidades, denominados anticuerpos triespecíficos, también adecuados para resolver el problema de la invención, puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el acoplamiento de un tercer sitio de unión al antígeno con especificidad adicional, por ejemplo, en forma de "fragmentos variables de cadena simple" (scFv), a una de las cadenas pesadas de IgG de un anticuerpo biespecífico. Además, puede emplearse tecnología recombinante, por ejemplo, procedimientos basados en vectores para la síntesis de proteínas o de oligonucleótidos.

De manera análoga, las construcciones F(ab)₂ triespecíficas pueden prepararse reemplazando las regiones CH₂-CH₃ de la cadena pesada de una especificidad de un anticuerpo biespecífico por un scFv que tiene una tercera especificidad, mientras que las regiones CH₂-CH₃ de la cadena pesada que tiene la otra especificidad pueden eliminarse, por ejemplo, mediante la inserción de un codón de parada (en el extremo de la región "bisagra" 5) en el gen codificante, por ejemplo, mediante recombinación homóloga.

También es posible preparar construcciones de scFv triespecíficas en las que tres regiones VH-VL que representan tres especificidades diferentes se disponen en serie.

Los anticuerpos biespecíficos intactos se componen de dos semimoléculas de anticuerpo (cada una con una cadena de inmunoglobulina H y una L), representando cada una una especificidad, y además, como los anticuerpos normales, tienen una parte Fc que realiza las funciones efectoras conocidas. Se preparan preferiblemente utilizando la tecnología del cuadro. Este procedimiento de preparación se ejemplifica en el documento DE-A-44 19 399. Para una divulgación completa, este documento se incorpora en su totalidad por referencia, también con respecto a la definición de anticuerpos biespecíficos. Cabe destacar que otros procedimientos de preparación también son útiles si conducen a la obtención de los anticuerpos biespecíficos intactos, según la definición anterior, requerida por la invención.

Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos biespecíficos intactos en cantidades suficientes utilizando un procedimiento de preparación recientemente desarrollado (Lindhofer et al., 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, tales 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 permanezcan sin identificar.

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 están unidos, ni se unen por ningún otro medio como partículas magnéticas o perlas magnéticas, que podrían haberse utilizado en la técnica como herramienta para eliminar los asociados que se forman mediante la unión de dichos anticuerpos a las células tumorales y, opcionalmente, también a las células inmunitarias. Además, la técnica anterior describe el marcaje de las células tumorales o los anticuerpos con, por ejemplo, sustancias cromogénicas como fluorocromos, seguido de la clasificación celular, como la citometría de flujo. Por el contrario, el principio de la invención reside en la formación de redes tridimensionales (asociados), como se describió anteriormente, de un tamaño suficiente para ser retenidas por filtros o separadas por fuerzas centrífugas, y la eliminación directa de dichas redes mediante medios mecánicos como la filtración, la centrifugación o una combinación de ambas. El tamaño de los asociados formados por la interacción con los anticuerpos es tal que permite su eliminación mediante filtración o centrifugación. Las realizaciones con perlas magnéticas o herramientas similares que se unen a los anticuerpos o a las células tumorales como medio auxiliar indirecto para eliminar las asociaciones entre los anticuerpos y las células tumorales pueden combinarse con la presente invención. También pueden combinarse con la presente invención procedimientos de separación como la citometría de flujo, en la que las células tumorales se separan de las células normales.

Los términos "asociados", "complejos multicelulares" y "agregados" se utilizan indistintamente y siempre definen una red tridimensional entre anticuerpos y/o proteínas de andamiaje, células tumorales y/o células inmunitarias y/u otras células tumorales para formar células tumorales reticuladas que se pueden eliminar mediante centrifugación, filtración o una combinación de ambas. Dichos asociados están compuestos específicamente por anticuerpos, células tumorales y células inmunitarias, que son leucocitos y/o células positivas al receptor Fc.

El periodo de tiempo utilizado en la presente invención es de 10 a 240 minutos, preferiblemente de 10 a 180 minutos, para obtener la sangre recuperada intraoperatoriamente que contiene dichos agregados celulares. En la presente invención, el periodo de contacto también es preferiblemente, de entre 20 y 210 minutos, más preferiblemente, de entre 30 y 180 minutos, e incluso más preferiblemente, de entre 30 y 120 minutos. En este sentido, se ha observado que dicho periodo de tiempo es sorprendentemente crítico para lograr los efectos deseados. Cuando dicho periodo de tiempo es inferior a 10 minutos, la formación de los agregados no es suficiente. Cuando el periodo de tiempo es superior a 180 minutos, los anticuerpos unidos a las células inmunitarias podrían iniciar procesos inmunológicos. En particular, cuando el periodo de tiempo es superior a 240 minutos, se podría observar el inicio de procesos inmunológicos no deseados. La temperatura es preferiblemente la temperatura ambiente, que puede variar de 19 °C a 25 °C, preferiblemente aproximadamente 21 °C.

Los productos sanguíneos obtenidos mediante el uso del procedimiento de la invención son, según una realización preferida, son readministrados a continuación al paciente del cual se obtuvo la muestra de sangre de partida, lo que no causaría efectos secundarios graves.

Poner en contacto el anticuerpo y/o la proteína de andamiaje con la IBS

Preferiblemente, siempre que cualquiera de los anticuerpos no sea capaz de unirse a células inmunitarias, sino sólo a antígenos idénticos o diferentes asociados a un tumor, es de importancia crucial que exista una reticulación entre al menos dos células tumorales diferentes para obtener asociados entre el anticuerpo y al menos dos células tumorales.

Los términos "asociados", "complejos multicelulares" y "agregados" se utilizan indistintamente y siempre definen una red tridimensional entre anticuerpos, proteínas de andamiaje, células tumorales y/o células inmunitarias, y/u otras células tumorales, para formar células tumorales reticuladas que se pueden eliminar mediante centrifugación o filtración o una combinación de ambas. Dichos asociados están compuestos específicamente por anticuerpos, células tumorales y leucocitos.

Preferiblemente, dicho al menos un anticuerpo se pone en contacto con dicha sangre recuperada obtenida intraoperatoriamente durante un tiempo suficiente para reticular células tumorales y, opcionalmente, células inmunitarias y/u otras células tumorales para obtener asociados. Preferiblemente, dichas células tumorales y dichas células inmunitarias están presentes en dicha sangre recuperada obtenida intraoperatoriamente. Dichas células tumorales pueden ser reconocidas específicamente por dicho al menos un anticuerpo o dicha al menos una proteína de andamiaje.

El periodo de tiempo que es necesario para lograr dicha reticulación puede ser determinado por un experto en la materia mediante procedimientos rutinarios. El tiempo de tiempo utilizado en la invención es de 10 a 240 minutos, preferiblemente, de 10 a 180 minutos. Preferiblemente, el tiempo de contacto es de entre 10 y 118 minutos, más preferiblemente, de entre 20 y 90 minutos, e incluso más preferiblemente, de entre 30 y 60 minutos. La temperatura es preferiblemente la temperatura ambiente, que puede variar de 19 °C a 25 °C, preferiblemente aproximadamente 21 °C.

La cantidad de anticuerpos que debe aplicarse para obtener dichos asociados que comprenden anticuerpos puede ser determinada por un experto en la materia mediante mediciones rutinarias. La cantidad de anticuerpo y/o proteína de andamiaje que debe aplicarse generalmente depende de la afinidad de unión del anticuerpo y/o proteína de andamiaje con dicho antígeno tumoral. Preferiblemente, las cantidades adicionales son de 1 µg a 20 µg por litro de IBS, más preferiblemente, de 1 µg a 10 µg por litro de IBS, de 1 µg a 5 µg por litro de IBS o de 1 µg a 2 µg por litro de IBS.

Preferiblemente, se aplican al menos dos anticuerpos y/o proteínas de andamiaje diferentes cuya especificidad de antígeno tumoral o especificidad de marcador de superficie panleucocitario difiere entre sí, siempre que al menos uno de los anticuerpos se encuentre dentro de las limitaciones de la reivindicación 1.

Eliminación de células tumorales y asociados de anticuerpos/proteínas de andamiaje de la IBS

Los asociados se eliminan finalmente de dicha sangre recuperada intraoperatoriamente (IBS) para obtener una IBS esencialmente libre de células tumorales. El agotamiento de dichos agregados celulares se logra preferiblemente mediante centrifugación, mediante filtración o una combinación de ambas. En un procedimiento preferido, se incluyen al menos una etapa de centrifugación y, preferiblemente, además, al menos una etapa de filtración.

La filtración es preferiblemente una filtración por reducción o agotamiento de leucocitos, en la que todos los leucocitos contaminados por dichas células tumorales son totalmente eliminados o sustancialmente eliminados, mientras que los eritrocitos pasan el filtro y se recogen. Los filtros pueden seleccionarse entre filtros de malla con tamaños de poro de entre 20 µm y 40 µm, que retienen los asociados formados mediante el procedimiento de la invención, y también, por ejemplo, hebras de fibrina y grumos de células muertas. Los eritrocitos con un tamaño aproximado de 8 µm pueden pasar a través de los filtros. Los filtros de microagregados se utilizan preferiblemente para la reinfusión de sangre autóloga desprendida, recogida durante o después de una cirugía. Para recibir glóbulos rojos con leucocitos reducidos, también se puede utilizar la filtración a través de un filtro estándar de administración de sangre con un tamaño de poro de entre 170 µm y 260 µm.

Se presenta una revisión que describe los dispositivos Cell Saver que incluyen procedimientos de separación que es 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., que se incorpora íntegramente por referencia.

Un ejemplo de un filtro de sangre de microagregados para recibir solamente una fracción que contiene eritrocitos es el filtro de transfusión de sangre Pall SQ 40S.

Preferiblemente, la centrifugación se realiza mediante una etapa de centrifugación en gradiente de densidad, seguida de un lavado con, por ejemplo, solución salina fisiológica durante un tiempo y con una velocidad de rotación suficientes para eliminar dichos asociados que comprenden células tumorales y para separar los eritrocitos de dichos asociados de células tumorales y de los leucocitos.

Preferiblemente, la filtración se realiza generalmente durante un período de tiempo suficiente para eliminar al menos sustancialmente dichos asociados que comprenden células tumorales y para separar los eritrocitos de dichos asociados de células tumorales y de los leucocitos.

En una realización preferida, dicho concentrado de eritrocitos que está libre o sustancialmente libre de células tumorales contaminantes se utiliza sin adición de solución salina fisiológica.

Se pueden utilizar etapas de filtración adicionales para eliminar asociados residuales y/o leucocitos.

Como la tecnología de filtración de leucocitos subyacente es diferente de los procedimientos de filtración clásicos con clasificación micrométrica, incluidos los problemas de obstrucción, esta estrategia avanzada de eliminación de células tumorales parece ser factible.

Una de las ventajas de la invención es que el tiempo, la complejidad, la selectividad y la intensidad de la manipulación implicada en dicha eliminación de células tumorales se reduce drásticamente mediante la invención en comparación con el agotamiento de células tumorales por destrucción con anticuerpos o por eliminación con perlas magnéticas o procedimientos de irradiación o clasificación de células, lo que hace que la eliminación de células tumorales sea factible durante el lapso de tiempo limitado durante la cirugía tumoral.

Otras ventajas de la presente invención incluyen una reducción notable de las células tumorales del concentrado de eritrocitos producido a partir de sangre intervenida, así como una disminución significativa de las citocinas proinflamatorias producidas en el campo quirúrgico por traumatismos quirúrgicos. Además, el anticuerpo trifuncional residual puede reducirse a una cantidad no crítica en el concentrado final de EC listo para la reinfusión.

Preferiblemente, los productos sanguíneos obtenidos utilizando el procedimiento de la invención se vuelven a administrar a continuación al paciente del cual se obtuvo la muestra de sangre de partida.

Figuras

Figura 1: Se muestra el principio de la formación de grandes complejos multicelulares, inducidos por el anticuerpo trifuncional utilizado en la presente invención, por ejemplo, el anticuerpo anti-CD52 x anti-EpCAM. Dicha formación de complejos permite la eliminación de células tumorales mediante etapas de procesamiento intraoperatorias específicas del dispositivo de toma de muestras de sangre (por ejemplo, centrifugación y filtración).

Figura 2: Dibujos esquemáticos de formatos representativos de anticuerpos que tienen la capacidad de formar complejos multicelulares que consisten en células tumorales y leucocitos de sangre periférica (es decir, células inmunitarias). Los dibujos se tomaron de Jin P y Z Zhu. En: Bispecific Antibodies. Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht Londres Nueva York, págs. 151-170 (2011) y se han modificado ligeramente. Solo los anticuerpos cubiertos por la presente reivindicación 1 se incluyen en la invención; todos los demás formatos de anticuerpos se describen solo con fines informativos.

Figura 3: Realización de ejemplo de un procedimiento de la invención que utiliza un anticuerpo biespecífico trifuncional (BsAb) de la presente invención, por ejemplo, anticuerpo anti-CD52 x anti-EpCAM.

Figura 4: Densidad celular viable (VCD, *Viable Cell Density*) y viabilidad (VIA) en cultivos con alimentación discontinua. Réplicas F1-F4 en matraces de 1 litro.

5 Figura 5. Cromatograma AC de la purificación del anticuerpo biespecífico PGB0005.

Figura 6. Anticuerpo biespecífico PGB0005 tratado con DTT - cadenas ligeras.

Figura 7. Anticuerpo biespecífico PGB0005 tratado con DTT - cadenas pesadas.

10

Figura 8. Anticuerpo biespecífico PGB0005 tratado con PNGasa F y DTT - cadenas pesadas.

Figura 9. Análisis por SDS-PAGE del anticuerpo biespecífico PGB0005 purificado. Carriles 1 y 12: blanco de FB; carriles 2-6: condiciones reductoras; carriles 7-12: condiciones no reductoras; carriles 4 y 9: enzima PNGasa F; carriles 2 y 11: anticuerpo biespecífico PGB0005 no desglicosilado; carriles 3, 5, 6, 7, 8 y 10: anticuerpo biespecífico PGB0005 desglicosilado.

15

Figura 10. Actividad de unión del anticuerpo biespecífico PGB0005 al receptor Fc γ (receptor Fc gamma).

20 Figura 11. Actividad de unión a EpCAM del anticuerpo biespecífico PGB0005 con: (a) todos los puntos de datos incluidos y (b) un único punto de datos de efecto Hook eliminado.

Figura 12. Actividad de unión a CD52 del anticuerpo biespecífico PGB0005 con (a) solución tampón con pH = 6,1 y (b) solución tampón con pH = 7,4. Anticuerpos de detección BsAb FITC antirratón y BsAb FITC antirata utilizados en los ensayos.

25

Ejemplos

A continuación, se describe un ejemplo para la realización de la invención. Un experto en la materia que siga este enfoque obtendrá inevitablemente el beneficio reivindicado. Siguiendo este ejemplo, se pueden realizar diversas modificaciones sin desviarse de la invención, cuyo alcance se define en las reivindicaciones adjuntas.

30

Eliminación de células tumorales mediada por anti-EpCAM a través del agotamiento de complejos multicelulares por centrifugación y/o filtración durante IBS

35

Los perfiles de expresión de la glicoproteína transmembrana EpCAM, clasificados mediante tinción de microarray tisulares, se observan en carcinomas de diversos tumores (Tabla 3). Este amplio patrón de expresión de EpCAM representa una característica distintiva interesante de los carcinomas que podría ser importante no solo para aplicaciones terapéuticas, sino también para mejorar los protocolos de IBS durante las cirugías oncológicas. Sin embargo, cabe destacar que la mayoría de los tumores de tejidos blandos y todos los linfomas fueron completamente negativos a EpCAM.

40

Tabla 3. Microarray de tejidos: perfil de expresión de EpCAM en varias entidades tumorales

Entidad tumoral	Número de muestras (n)	Expresión negativa (%)	Expresión débil/moderada [#] (%)	Expresión fuerte* (%)
Próstata¹				
	414	1,9	10,9	87,2
Colon¹				
	1186	0,3	1,9	97,7
Pulmón¹				
	1287	13,5	22,5	63,9
Gástrico¹				
	473	2,5	6,8	90,7
Ovario¹				
	272	2,6	12,1	85,3

¹ Datos tomados de Went et al, Brit. J. Cancer 94: 128, 2006.

² Datos tomados de Spizzo et al., Gynecological Oncology 103: 483, 2006

[#]Puntuación 1-4; La expresión de EpCAM se definió calculando la puntuación total de tinción como el producto de la puntuación de proporción (0-4) y la puntuación de intensidad (0-3). La puntuación de proporción describió la fracción estimada de células tumorales con tinción positiva (0, ninguna; 1, <10 %; 2, 10-50 %; 3, 50-80 %; 4, >80 %). La puntuación de intensidad representó la intensidad estimada de la tinción (0, sin tinción; 1, débil; 2, moderada; 3, fuerte).

* Puntuación > 4; la puntuación total de expresión varió de 0 a 12; por lo tanto, la sobreexpresión de EpCAM se definió como una puntuación total > 4.

Ejemplo 1**1. Obtención de un anticuerpo biespecífico trifuncional anti-CD52 x anti-EpCAM**

En la estructura principal de un anticuerpo biespecífico trifuncional, el parátipo antilinfocito se intercambió por el parátipo de una región variable específica anti-CD52 que se une a los leucocitos. La secuencia de las regiones variables específicas anti-CD52 (cadenas de IgG H+L) está publicada por Crowe et al. (Clin Exp Immunol, vol. 87, 1992, Figura 2).

Los genes codificantes de anticuerpos de los genes de Ig de cadena pesada y ligera que representan el semianticuerpo anti-EpCAM, así como los genes de cadena pesada y ligera que representan el semianticuerpo anti-CD52, se transfirieron a una línea celular CHO. El anticuerpo trifuncional con las especificidades anti-EpCAM y anti-CD52 secretado en el sobrenadante de células CHO transfectadas en cultivo se purificó mediante procedimientos cromatográficos estándar.

Para verificar la funcionalidad de los dos brazos de unión, se realizó un análisis citométrico de flujo de la unión a dos líneas celulares diferentes que expresaban EpCAM o CD52.

2. Evaluación de la unión del anticuerpo biespecífico trifuncional anti-CD52 x anti-EpCAM a diferentes antígenos diana

La unión de anticuerpos se evaluó mediante análisis FACS. Se incubaron 5×10^5 células diana (células Jurkat CD52-positivas o células HCT-8 EpCAM-positivas) a 2-8 °C durante 60 min a las concentraciones de anticuerpos indicadas. Las células diana se resuspendieron en tampón PBS. A continuación, las células se lavaron dos veces y la unión del anticuerpo en la célula se detectó con anticuerpos de detección secundaria de rata anti-IgG de ratón (células Jurkat) o ratón anti-IgG de rata (células HCT-8) marcados con fluorescencia (FITC) (Dianova). Las células teñidas positivamente se evaluaron utilizando un citómetro FACS-Calibur (Becton Dickinson).

3. Evaluación de la unión del anticuerpo anti-CD52 x anti-EpCAM biespecífico trifuncional a los receptores Fc-gamma

La unión de anticuerpos se evaluó mediante análisis FACS. Se incubaron 5×10^5 células diana (células THP-1 positivas al receptor Fc-gamma) a 2-8 °C durante 60 min a las concentraciones de anticuerpos indicadas. Las células diana se resuspendieron en tampón PBS. A continuación, se lavaron las células dos veces y se detectó la unión de anticuerpos con anticuerpos de detección secundaria F(ab)2 de cabra anti-F(ab)2 de IgG de ratón marcados con fluorescencia (FITC) (Dianova). Las células con tinción positiva se evaluaron con un citómetro FACS-Calibur (Becton Dickinson).

Ejemplo 2**1. Estructura de la molécula diana**

El anticuerpo biespecífico PGB0005 es un anticuerpo trifuncional de rata/ratón diseñado para dirigirse a los receptores CD52 y EpCAM con sus regiones variables. La región variable original del semianticuerpo de rata se ha intercambiado por una dirigida a CD52, derivada de la secuencia Campath descrita en la literatura. El semianticuerpo de ratón de Catumaxomab con una región variable dirigida a EpCAM no se modificó. Las secuencias génicas de ambos semianticuerpos se optimizaron para la expresión de CHO.

2. Cultivo discontinuo**Procedimiento:**

El grupo de células estable PGB0005 se cultivó en medio de alimentación discontinua Excell-Advanced en cuatro matraces de 1 litro con volúmenes de trabajo de 300 ml, con una siembra inicial a una densidad celular de $0,5 \times 10^6$ células/ml. Los medios de alimentación de refuerzo celular 7a y 7b se añadieron diariamente al 3 % y al 0,3 % del volumen de trabajo, respectivamente, a partir del tercer día del proceso de cultivo.

Resultados:

Se alcanzó una densidad celular máxima de aproximadamente 23×10^6 células/ml el día 9 del proceso de cultivo. La viabilidad celular descendió por debajo del 90 % el día 11, y el cultivo se recogió el día 12 con una densidad celular viable promedio en los cuatro matraces de 23×10^6 células/ml y una viabilidad promedio del 86 % (Figura 4).

3. Purificación**Procedimiento:**

Se purificó 1 litro de sobrenadante de cultivo mediante cromatografía de afinidad isocrática. Se utilizó resina MabSelect Sure, con un volumen de columna de 42 ml. Se utilizó citrato de sodio 0,1 M como tampón de elución, con las siguientes condiciones para la separación de las fracciones de anticuerpos: pH 5,8 para la elución del anticuerpo parental de rata, pH 5,15 para la elución del anticuerpo biespecífico diana PGB0005 y pH 3,5 para la elución del anticuerpo parental de ratón.

Resultados:

El anticuerpo biespecífico diana se separó con éxito de ambos anticuerpos parentales (Figura 5).

4. Análisis de calidad

Antes de iniciar la producción de cultivo en alimentación discontinua de la muestra descrita, se confirmó la identidad de la proteína producida por el grupo de células estables PGB0005 mediante LC-MS. La muestra de anticuerpo biespecífico PGB0005 purificado, producida en alimentación discontinua, se analizó mediante SDS-PAGE y se probó su actividad de unión al receptor Fcγ, actividad de unión a EpCAM y actividad de unión a CD52.

4.1. Análisis LC-MS de una muestra producida por un grupo de células estables purificadas

Procedimiento:

La muestra del anticuerpo biespecífico PGB0005, producida en un cultivo en matraz y purificada mediante cromatografía de AC, se analizó mediante LC-MS. Antes del análisis por LC-MS, la muestra se sometió a dos tratamientos: 1) desnaturalización seguida de desglicosilación mediante tratamiento con PNGasaF y tratamiento con DTT, y 2) desnaturalización seguida de tratamiento con DTT. Posteriormente, las muestras se inyectaron en una columna BEH C4 para su separación y se analizaron mediante un espectrómetro de masas Q-Tof. La información sobre el peso molecular teórico de la proteína diana se muestra en la Tabla 1. La información sobre el peso molecular teórico tras las modificaciones postraduccionales se muestra en las Tablas 2 y 3.

Tabla 4. Valores de peso molecular esperado (no reducido) para los componentes del anticuerpo biespecífico PGB0005

Nombre	PM (Da)
Cadena ligera anti-DC52	23175,9
Cadena ligera anti-EpCAM	24424,8*
Cadena pesada anti-DC52	49850,4
Cadena pesada anti-EpCAM	50021,8

Tabla 5. Peso molecular esperado para la cadena pesada anti-CD52 con modificaciones posteriores a la traducción. pQ N-terminal – modificación con piroglutamina N-terminal, -Lys C-terminal – pérdida de lisina C-terminal, +GOF – Glicano GOF

Nombre	PM (Da)
Cadena pesada anti-CD52	49850,4
pQ N-terminal	-17
-Lys C-terminal	-128,2
+GOF	1445,3
Valor esperado	51150,5

Tabla 6. Peso molecular esperado para la cadena pesada anti-EpCAM con modificaciones posteriores a la traducción. pE N-terminal – modificación con ácido piroglutámico N-terminal, -Lys C-terminal – pérdida de lisina C-terminal, +GOF – Glicano GOF, +G1F – Glicano G1F

Nombre	PM (Da)
Cadena pesada anti-EpCAM	50021,8
pQ N-terminal	-18
-Lys C-terminal	-128,2
+GOF	1445,3
+G1f	1607,5
Valor esperado +GOF	51320,9
Valor esperado +G1F	51483,1

Tabla 7. Peso molecular esperado para la cadena pesada anti-CD52 con modificaciones posteriores a la traducción, pero sin N-glicano. pQ N-terminal – modificación con piroglutamina N-terminal, -Lys C-terminal – pérdida de lisina C-terminal,

Nombre	PM (Da)
Cadena pesada anti-EpCAM	49850,4

pQ N-terminal	-17
-Lys C-terminal	-128,2
PM esperado	49705,2

Resultados:

Se identificaron cadenas ligera anti-CD52 y cadenas ligera anti-EpCAM mediante MS en la muestra no tratada con PNGasa F (Figura 6). El peso molecular empírico obtenido para la cadena ligera anti-CD52 fue de 23 177,0 Da, lo cual se corresponde bien con el peso molecular teórico de 23175,9 Da (Tabla 4). El peso molecular empírico obtenido para la cadena ligera anti-CD52 fue de 24426,0 Da, lo cual se corresponde bien con el peso molecular teórico de 24424,8 Da (Tabla 1).

Se identificó la cadena pesada glicosilada anti-CD52, con un peso molecular de 51156,0 Da (Figura 7), lo cual se corresponde bien con el valor teórico de 51150,5 Da para la cadena pesada anti-CD52 cuando se tienen en cuenta las modificaciones postraduccionales (Tabla 5). Se identificaron dos picos de MS de 51156,0 Da y 51487,0 Da (Figura 7), correspondientes a los pesos moleculares esperados de la cadena pesada anti-EpCAM con glicosilación de GOF (51320,9 Da) y la glicosilación de G1F (51483,1 Da), respectivamente (Tabla 6). La discrepancia entre los valores esperados y observados de aproximadamente 6 Da para la cadena pesada anti-EpCAM glicosilada con GoF, y de aproximadamente 4 Da para la cadena pesada anti-EpCAM glicosilada con G1F, podría explicarse por la apertura del enlace disulfuro debido al tratamiento con DTT. Dado que la diferencia de masa entre la cadena pesada anti-EpCAM con glicosilación de GOF y la cadena anti-CD52 con glicosilación de G1F es inferior a 10 Da, es posible que sus señales interfieran entre sí.

En la Figura 8, el pico observado de 49712,0 Da era coherente con el peso molecular esperado de la cadena pesada anti-CD52 de 49705,2 Da (Tabla 7). La diferencia de aproximadamente 6 Da podría explicarse por la apertura del enlace disulfuro debido al tratamiento con DTT.

4.2. Análisis por SDS-PAGEProcedimiento:

La muestra de PGB0005 purificada se dividió en dos lotes: 1) no desglicosilada y 2) desglicosilada (tratamiento con PNGasa F). Ambos lotes se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS en condiciones reductoras y no reductoras.

Resultados:

Se observan dos bandas de cadena pesada con un PM de aproximadamente 50 kD en el carril 2 (muestra no desglicosilada) y en los carriles 3, 5 y 6 (muestra desglicosilada). Las bandas de cadena pesada del carril 2 (no desglicosilada) tienen un PM menor que las de los carriles 3, 5 y 6 (desglicosilada) (Figura 9).

Dos bandas de cadena ligera, con un peso molecular de aproximadamente 25 kD, están sembradas en los carriles 2, 3, 5 y 6.

Se observan dos bandas principales, con pesos moleculares de aproximadamente 150 kD y 200 kD respectivamente, en los carriles 7, 8, 10 y 11. Las bandas son de menor peso molecular en el carril 11 (no desglicosilada) en comparación con los carriles 7, 8 y 10 (desglicosilada).

Se observan tres bandas adicionales, con pesos moleculares de aproximadamente 120 kD, 85 kD y 22,5 kD respectivamente, en los carriles 7, 8, 10 y 11.

4.3. Actividad de unión del receptor FcγProcedimiento:

La muestra de anticuerpo biespecífico purificado PGB0005 se analizó para determinar la actividad de unión al receptor Fcγ mediante citometría de flujo (FACS).

Se utilizó una suspensión de cultivo celular THP-1 a una densidad de 4×10^6 células/ml, a razón de 50 µl por pocillo. Las concentraciones de la muestra de trabajo utilizadas para el anticuerpo biespecífico PGB0005 se encontraban en el intervalo de 0,0017 a 100 µg/ml, a razón de 50 µl por pocillo.

La reacción de unión se desarrolló durante 1 hora a 2-8 °C. Se utilizó PBS a pH 7,4 como tampón de dilución y PBS a pH 7,4 con 2 % de FBS como tampón de lavado.

Se utilizó como anticuerpo de detección el fragmento F(ab')₂ de cabra antirratón con FITC específico. La reacción de detección de anticuerpos se llevó a cabo durante 30 minutos a 2-8 °C.

Resultados:

El anticuerpo biespecífico PGB0005 muestra actividad de unión al receptor Fcγ (Figura 10).

4.4. Actividad a unión de EpCAM

Procedimiento:

La muestra de anticuerpo biespecífico purificado PGB0005 se analizó para determinar la actividad de unión a EpCAM mediante citometría de flujo (FACS).

Se utilizó un cultivo de células adherentes HCT-8 a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/ml, a razón de 100 µl por pocillo. Las concentraciones de la muestra de trabajo utilizadas para el anticuerpo biespecífico PGB0005 se encontraban en el intervalo de 0,0017 a 100 µg/ml, a razón de 50 µl por pocillo.

La reacción de unión se desarrolló durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizó PBS a pH 7,4 con 2 % de FBS como tampón de dilución y también como solución de limpieza celular.

Se utilizó anticuerpo de ratón anti-(H+L) de rata con FITC como anticuerpo de detección.

La reacción de detección de anticuerpos se desarrolló durante 30 minutos a 2-8 °C.

Resultados:

El anticuerpo biespecífico PGB0005 muestra actividad de unión a EpCAM (Figura 11). Se eliminó un único punto de datos en una concentración de 100 µg/ml debido al efecto Hook.

4.5. Actividad de unión a CD52

Procedimiento:

Se analizaron muestras de anticuerpo biespecífico PGB0005 purificado, disueltas en tampón PBS a dos valores de pH diferentes (7,4 y 6,1), para determinar la unión a CD52 mediante citometría de flujo (FACS). Se utilizaron dos anticuerpos de detección diferentes. Se realizaron dos experimentos replicados.

Se utilizó una suspensión de cultivo celular Ramos a una densidad de 4×10^6 células/ml, a razón de 50 µl por pocillo. Las concentraciones de muestra de trabajo utilizadas para las muestras de anticuerpo biespecífico PGB0005 se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 8: Concentraciones de muestra de trabajo para los experimentos de ensayo de unión a CD52

Réplica	Tampón	pH	Concentración de trabajo de BsAb
1	PBS	pH 7,4	0,0203-1196,9 µg/ml
1	PBS	pH 6,1	0,0172-1014,0 µg/ml
2	PBS	pH 7,4	0,0172-1017,2 µg/ml
2	PBS	pH 6,1	0,0147-867,6 µg/ml

La reacción de unión se desarrolló durante 1 hora a 2-8 °C. Se utilizaron también tampones de muestra (PBS a pH 7,4 o pH 6,1) como tampones de dilución, y se utilizó PBS a pH 7,4 con 2 % de FBS como tampón de lavado. Se utilizaron anti-(H+L) rata de ratón con FITC y anti-(H+L) ratón de rata con FITC como anticuerpos de detección.

Las reacciones de detección de anticuerpos se llevaron a cabo durante 30 minutos a 2-8 °C.

Resultados:

El anticuerpo biespecífico PGB0005 muestra actividad de unión a CD52 a valores de pH de 6,1 y 7,4 (Figura 12). El anticuerpo de detección de rata anti-ratón parece unirse con mayor fuerza al anticuerpo biespecífico diana en comparación con el anticuerpo de detección de ratón anti-rata. Los resultados son coherentes entre dos experimentos independientes.

Resumen

Ambas muestras de sangre de pacientes con cáncer purificadas con el sistema Cell Saver y el anticuerpo biespecífico trifuncional anti-CD52 x anti-EpCAM no mostrarán o sustancialmente no mostrarán células tumorales restantes detectables (0) en los concentrados de eritrocitos. Además, las citocinas que son secretadas durante la cirugía disminuirán significativamente en el concentrado de eritrocitos después del procedimiento descrito, lo que no representa ningún riesgo de seguridad para el paciente. Cabe destacar que el anticuerpo anti-CD52 x anti-EpCAM residual no será detectable o sustancialmente no será detectable en los concentrados de eritrocitos producidos, ni siquiera con un procedimiento ELISA de alta sensibilidad (límite de detección: 250 pg/ml), lo que confirma la seguridad para los potenciales pacientes que reciben estos concentrados de eritrocitos autólogos purificados.

Conclusiones

Debido a los potenciales riesgos de infección por virus probados y no probados, y otros riesgos a través de transfusiones de sangre alogénica, la creciente demanda y las necesidades económicas, la recuperación intraoperatoria de sangre cobra mayor interés en los programas de gestión de sangre de los hospitales. Sin embargo, el uso de la autotransfusión intraoperatoria en cirugías mayores de cáncer se ha visto limitado debido a la probabilidad de reinfusión de células tumorales al paciente, lo que conduce a aumentar la incidencia de recurrencia.

Se ha descubierto que el anticuerpo anti-CD52 x anti-EpCAM, con su capacidad de unión a células carcinomatosas, leucocitos y células accesorias, media la formación de complejos multicelulares que podrían eliminarse fácilmente mediante centrifugación y/o filtración de leucocitos, etapas convencionales para la eliminación de leucocitos. La invención muestra la capacidad potencial de eliminación de células tumorales/leucocitos mediada por el anticuerpo anti-CD52 x anti-EpCAM durante la recuperación de sangre intraoperatoria mediante el uso, por ejemplo, de dispositivos automáticos como Cell Saver-5® o CATS®. La aplicación *in vitro* del anticuerpo anti-CD52 x anti-EpCAM representa un uso como dispositivo médico y producto médico, respectivamente, durante el proceso de recuperación de sangre intraoperatoria en cirugía oncológica.

A partir de estos datos experimentales, resulta evidente para un experto en la materia que este concepto probado experimentalmente también puede transferirse eficazmente a otros anticuerpos monoclonales, siempre que sean capaces de interactuar con células tumorales y, opcionalmente, con células inmunitarias y/u otras células tumorales para formar agregados o asociados que puedan eliminarse mediante, por ejemplo, filtración o centrifugación. Por estas razones, la presente invención no se limita a anticuerpos biespecíficos trifuncionales como el anticuerpo anti-CD52 x anti-EpCAM, que reconoce el antígeno asociado a un tumor EpCAM y el marcador panleucocitario CD52, y las combinaciones de isotipos específicos que se presentan en este documento; habiendo descrito en el presente documento el concepto de la presente invención, este puede transferirse fácilmente a otros anticuerpos y antígenos asociados a un tumor, tal como se describe en este documento, siempre que sean capaces de reconocer antígenos asociados a un tumor y de formar asociados eliminables.

En conjunto, la aplicación del procedimiento de la presente invención, por ejemplo, mediante el uso del anticuerpo anti-CD52 x anti-EpCAM para minimizar el riesgo de células tumorales autólogas residuales, sería un prerrequisito para realizar IBS durante la cirugía de cáncer.

En comparación con los procedimientos convencionales, la presente invención proporciona un procedimiento más rápido y con mejor eficiencia para la eliminación de células tumorales de sangre recuperada intraoperatoriamente. El anticuerpo descrito en la presente invención, en particular el anticuerpo biespecífico trifuncional, se une a leucocitos, células tumorales y células accesorias positivas al receptor gamma de Fc para formar una red tridimensional de anticuerpos, células tumorales, células inmunitarias y, además, opcionalmente, o adicionalmente, otras células tumorales. Dicho anticuerpo biespecífico trifuncional es capaz de unirse a antígenos panleucocitarios específicos, lo que permite la unión de diversos tipos de células sanguíneas, incluyendo células T, y casi hasta el 100 % de los linfocitos, con las células tumorales. Por lo tanto, en comparación con los otros procedimientos conocidos, por ejemplo, un procedimiento en el que el anticuerpo media únicamente la unión de células T con las células tumorales, el anticuerpo biespecífico trifuncional aquí descrito media una cantidad significativamente mayor de células sanguíneas, incluyendo leucocitos y linfocitos, mucho mayor que la cantidad de células T, para interactuar con las células tumorales en la sangre recuperada intraoperatoriamente, y, de este modo, las células tumorales se pueden eliminar de manera más eficiente. A este respecto, la presente invención es particularmente ventajosa en el caso en que el paciente con cáncer tiene una cantidad baja de células T en la sangre periférica, ya que los otros procedimientos conocidos que dependen de la unión de las células T con las células tumorales pueden no ser capaces de eliminar las células tumorales de manera eficiente, y la presente invención, sin embargo, no tiene tal limitación, porque dicho anticuerpo biespecífico trifuncional también se une con varios otros tipos de células sanguíneas, además de las células T.

Durante la incubación de anticuerpos en sangre para la eliminación de células tumorales, las citocinas podrían liberarse de las células inmunitarias y acumularse en concentrados de eritrocitos en determinadas circunstancias, a pesar de una etapa de lavado, lo que podría provocar potencialmente respuestas inmunitarias tras la transfusión de dichos concentrados de eritrocitos al paciente. En otros procedimientos conocidos para la eliminación de células tumorales de sangre recuperada intraoperatoriamente, en los que se media la unión de las células T con las células tumorales, en particular cuando dicha unión se realiza a través del antígeno específico de las células T CD3 o CD28, se podría liberar una gran cantidad de citocinas en la sangre en poco tiempo, lo que conduciría a una respuesta inflamatoria

grave en el paciente. En este sentido, si bien el uso del anticuerpo biespecífico trifuncional de la presente invención podría, en teoría, también conducir a una liberación de citocinas, el grado y la velocidad de dicha liberación deberían reducirse significativamente, lo que, por lo tanto, reduce notablemente el riesgo de aparición de una respuesta inflamatoria grave causada por las citocinas liberadas en la sangre de la operación.

Además, tal como se explicó anteriormente, el anticuerpo descrito en la presente invención, en particular el anticuerpo biespecífico trifuncional, media la interacción de un gran número de células sanguíneas, incluyendo leucocitos y linfocitos, con las células tumorales. Por lo tanto, en comparación con otros procedimientos conocidos, en los que, por ejemplo, solo las células T son mediadas para interactuar con las células tumorales, el anticuerpo aquí descrito tiene el potencial de formar asociaciones y/o agregados más grandes con las células sanguíneas. Además, el anticuerpo aquí descrito se une a antígenos leucocitarios que no se expresan en la superficie de los eritrocitos, lo que evita por tanto la unión con eritrocitos. En particular, se ha demostrado que el anticuerpo de la presente invención, que se une a CD52, no se une a los eritrocitos. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención separa eficazmente las células tumorales de los eritrocitos antes de reintroducir la sangre purificada al paciente.

Filtros de transfusión sanguínea para la cama/laboratorio del hospital (www.pall.com/medical_6595.asp)

Producto(s)	Indicación	Rendimiento (leucocitos residuales/unidad)
Glóbulos rojos Purecell® RCEZ (gravity prime), Purecell RCQ (gravity prime/rapid flow setting), Purecell RCXL1	Filtración en cama de una unidad de glóbulos rojos empaquetada o sangre completa	Promedio constante < 2×10^5
Purecell RCXL2	Filtración en cama de dos unidades de glóbulos rojos empaquetadas o una unidad de sangre completa	Promedio constante < 2×10^5
Plaquetas Purecell® PXLA	Filtración de una única unidad de plaquetas de aféresis producida en sistemas que utilizan protocolos diseñados para producir un nivel inicial de reducción de leucocitos	Promedio constante < 3×10^4
Purecell PL6 (gravity prime)	Filtración en cama de un conjunto de hasta 6 concentrados de plaquetas de donantes aleatorios o unidad de aféresis estándar	Promedio constante < 5×10^5
Purecell PXL8	Filtración en cama de un conjunto de 3 a 8 concentrados de plaquetas de donantes aleatorios o unidad de aféresis estándar	Promedio constante < 5×10^5
Purecell PXL12	Filtración en cama de un conjunto de 8 a 12 concentrados de plaquetas de donantes aleatorios o unidad de aféresis estándar	Promedio constante < 5×10^5
Plasma Purecell LPS2	Filtración de hasta 1600 ml de plasma congelado nuevo	Promedio constante < 4×10^4
Filtro de microagregados Filtro para transfusión de sangre de microagregados Pall SQ40S	Para la transfusión de sangre completa, glóbulos rojos empaquetados, plaquetas y granulocitos Concentraciones y filtración de solución de almacenamiento en frío ViaSpan® (ViaSpan es una marca	No aplicable

	registradas de DuPont Merck Pharmaceutical Co.)	
Transfusión pediátrica/neonatal Purecell NEO	Filtración de una alícuota de hasta 60 ml de glóbulos rojos empaquetados	Promedio constante $< 2 \times 10^5$
Purecell PL1	Filtración de una unidad de concentrado de plaquetas derivado de una unidad de sangre completa	Promedio constante $< 4,5 \times 10^5$
Filtración de laboratorio de hospital Purecell BPF (gravity prime)	Filtración en laboratorio de una unidad de glóbulos rojos empaquetados o sangre completa	Promedio constante $< 5 \times 10^4$
Purecell LRF	Filtración en laboratorio de un conjunto de hasta 6 concentrados de plaquetas de donantes aleatorios o unidad de aféresis estándar	Promedio constante $< 5 \times 10^5$ (conjunto de plaquetas) $< 2 \times 10^5$ (unidad de aféresis estándar)
Pall LRF10	Filtración en laboratorio de un conjunto de hasta 10 concentrados de plaquetas de donantes aleatorios o unidad de aféresis estándar	Promedio constante $< 5 \times 10^5$

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento ex vivo para la eliminación de células tumorales de sangre recuperada intraoperatoriamente, que comprende las siguientes etapas:
 - 5 - proporcionar sangre recuperada intraoperatoriamente que puede contener células tumorales fuera del cuerpo humano;
 - poner en contacto dicha sangre recuperada intraoperatoriamente con al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional en el que dicho al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional comprende las siguientes propiedades:
 - 10 a) unión a un antígeno panleucocitario, que se selecciona de al menos un miembro del grupo que consiste en CD11a, CD15, CD18, CD29, CD39, CD45, CD48, CD52, CD55, CD58, CD59, CD82, CD95, CD97, CD122, CD124, CD132 y CDw137;
 - b) unión a un antígeno asociado a un tumor en una célula tumoral;
 - c) unión a través de su parte Fc a una célula positiva al receptor Fc,
 - 15 siendo dicho al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional capaz de formar una red tridimensional al menos con células tumorales y células leucocitarias contenidas en la sangre, en el que dicho al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional se pone en contacto con dicha sangre recuperada intraoperatoriamente durante un período de tiempo de 10 a 240 minutos, preferiblemente de 10 a 180 minutos, que es suficiente para reticular células tumorales que comprenden dicho antígeno asociado a tumor y células leucocitarias que comprenden dicho antígeno panleucocitario, y/u otras células tumorales para obtener asociados y/o agregados que comprenden dicho al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional,
 - 20 en el que dichas células tumorales, dichas otras células tumorales y dichas células leucocitarias están potencialmente presentes en la sangre recuperada intraoperatoriamente, y en el que dichas células tumorales son reconocidas específicamente por dicho al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional; y
 - 25 - eliminar mecánicamente dichos asociados y/o agregados de dicha sangre recuperada intraoperatoriamente.
2. Procedimiento ex vivo, según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo biespecífico trifuncional se selecciona de un grupo de anticuerpos con las siguientes combinaciones de isotipos:
 - 30 IgG2b de rata/IgG2a de ratón,
 - IgG2b de rata/IgG2b de ratón,
 - IgG2b de rata/IgG1 humana,
 - [VH-CH1; VL-CL] de ratón-IgG1 humana/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 humana-[bisagra]-IgG3 humana*-[CH2-CH3][* = Alotipos caucásicos G3m(b+g) = sin unión a la proteína A].
 - 35 3. Procedimiento ex vivo, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho antígeno panleucocitario es CD52.
 4. Procedimiento ex vivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se aplican al menos dos anticuerpos diferentes cuya especificidad de antígeno tumoral y/o especificidad de antígeno panleucocitario difieren entre sí.
 - 40 5. Procedimiento ex vivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos asociados están compuestos por anticuerpos, células tumorales y células leucocitarias.
 6. Procedimiento ex vivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dichos uno o más anticuerpos se aplican en una cantidad de 1 µg a 20 µg, preferiblemente de 1 a 10 µg o de 1 a 5 µg o de 1 a 2 µg por litro de sangre recuperada intraoperatoriamente.
 - 45 7. Procedimiento ex vivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho procedimiento comprende al menos una de las siguientes etapas adicionales:
 - 50 a) mezclar la sangre recuperada intraoperatoriamente antes de la adición de dicho al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional con al menos un agente anticoagulante;
 - b) separar eritrocitos de dichos asociados y/o agregados y otros componentes sanguíneos mediante centrifugación, preferiblemente mediante centrifugación en gradiente de densidad;
 - c) opcionalmente, filtración de dicha mezcla
 - 55 para eliminar asociados y/o agregados potencialmente residuales y complejos celulares residuales; y
 - d) recoger la fracción que contiene eritrocitos y otros componentes sanguíneos en recipientes separados.
 8. Procedimiento ex vivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el tiempo de incubación de dicho al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional con dicha sangre recuperada intraoperatoriamente es entre 10 y 90 minutos, más preferiblemente entre 20 y 60 minutos, opcionalmente en el que dicha incubación se realiza a una temperatura de entre 19 a 25°C, preferiblemente a temperatura ambiente.
 - 60 9. Procedimiento ex vivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha eliminación de asociados y/o agregados es mediante centrifugación, filtración o una combinación de las mismas.
 - 65

10. Procedimiento ex vivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que los leucocitos y/o los complejos celulares que contienen células tumorales se eliminan en una etapa separada utilizando un filtro de adsorción/agotamiento de leucocitos.

5 11. Procedimiento ex vivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dichas células tumorales proceden de tumores epiteliales, hematológicos o neuroectodérmicos.

10 12. Procedimiento ex vivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que se administran anticuerpos biespecíficos trifuncionales adicionales que se unen a una célula T, a un antígeno asociado a un tumor en una célula tumoral y a través de su parte Fc a una célula positiva al receptor Fc.

13. Procedimiento ex vivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional comprende una propiedad de unirse a dos antígenos asociados a un tumor diferentes.

15 14. Utilización de un anticuerpo trifuncional biespecífico, con las siguientes propiedades:
 (a) unión a un antígeno panleucocitario, que se selecciona de al menos un miembro del grupo que consiste en CD11a, CD15, CD18, CD29, CD39, CD45, CD48, CD52, CD55, CD58, CD59, CD82, CD95, CD97, CD122, CD124, CD132 y CDw137;
 b) unión a un antígeno asociado a un tumor en una célula tumoral;
 20 c) unión a través de su parte Fc a una célula positiva al receptor Fc,

siendo dicho anticuerpo capaz de formar una red tridimensional con células tumorales y células leucocitarias contenidas en la sangre,
 en un procedimiento ex vivo, según una o más de las reivindicaciones anteriores 1 a 13, en la que, preferiblemente,
 25 dicho al menos un anticuerpo biespecífico trifuncional comprende una propiedad de unirse a dos antígenos asociados a un tumor diferentes.

15. Anticuerpo biespecífico trifuncional para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

30 - proporcionar sangre recuperada intraoperatoriamente que puede contener células tumorales;
 - poner en contacto dicha sangre recuperada intraoperatoriamente con dicho anticuerpo, en el que dicho anticuerpo comprende las siguientes propiedades:

35 a) unión a un antígeno panleucocitario, que se selecciona de al menos un miembro del grupo que consiste en CD11a, CD15, CD18, CD29, CD39, CD45, CD48, CD52, CD55, CD58, CD59, CD82, CD95, CD97, CD122, CD124, CD132 y CDw137;
 b) unión a un antígeno asociado a un tumor en una célula tumoral;
 c) unión a través de su parte Fc a una célula positiva al receptor Fc,

40 siendo dicho anticuerpo capaz de formar una red tridimensional al menos con células tumorales y células leucocitarias contenidas en la sangre,
 en el que dicho anticuerpo se pone en contacto con dicha sangre recuperada intraoperatoriamente durante un período de tiempo de 10 a 240 minutos, preferiblemente de 10 a 180 minutos, que es suficiente para reticular células tumorales que comprenden dicho antígeno asociado a tumor y células leucocitarias que comprenden dicho antígeno panleucocitario, y/u otras células tumorales para obtener asociados y/o agregados que comprenden dicho anticuerpo, en el que dichas células tumorales, dichas otras células tumorales y dichas células leucocitarias están potencialmente presentes en la sangre recuperada intraoperatoriamente, y en el que dichas células tumorales son reconocidas específicamente por dicho anticuerpo; y

45 - eliminar mecánicamente dichos asociados y/o agregados de dicha sangre recuperada intraoperatoriamente,
 en el que, preferiblemente, dicho anticuerpo comprende una propiedad de unirse a dos antígenos asociados a un tumor diferentes.
 50

FIG 1

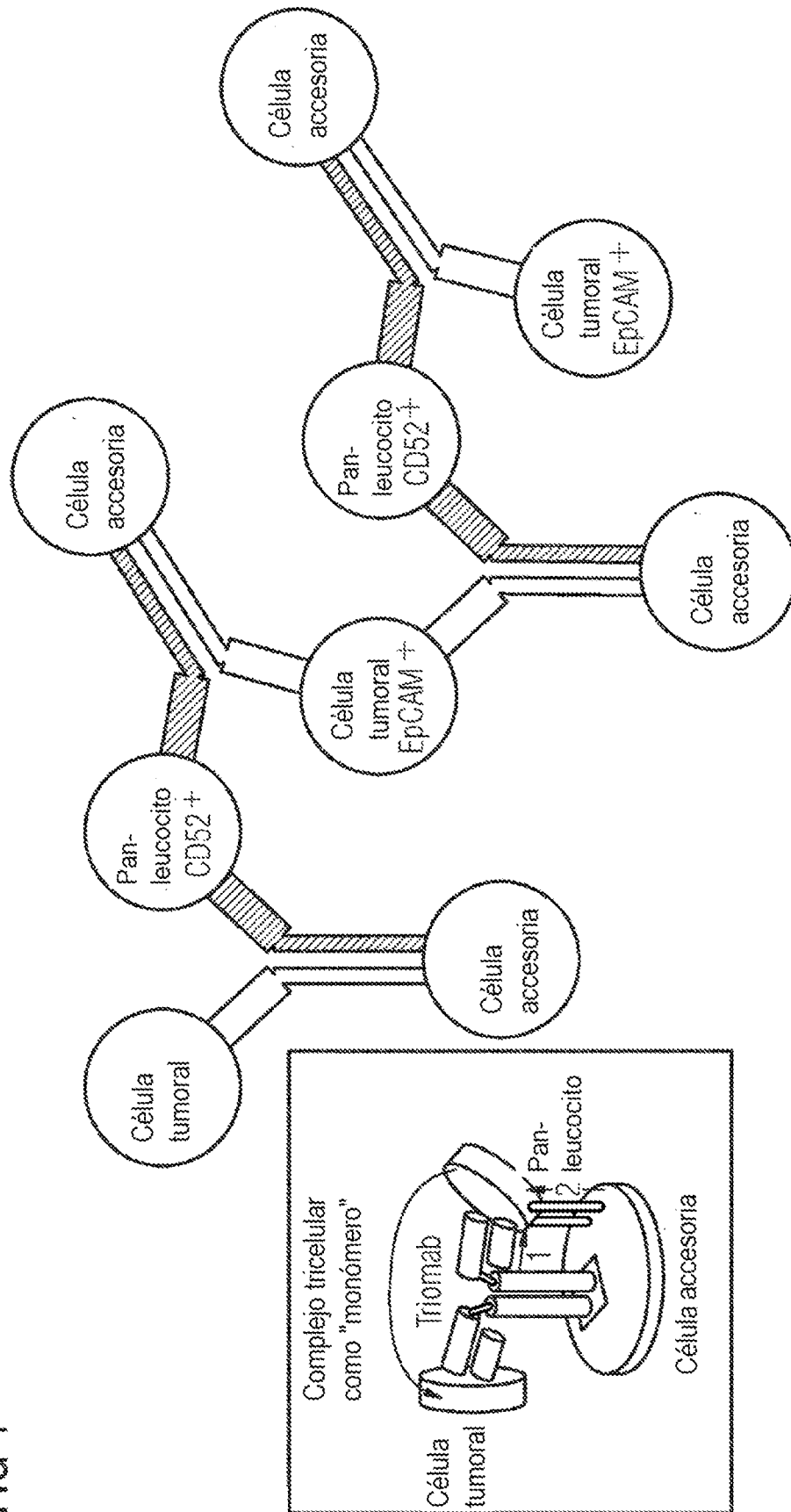


FIG 2

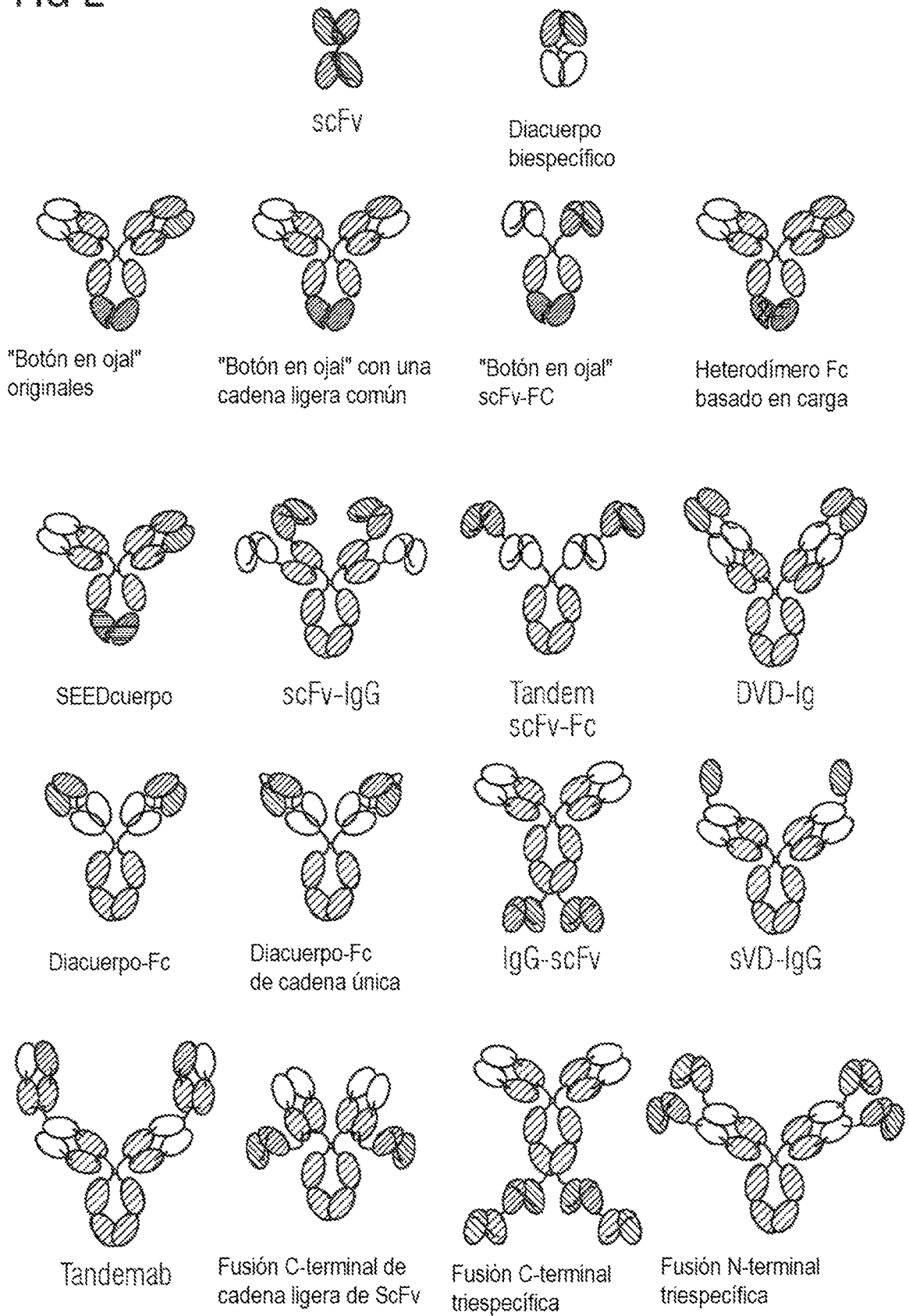
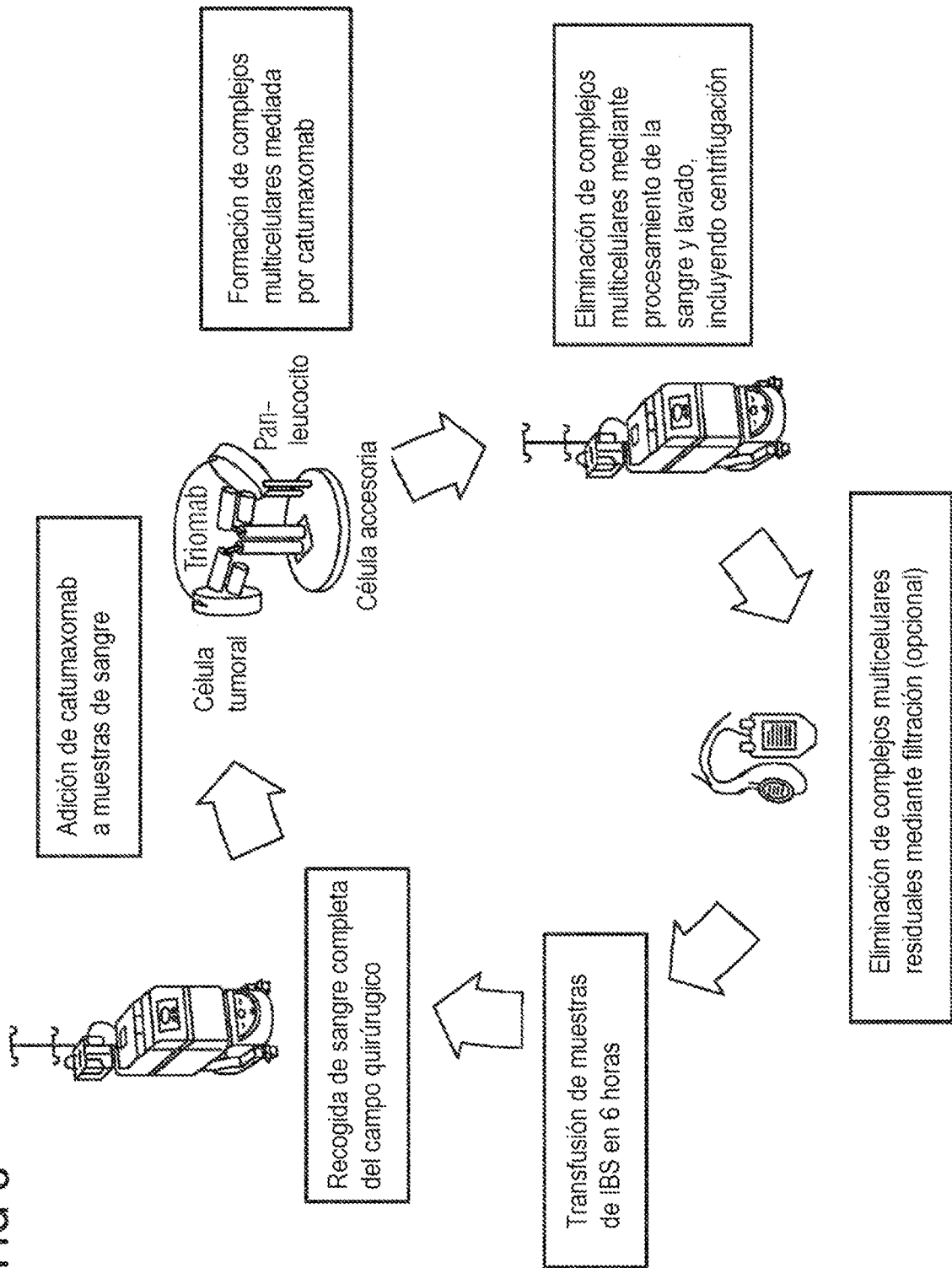


FIG 3



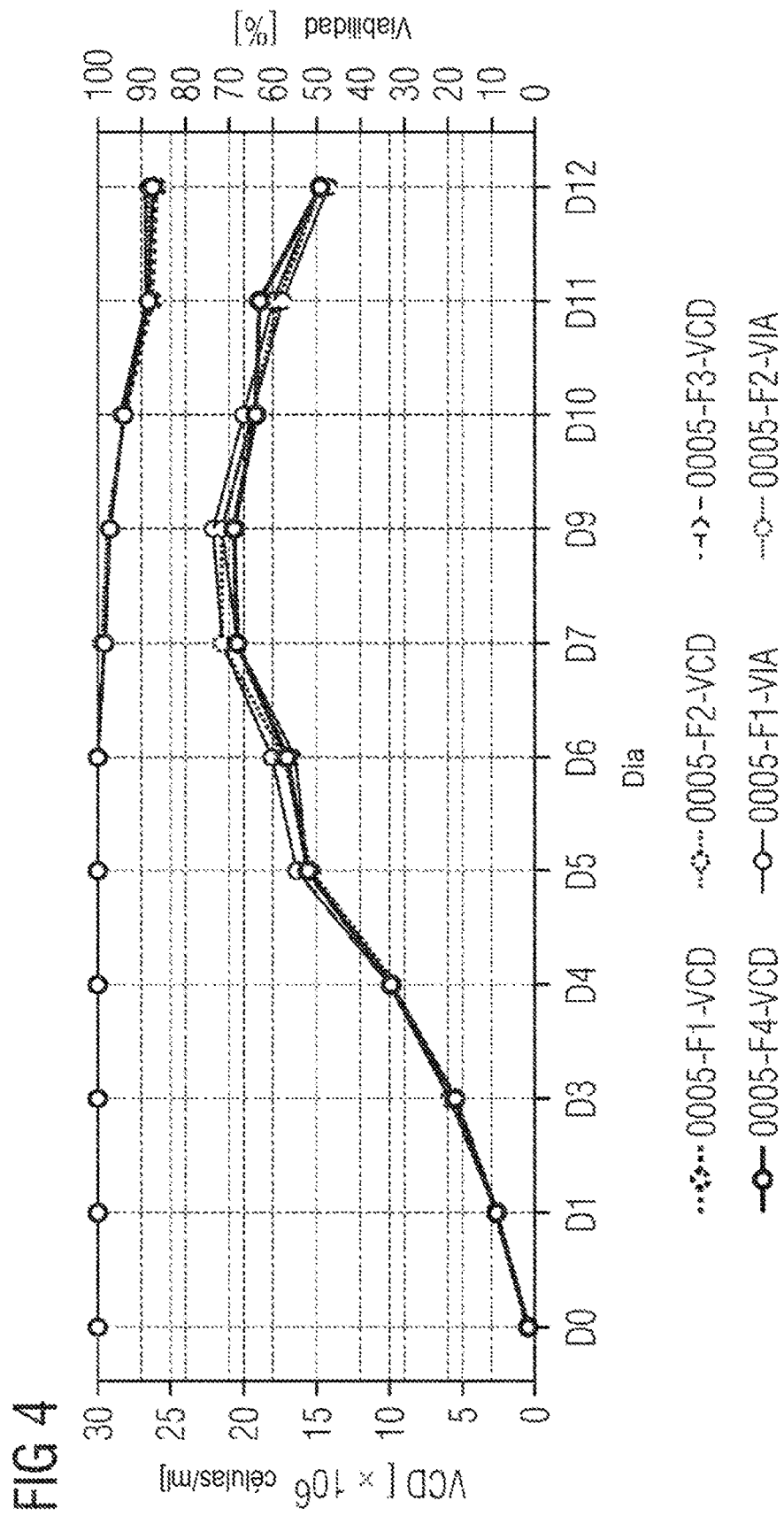


FIG 5

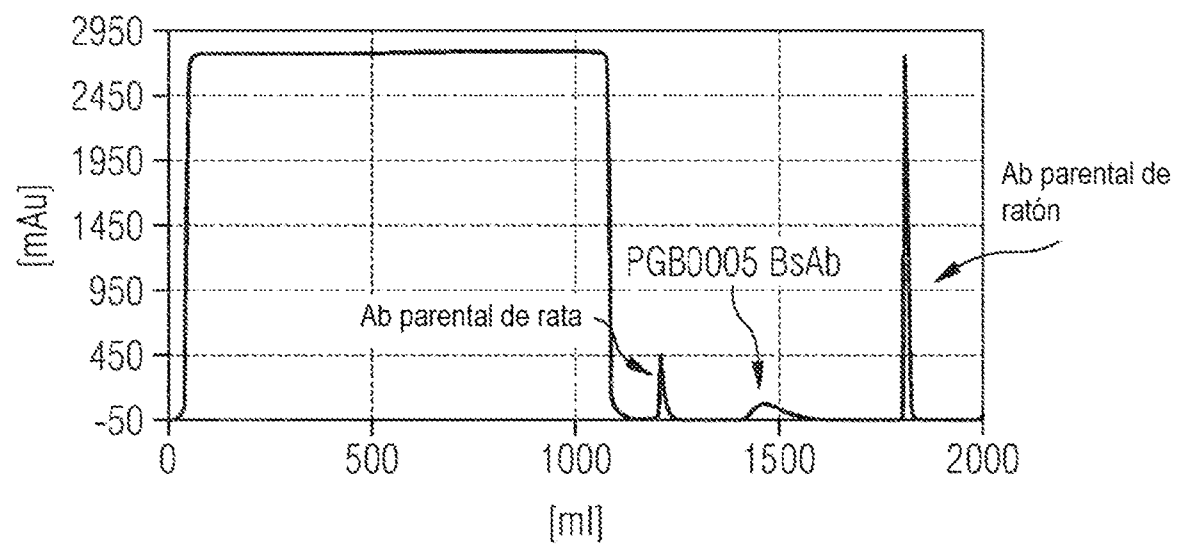


FIG 6

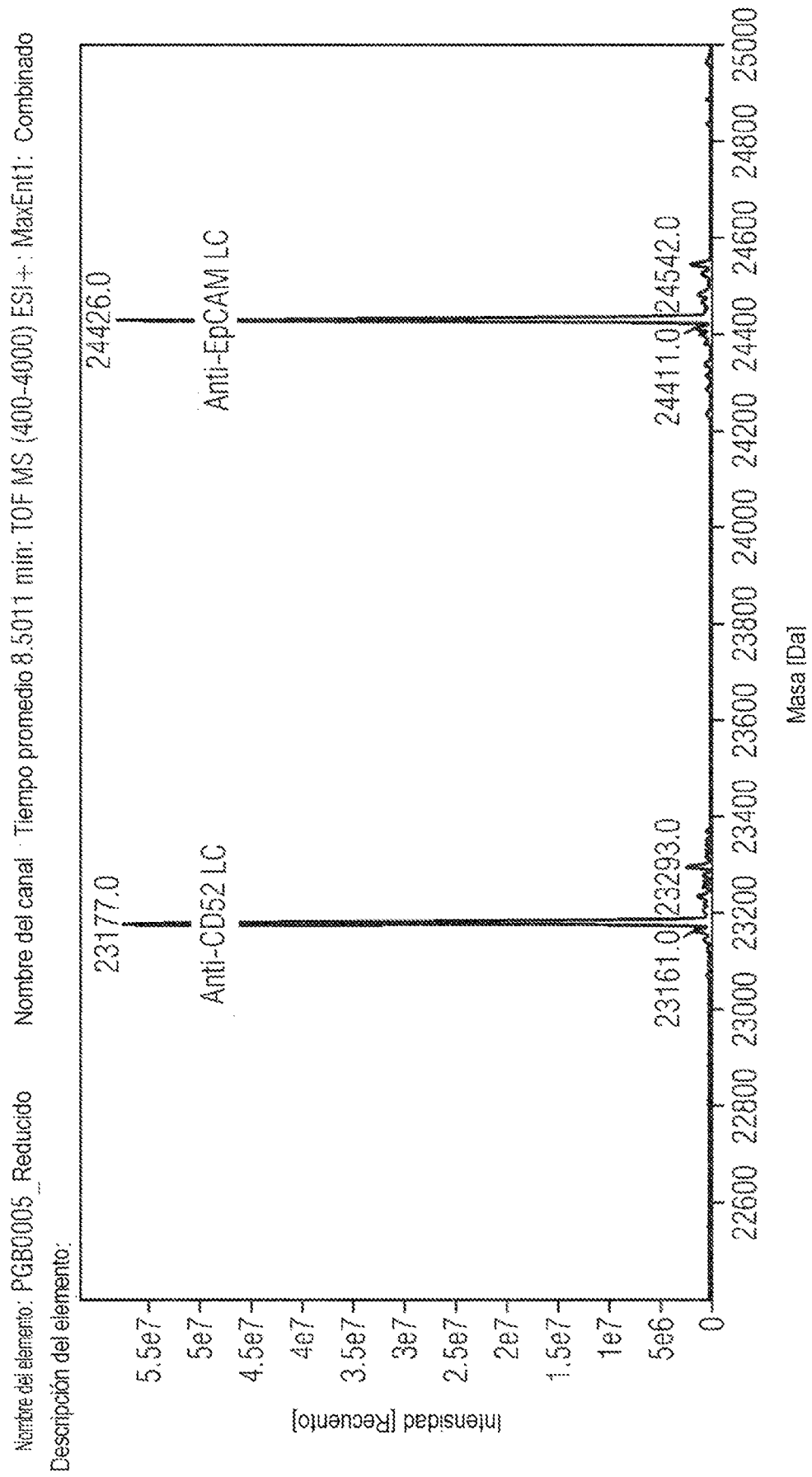


FIG 7

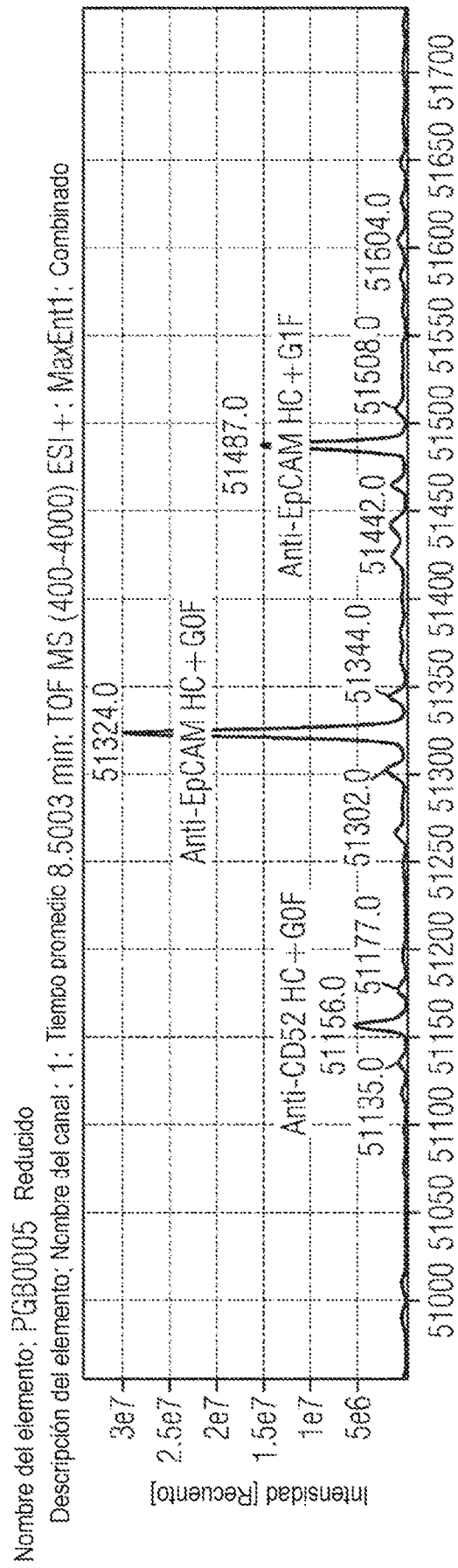


FIG 8

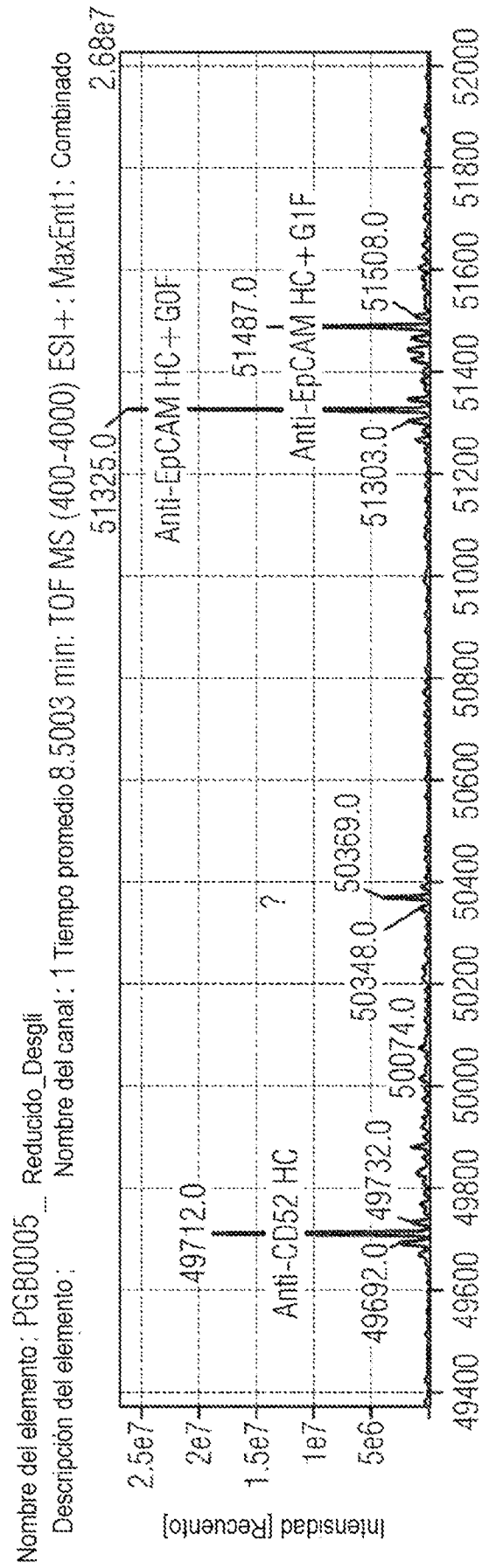


FIG 9

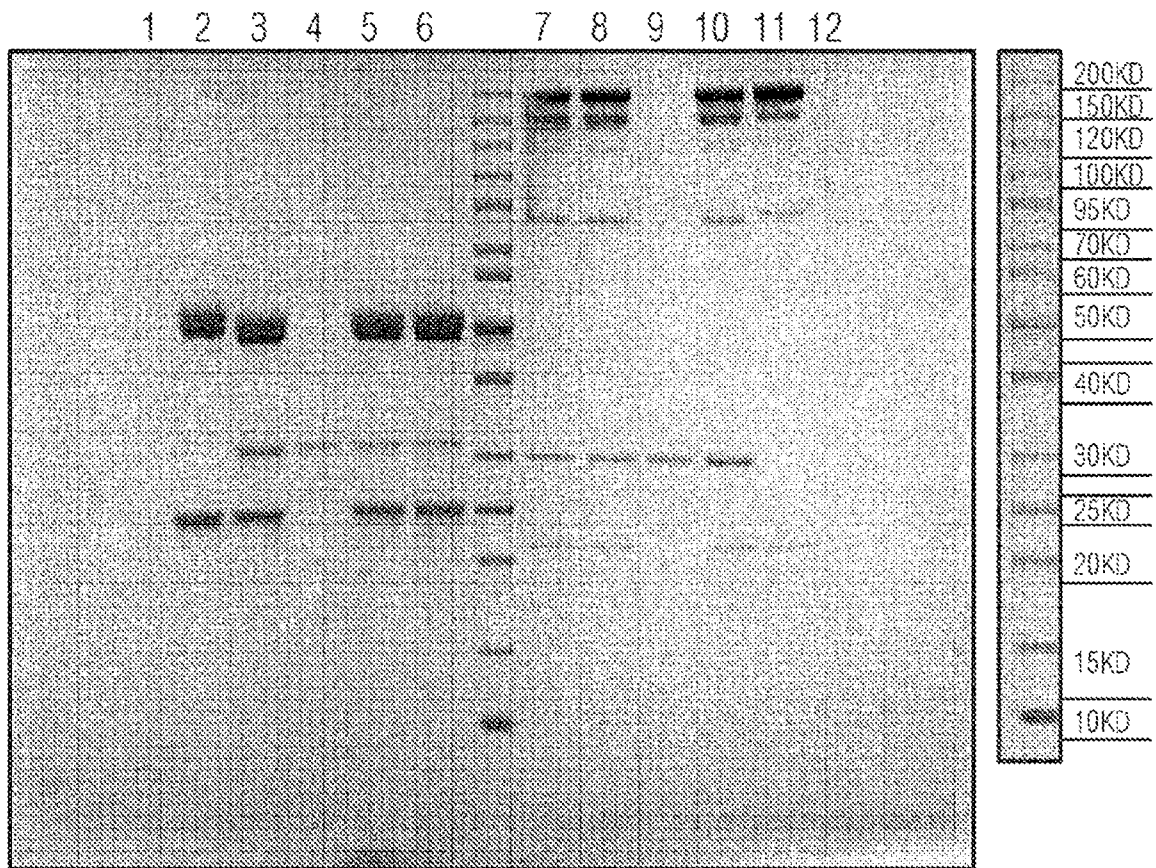


FIG 10

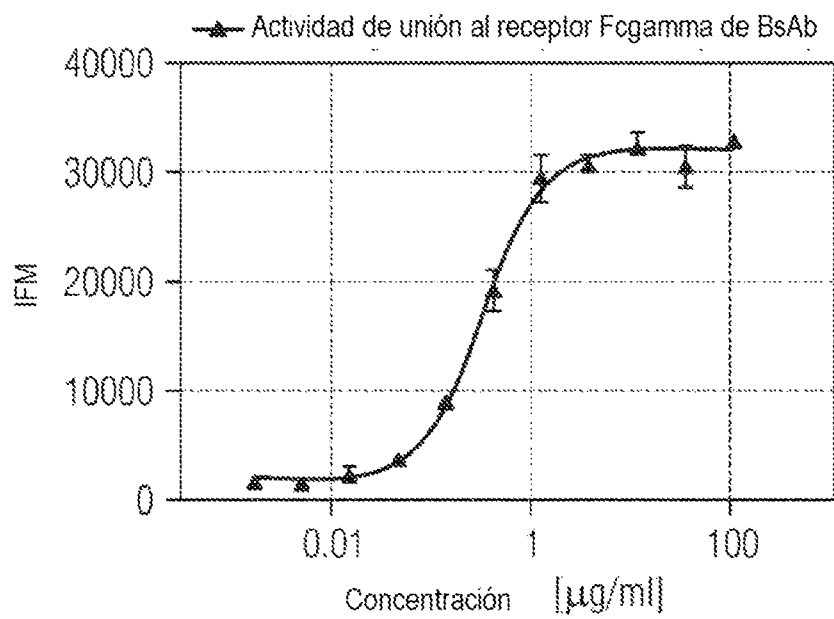


FIG 11A

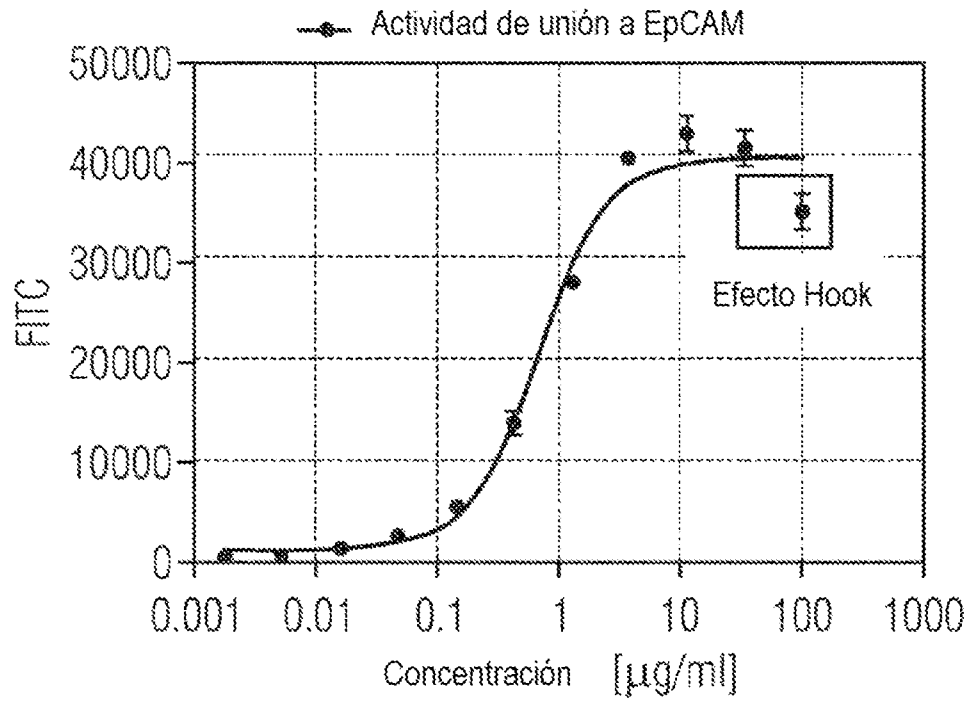


FIG 11B

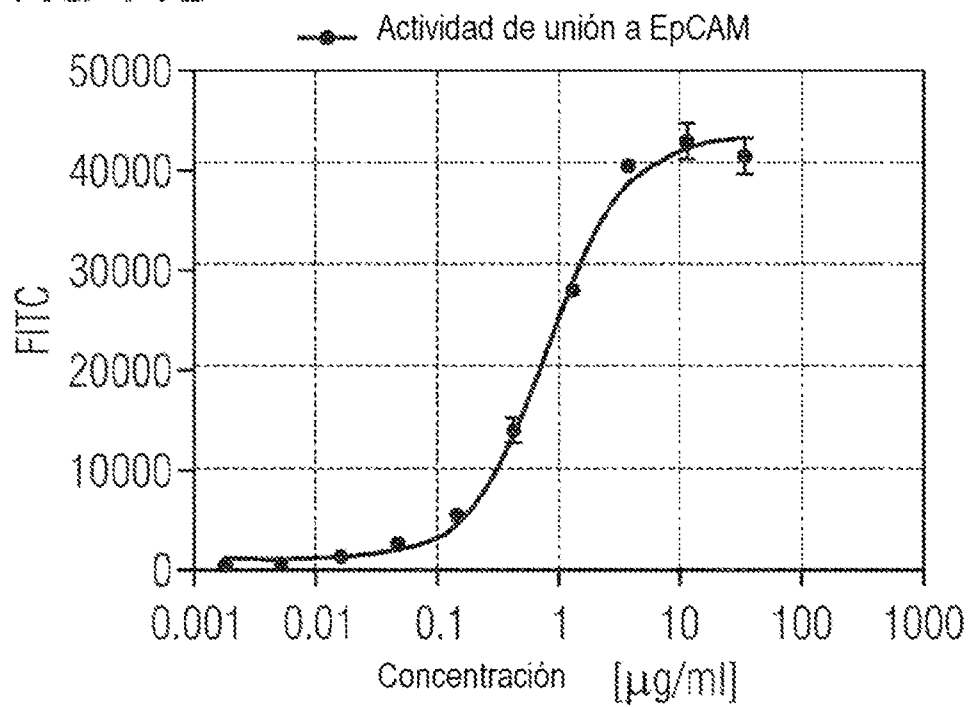


FIG 12A

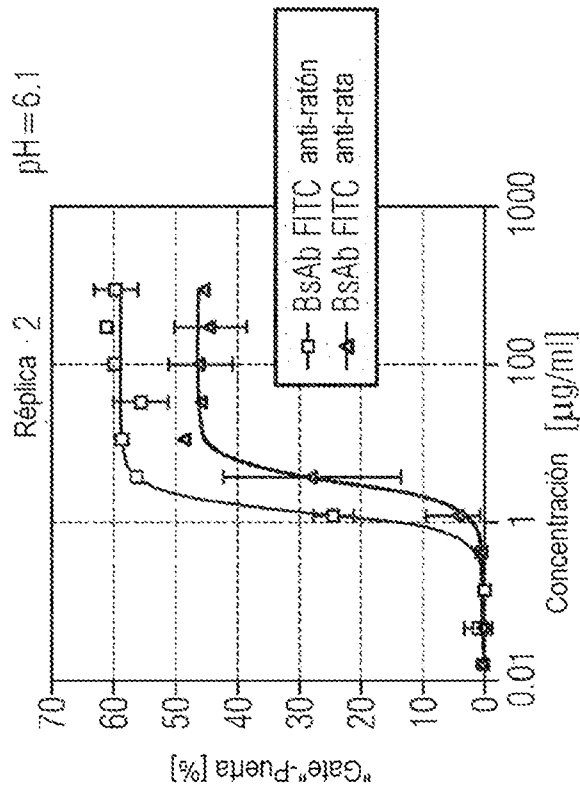
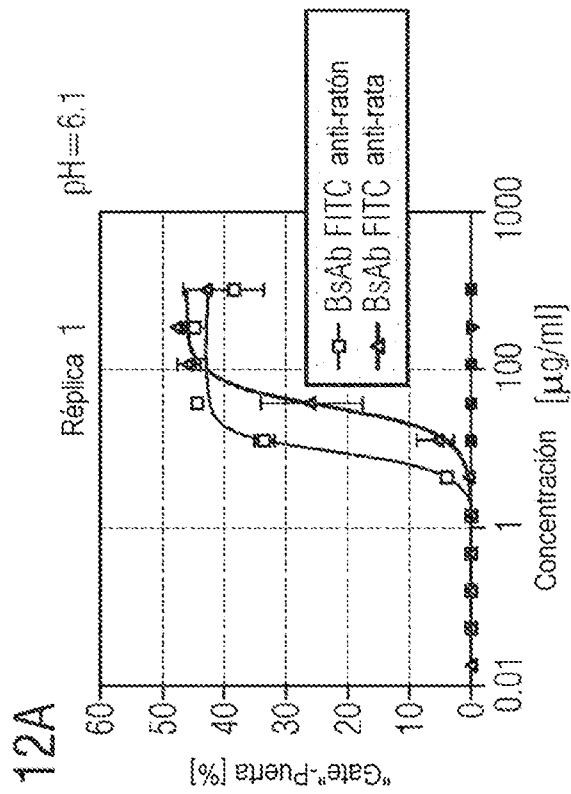


FIG 12B

