

(11) Número de Publicação: **PT 1550454 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 38/19 (2009.01) **A61K 39/395** (2009.01)
A61K 41/00 (2009.01) **A61P 37/06** (2009.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2004.12.22	(73) Titular(es): THERAKOS, INC.	
(30) Prioridade(s): 2003.12.23 US 532076 P	437 CREAMERY WAY EXTON, PA 19341	US
(43) Data de publicação do pedido: 2005.07.06	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2011.03.09	JILL GILES-KOMAR	US
111/2011	DAVID GREGORY	US
	KIM CAMPBELL	US
	GREGORY HARRIMAN	US
	(74) Mandatário:	
	MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA	
	AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **FOTOFORSE EXTRACORPORAL EM COMBINAÇÃO COM TRATAMENTO COM UM ANTAGONISTA TNF-ALFA**

(57) Resumo:

MÉTODOS DE TRATAMENTO DE DOENÇA AUTOIMUNE, DOENÇA ATÓPICA, REJEIÇÃO DE UM TRANSPLANTE OU DECH OU DE MELHORIA DE UM OU MAIS SINTOMAS DESTAS AFECÇÕES QUE ENVOLVE A UTILIZAÇÃO DE UMA TERAPIA COMBINADA. A TERAPIA ENVOLVE A ADMINISTRAÇÃO A UM SUJEITO DE UMA FOTOFORSE EXTRACORPORAL E DE UM ANTAGONISTA TNF-ALFA.

RESUMO**"FOTOFORESE EXTRACORPORAL EM COMBINAÇÃO COM TRATAMENTO COM
UM ANTAGONISTA TNF-ALFA"**

Métodos de tratamento de doença autoimune, doença atópica, rejeição de um transplante ou DECH ou de melhoria de um ou mais sintomas destas afecções que envolve a utilização de uma terapia combinada. A terapia envolve a administração a um sujeito de uma fotoforese extracorporal e de um antagonista TNF-alfa.

DESCRIÇÃO

"FOTOFORESE EXTRACORPORAL EM COMBINAÇÃO COM TRATAMENTO COM UM ANTAGONISTA TNF-ALFA"

ANTECEDENTES

O presente pedido de patente está relacionado com o tratamento de perturbações imunitárias.

As doenças autoimunes envolvem uma activação inadequada das células imunitárias que reagem contra o tecido próprio. Estas células imunitárias activadas promovem a produção de citocinas e anticorpos envolvidos na patologia das doenças. Outras doenças que envolvem as células T incluem a doença enxerto contra hospedeiro (DECH) que ocorre no contexto de transplantes. Em caso de DECH, as células T do dador rejeitam os tecidos e os órgãos do receptor, atacando o corpo do receptor. Uma série de outras doenças envolve o desregulamento do sistema imunitário do hospedeiro. Algumas são tratadas melhor com produtos farmacêuticos, outras com produtos biológicos, outras com tratamentos, tais como a fotoforese extracorporal, e ainda outras possuem opções de tratamento muito limitadas.

A fotoforese extracorporal (FEC) tem revelado constituir uma terapia eficaz nalgumas doenças mediadas pelas células T. No caso da DECH, a fotoforese tem vindo a ser utilizada como tratamento em conjunto com pomada tópica de triancinolona, antifúngico, antiviral, antibióticos, imunoglobulinas e metotrexato. A FEC tem também vindo a ser utilizada com agentes imunossuppressores, tais como o micofenolato de mofetilo, tacrolimus, prednisona, ciclosporina, hidroxiclороquina, esteróides, FK-506 e

talidomida para cDECH e DECH refractária. No caso de transplantes de órgãos sólidos, a FEC tem sido utilizada em conjunto com agentes imunossuppressores para reduzir o número de episódios de rejeição aguda ao aloenxerto associados a aloenxertos renais e transplantes cardíacos. Por exemplo, a FEC tem sido utilizada com OKT3 e/ou os agentes imunossuppressores prednisona, azatioprina e ciclosporina para inverter a rejeição aguda do aloenxerto renal. A FEC tem também vindo a ser utilizada com ciclofosfamida, irradiação corporal total fraccionada e etoposido para transplante de medula alogénica no caso de leucemia mielóide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide crónica, linfoma não Hodgkin ou anemia aplástica grave.

Apesar da actual utilização combinada da FEC com outros agentes terapêuticos, subsiste a necessidade de uma combinação de FEC com um agente concomitante no tratamento de doentes com doenças imunomediadas, hipersensibilidades atópicas ou DECH, em que os tratamentos existentes não são tão eficazes quanto poderiam ser ou podem apresentar graves efeitos secundários ou são difíceis de administrar aos níveis em que cada tratamento em si é administrado.

Os monócitos e macrófagos segregam factor da necrose do tumor (TNF- α) sob a forma de uma citocina em resposta à endotoxina ou outros estímulos. O TNF- α é um homotrímero solúvel com subunidades proteicas de 17 kD. As células que não sejam monócitos ou macrófagos constituem também TNF- α . Por exemplo, linhagens de células de tumor não-monocitárias humanas produzem TNF. O TNF- α tem sido implicado em doenças inflamatórias, doenças autoimunes, infecções virais, bacterianas e parasitárias, doenças malignas e/ou doenças

neurodegenerativas e constitui um alvo útil para uma terapêutica biológica específica em doenças tais como a artrite reumatóide e a doença de Crohn. A administração de anticorpos como tratamento não tem sido isenta de problemas. Por exemplo, a utilização de um antagonista de TNF- α tem, nalguns casos, contribuído para a ocorrência de infecções graves. A redução da dosagem destas substâncias iria reduzir as complicações inerentes ao tratamento.

Tem sido descrita a utilização com êxito de antagonistas do TNF, tal como infliximab e etanercept, em combinação com metotrexato (MTX) para o tratamento da artrite e a utilização de vários destes agentes para este fim está actualmente aprovada pelas agências reguladoras. Embora estes agentes constituam um grande progresso para o tratamento da artrite, por uma variedade de razões existe uma substancial minoria de doentes que ou não respondem ou cuja resposta a estes agentes seja fraca. Subsistem questões relacionadas com a dificuldade do tratamento para doentes com artrite reumatóide. Muitos dos tratamentos actuais apresentam uma elevada incidência de efeitos secundários ou não podem prevenir completamente a progressão da doença. Muito embora os agentes, como o metotrexato, esteróides e outros agentes quimioterapêuticos têm já um longo registo de utilizações no tratamento de várias doenças imunológicas, incluindo artrite reumatóide, os doentes que utilizam estes compostos podem sofrer efeitos tóxicos intensos, tais como anomalias hepáticas, pulmonares, renais e da medula óssea. Os doentes que utilizam estes compostos podem também sofrer efeitos secundários, tais como estomatite, mal-estar, náuseas, diarreia, cefaleias e alopecia ligeira, no entanto estes

problemas podem ser tratados com um suplemento de folato. Deste modo, existe uma necessidade de um tratamento combinado mais seguro para a artrite com antagonista TNF para além dos produtos actualmente aprovados.

Redei et al., "", Blood, vol. 98, nº. 11. Parte 1, página 399a, descreve *Salvage therapy with infliximab for patients with severe acute and chronic GVHD* administração de infliximab a uma dose de 10 mg/kg_e a administração de (PUVA) (psolaren + tratamento UVA - um tratamento *in vitro*).

Couriel et al., "*Infliximab for the treatment of graft-versus-host disease in allogeneic transplant recipients: an update*", Blood, vol. 96, nº. 11. Parte 1, página 400A, revela a administração de Infliximab a uma dose de 10 mg/kg e terapêutica de salvamento adicional, incluindo fotoforese.

Rook et al., "*Photopheresis: Clinical applications and mechanism of action*" Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, vol. 4, nº. 1, páginas 85-90 resumo da utilização da fotoforese no tratamento de linfoma das células T cutâneas, rejeição do aloenxerto e doença autoimune.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção apresenta um produto combinado que inclui:

a) uma população *ex vivo* de células previamente sujeitas a um tratamento *ex vivo* indutor da apoptose e

b) infliximab numa dose que não exceda 3 mg/kg.

para administração simultânea ou sequencial a um doente, para o tratamento de uma doença autoimune ou melhoria de um ou mais dos respectivos sintomas.

Noutro aspecto, a presente invenção apresenta uma composição que compreende infliximab para utilização num método de tratamento de um doente com uma doença autoimune ou predisposição para uma doença autoimune em que o referido método compreende exames aplicados ao doente para determinar se este possui uma doença autoimune e administração de uma dose de infliximab que não exceda 3 mg/kg e FEC caso esse doente possua uma doença autoimune ou uma predisposição para uma doença dessas.

A invenção apresenta um produto para um tratamento aperfeiçoado da DECH e outras doenças imunitárias, permitindo doses mais baixas do inibidor de TNF- α (diminuindo assim a toxicidade), prolongando o intervalo entre perfusões e aumentando a eficácia tanto do tratamento celular (por exemplo FEC) como do inibidor de TNF- α .

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os termos "sujeito" ou "doente", são utilizados indiscriminadamente e referem-se a um animal, de preferência um mamífero, mais preferencialmente um ser humano.

Uma "população celular" inclui geralmente um tipo de células encontrado no sangue. O termo pode incluir um ou mais tipos de células sanguíneas, especificamente, eritrócitos, plaquetas e leucócitos. Uma população celular pode incluir subtipos de leucócitos, por exemplo, células T, células dendríticas, células B, etc. Numa forma de realização, uma população celular pode incluir uma mistura ou conjunto de tipos de células. Em alternativa, uma população celular pode incluir um tipo substancialmente purificado de células, por exemplo, células T ou células dendríticas.

"procedimento FEC" ou "FEC" refere-se à fotoforese extracorporal, também conhecida como fototerapia extracorporal. Consiste num tratamento de uma população celular que foi previamente sujeita a luz UVA e um composto fotoactivável. De preferência, a população de células provém de um órgão ou tecido, mais preferencialmente a população de células é uma porção de sangue e do modo mais preferível, a população de células é uma camada leucoplaquetária. Por vezes a FEC é empregue para designar um processo no qual uma população de células foi sujeita a um procedimento de indução da apoptose com luz UVA na presença de um agente de reticulação do ADN, tal como o psoraleno (de preferência, 8-MOP).

Os efeitos secundários que são apontados nesta especificação consistem nos efeitos indesejados e adversos de um agente terapêutico concomitante. Os efeitos adversos são sempre indesejados mas os efeitos indesejados não são obrigatoriamente adversos. Um efeito adverso derivado de um agente terapêutico pode ser prejudicial ou desconfortável ou arriscado. Os efeitos secundários derivados da administração de tratamentos anti-TNF- α podem incluir, sem constituir limitação, risco de infecção e hipersensibilidade. Outros efeitos secundários vão desde sintomas inespecíficos, tais como febre ou arrepios, prurido ou urticária e reacções cardiopulmonares tais como dor torácica, hipotensão, hipertensão ou dispneia até efeitos como a mialgia e/ou artralgia, eczema, edema facial, das mãos ou lábios, disfagia, dor de garganta e cefaleias. Ainda outros efeitos secundários podem incluir, sem constituir limitação, hérnia abdominal, enfarte do baço, esplenomegalia, tonturas, lesões neuronais do

aparelho motor superior, síndrome do lúpus eritematoso, nódulos reumatóides, ceruminose, dor abdominal, diarreia, úlceras gástricas, obstrução intestinal, perfuração intestinal, estenose intestinal, náuseas, pancreatite, vômitos, dores nas costas, fracturas ósseas, afecções ou lesões dos tendões, insuficiência cardíaca, isquemia do miocárdio, linfoma, trombocitopenia, celulite, ansiedade, confusão, delírio, depressão, sonolência, tentativa de suicídio, anemia, abcessos, infecções bacterianas e sepse.

Os termos “afecção” e “doença” são utilizados indiscriminadamente na presente especificação. O termo “doença atópica” é utilizado indiscriminadamente com o termo “doença inflamatória” para designar uma condição num indivíduo caracterizada por uma inflamação, tal como inflamação crónica. As doenças autoimunes podem ou não estar associadas a inflamação. Além disso, a inflamação pode ou não ser causada por uma doença autoimune. Deste modo, algumas doenças podem ser caracterizadas tanto como doenças autoimunes como doenças inflamatórias.

Os agentes concomitantes da presente invenção incluem um agente imunomodulador relacionado com o TNF- α . O agente imunomodulador utilizado nos produtos combinados da invenção consiste num antagonista de TNF- α que é REMICADE[®]_(infliximab).

REMICADE[®] (infliximab) diminui, bloqueia, inibe, anula ou interfere com a actividade do TNF- α *in vitro*, *in situ* e/ou preferencialmente *in vivo*.

O antagonista TNF- α da invenção é administrado preferencialmente por via parentérica, subcutânea, intramuscular, intravenosa ou intra-articular. Outros meios são igualmente possíveis, incluindo via intra-abdominal,

intracapsular, intracartilagínea, intracavitária, intracelial, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intra-hepática, intramiocárdica, intraostica, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrassinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, bolus, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal ou transdérmica.

Numa forma de realização da invenção que apresenta composições para utilização em terapêuticas combinadas destinadas à prevenção, tratamento ou melhoria de um ou vários sintomas associados a uma doença autoimune num sujeito, as terapêuticas incluem a administração a um indivíduo de uma população de células previamente sujeitas a um tratamento indutor da apoptose, por exemplo, uma população de células que foi sujeita a fotoforese extracorporal (FEC) e um antagonista do TNF- α . A combinação de FEC e um agente concomitante (isto é, o antagonista do TNF- α) produz um efeito terapêutico melhor num indivíduo do que cada um dos tratamentos aplicados isoladamente. Nalgumas formas de realização, a combinação de FEC e um agente concomitante alcança um efeito terapêutico 2 vezes superior ou mais ainda (e preferencialmente 10 a 20 vezes) num indivíduo com uma doença autoimune, doença, DECH ou rejeição do transplante do que cada tratamento aplicado isoladamente. Noutras formas de realização, a combinação da FEC e de antagonistas do TNF- α apresenta um efeito superior ao simples efeito aditivo num indivíduo com uma doença autoimune, DECH e rejeição de implante ou de transplante. Os produtos da combinação para utilização em terapêuticas

da invenção possibilitam uma administração menos frequente de FEC a um indivíduo com uma doença autoimune para alcançar um efeito terapêutico, possibilita menos doses do antagonista TNF- α utilizado em conjunto com a FEC para a prevenção ou tratamento de uma doença autoimune, doença atópica ou DECH e/ou uma administração menos frequente deste antagonista de TNF- α a um indivíduo com uma doença autoimune ou DECH para alcançar um efeito terapêutico. Estes reduzem ou evitam efeitos secundários indesejados ou adversos associados à administração das actuais terapêuticas de agente único e/ou terapêuticas combinadas existentes para doenças autoimunes ou DECH, o que por seu lado melhora a aceitação do protocolo de tratamento por parte do doente.

A diminuição das doses e/ou frequência de administração de FEC ou agente concomitante a um indivíduo com uma doença autoimune melhora a qualidade de vida de um doente submetido a esta terapêutica. As doses e/ou frequência de administração de FEC ou agente concomitante a um indivíduo com uma doença autoimune podem ser diminuídas e alcançar ainda uma redução de 20% ou mais (e de preferência 90% - 98% ou superior) da inflamação de um órgão específico, tecido ou articulação no doente.

Numa forma de realização, a FEC é utilizada em combinação com anticorpos anti-TNF- α monoclonais. O anticorpo anti-TNF monoclonal mais preferido é o infliximab (REMICADE®). O antagonista TNF- α utilizado nas composições da invenção é infliximab (REMICADE®). O infliximab (REMICADE®) é um anticorpo monoclonal quimérico que se liga ao factor de necrose do tumor alfa (TNF- α).

Noutra forma de realização preferida da invenção o REMICADE® (infliximab) é fornecido sob a forma de pó estéril e liofilizado para perfusão intravenosa, destinado a ser reconstituído com 10 ml de água estéril para injeção. Cada frasco descartável de REMICADE® (infliximab) contém 100 mg de infliximab, 500 mg de sucrose, 0,5 mg de polisorbato 80, 2,2 mg de fosfato de sódio monobásico e 6,1 mg de fosfato de sódio dibásico. De acordo com The Physician's Desk Reference (55^a ed, 2001) a dose total do produto reconstituído deve ainda ser diluída até perfazer 250 ml com 0,9% de cloreto de sódio para injeção, USP, com a concentração de perfusão entre 0,4 mg/ml e 4 mg/ml. Na presente invenção a dose não excede 3 mg/kg. Em determinadas formas de realização preferidas, o REMICADE® (infliximab) destina-se a administração por meio de perfusão intravenosa, seguida de uma dose adicional 2 e 6 semanas após a primeira perfusão e depois a cada 8 semanas.

Numa forma de realização da invenção, REMICADE® (infliximab) é administrado a uma dose de cerca de 2,5 mg/kg em combinação com FEC. Em formas de realização preferidas, a quantidade de REMICADE é significativamente menor a fim de diminuir a toxicidade quando a sinergia é forte e a doença o exige (tal como com DECH). Nestas formas de realização a frequência da FEC e/ou tratamento com anti-TNF- α é reduzida em 20%, mais preferencialmente 40% e do modo mais preferível em pelo menos 50%.

A FEC é administrada sequencialmente, por qualquer ordem, com o(s) antagonista(s) de TNF- α da presente invenção. Esta administração também pode ser feita ciclicamente. Uma terapia cíclica envolve a administração de um agente concomitante por um período de tempo, seguido

da administração de uma população de células contendo células apoptóticas por um período de tempo e repetindo esta administração sequencial. De preferência, é administrada uma população de células incluindo células apoptóticas (tais como se obtém durante a FEC) pelo menos cerca de 15-60 minutos antes ou depois de um agente concomitante. A população de células compreendendo células apoptóticas pode, contudo, ser administrada a intervalos muito maiores antes ou depois de um antagonista de $\text{TNF-}\alpha$. Por exemplo, nalguns casos é possível administrar a população de células contendo células apoptóticas pelo menos cerca de 1 dia a 30 dias ou mais antes ou depois da administração de um agente concomitante e obter ainda o efeito benéfico da terapia combinada.

As populações de células úteis na terapêutica dos métodos presentemente apresentados incluem "células apoptóticas" que incluem células e corpos celulares, isto é, corpos apoptóticos, que exibem ou irão exibir um ou mais aspectos característicos da apoptose. Uma célula apoptótica pode incluir qualquer célula que se encontre em fase de indução, fase efectora ou fase de degradação. As populações de células apresentadas podem ainda incluir células que tenham sido tratadas com um agente indutor da apoptose e que sejam ainda viáveis. Estas células podem exibir aspectos característicos da apoptose a dado momento, por exemplo, depois da administração ao indivíduo.

A FEC induz níveis significativos de apoptose. Este facto foi observado, por exemplo, em linfócitos de doentes com CTCL, DECH e esclerodermia. As células apoptóticas contribuem para o efeito clínico observado.

Os aspectos característicos da apoptose podem incluir, sem ficarem limitados, exposição superficial de fosfatidil-serina, conforme detectado por métodos padrão aceites de detecção, tal como coloração Anexina V, alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial medida por métodos padrão aceites (por exemplo, Salvioli et al., 411 FEBS LETTERS 77-82 (1997)); sinais de fragmentação do ADN, tal como o aparecimento de escalonamento do ADN em electroforese em gel de agarose na sequência da extracção do ADN das células (Teiger et al., 97 J. CLIN. INVEST. 2891-97 (1996)) ou marcação *in situ* (Gavrieli et al., 1992, indicado anteriormente).

A população celular para utilização na presente invenção é induzida para se tornar apoptótica *ex vivo*, isto é extracorporeamente, e é combinada com as do sujeito, dador ou receptor. Uma população de células pode ser preparada a partir de substancialmente qualquer tipo de célula de mamífero, incluindo linhagens de células cultivadas. Por exemplo, uma população celular pode ser preparada a partir de um tipo de célula derivado do próprio corpo do sujeito mamífero ou de uma linhagem de células definida. Especificamente, uma população de células pode ser preparada a partir de leucócitos de sangue compatível com o do sujeito mamífero, mais especificamente, dos próprios leucócitos do sujeito e ainda mais especificamente das próprias células T do sujeito.

Uma população de células pode ainda ser preparada a partir de uma linhagem de células definida. Uma linhagem de células que pode ser útil nos métodos da presente invenção inclui, por exemplo, células Jurkat (ATCC No. TIB-152). Outras linhagens de células apropriadas para a utilização

de acordo com a presente invenção pode ser identificada e/ou determinada pelos peritos na especialidade. A população de células pode ser preparada extracorporeamente, antes da administração ao sujeito, dador ou receptor. Assim, numa forma de realização, uma aliquota do sangue do sujeito, sangue do receptor ou sangue do dador pode ser retirada, por exemplo por venipunctura e pelo menos uma porção dos respectivos leucócitos é submetida extracorporeamente a condições indutoras da apoptose.

Numa forma de realização, a população de células pode incluir um subconjunto específico de células, incluindo, sem constituir limitação, células dendríticas, células reguladoras T CD25+ CD4 e células T CD4+. A separação e purificação dos componentes sanguíneos é bem conhecida daqueles com formação ordinária na técnica. Efectivamente, o advento da terapia com componentes sanguíneos deu origem a numerosos sistemas concebidos para a recolha de componentes sanguíneos específicos. Vários desses sistemas de recolha encontram-se disponíveis comercialmente, por exemplo Immunicon Corp. (Huntingdon Valley, PA), Baxter International (Deerfield, IL) e Dynal Biotech (Oslo, Noruega).

O sistema de separação da Immunicon separa os componentes sanguíneos recorrendo a nanopartículas magnéticas (ferrofluidos) revestidos com anticorpos que conjugam, isto é formam um complexo com os componentes alvo numa amostra de sangue. A amostra de sangue é depois incubada num forte campo magnético e o complexo alvo migra, afastando-se do resto da amostra, onde pode depois ser recolhido. Ver, por exemplo patentes norte-americanas n.º. 6,365,362; 6,361,749; 6,228,624; 6,136,182; 6,120,856;

6,013,532; 6,013,188; 5,993,665; 5,985,153; 5,876,593;
 5,795,470; 5,741,714; 5,698,271; 5,660,990; 5,646,001;
 5,622,831; 5,597,531; 5,541,072; 5,512,332; 5,466,574;
 5,200,084; 5,186,827; 5,108,933 e 4,795,698.

O sistema de separação Dynabeads® Biomagnetic da Dynal separa os componentes sanguíneos com microesferas magnéticas revestidas com anticorpos que se conjugam com os componentes alvo numa amostra de sangue, formando um complexo alvo Dynabeads. O complexo é depois removido da amostra, utilizando um Concentrador de Partículas Magnético (Dynal MPC®). Podem ser recolhidos vários tipos diferentes de células utilizando este sistema de separação, incluindo, por exemplo, células dendríticas derivadas de monócitos (Kit de isolamento de monócitos negativo, prod nº 113.09), células dendríticas derivadas de células CD34+ (Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System, Prod. Nº 113.01) e monócitos humanos (Dynabeads® CD 14: Monocyte Positive Isolation for Molecular Analysis, Prod. Nº 111.11 ou 111.12). Podem também ser isoladas positivamente ou negativamente células T e subconjuntos de células T ou eliminadas de sangue total, camada leuco-plaquetária, gradiente de células mononucleares ou tecido digerido utilizando, por exemplo CELlection™ CD2 Kit (Prod.No 116.03), Dynabeads® M-450 CD2 (Prod. Nº 111.05/06), Kit de isolamento de CD4 negativo (células T auxiliares/indutoras) (Prod. Nº 113.17), Kit de isolamento CD8 positivo (Prod. Nº 113.05), Dynabeads® CD8 (Prod. Nº 111.07/08), Kit de isolamento CD8 negativo (Prod. Nº 113.19), Kit de isolamento de células T negativo (Prod. Nº 113.11), Dynabeads® CD25 (Prod. Nº 111.33/34) e Dynabeads® expensor de células T CD3/CD28 (Prod. Nº 111.31). A Baxter

International desenvolveu vários sistemas de aférese com base nas propriedades da centrifugação, incluindo o separador de células sanguíneas CS-3000, o separador Amicus e o Autopheresis-Csystem. O separador de células sanguíneas CS-3000 recolhe tanto os produtos da aférese celular como o plasma. Compreende um separador contínuo de fluxo com um sistema centrífugo de dupla câmara que recolhe os produtos da aférese. O Amicus opera tanto de forma contínua como de com fluxo intermitente para recolher plaquetas e plasma de um único dador. O sistema Autopheresis-C é indicado para a recolha de plasma de dadores e pode recolher mais do que 250 mL de plasma. *Vide geralmente*, patentes norte-americanas n°. 6,451,203; 6,442,397; 6,315,707; 6,284,142; 6,251,284; 6,033,561; 6,027,441 e 5,494,578.

Na forma de realização mais preferida da invenção, a FEC é utilizada para induzir a apoptose. Esta operação envolve um composto fotoactivável adicionado a uma população celular *ex vivo*. O composto fotossensível pode ser administrado a uma população de células que compreende células sanguíneas na sequência da colheita destas a partir do sujeito, receptor ou dador, conforme o caso, e antes ou em simultâneo à exposição a luz ultravioleta. O composto fotossensível pode ser administrado a uma população de células que compreende sangue total ou uma fracção deste, desde que as células sanguíneas alvo ou componentes do sangue recebam o composto fotossensível. Noutra forma de realização, uma porção do sangue do sujeito, sangue do receptor ou sangue do dador deve primeiro ser processada utilizando métodos conhecidos a fim de remover substancialmente os eritrócitos e o composto fotoactivo pode então ser administrado à população de células

resultante, compreendendo a fracção de leucócitos enriquecida.

Numa alternativa à presente invenção, o composto fotoactivável pode ser administrado *in vivo*. O composto fotossensível, quando administrado a uma população de células que inclui o sangue do sujeito, sangue do receptor ou sangue do dador, conforme o caso, *in vivo*, pode ser administrado oralmente, mas também pode ser administrado intravenosamente e/ou por outras vias de administração convencionais. A dose oral de composto fotossensível pode encontrar-se entre cerca de 0,3 a cerca de 0,7 mg/kg, mais especificamente cerca de 0,6 mg/kg. Quando administrado por via oral, o composto fotossensível pode ser administrado pelo menos mais de uma hora antes do tratamento por fotoforese e nunca mais de cerca de três horas antes do tratamento por fotoforese.

Os compostos fotoactiváveis para utilização de acordo com a presente invenção incluem, sem constituir limitação, os compostos conhecidos como psoralenos (ou furocumarinas) bem como derivados de psoraleno, tal como os descritos nas, por exemplo, Pat. U.S. N°. 4,321,919 e Pat. U.S. N°. 5,399,719. Os compostos preferidos incluem 8-metoxipsoraleno; 4,5'8-trimetilpsoraleno; 5-metoxipsoraleno; 4-metilpsoraleno; 4,4-dimetilpsoraleno; 4-5'-dimetilpsoraleno; 4'-aminometil-4,5',8-trimetilpsoraleno; 4'-hidroximetil-4,5',8-trimetilpsoraleno; 4',8-metoxipsoraleno; e um 4'-(omega-amino-2-oxa) alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno, incluindo, sem constituir limitação, 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno. Numa forma de realização, o composto fotossensível que pode ser utilizado compreende o derivado

de psoraleno, amotossaleno (S-59) (Cerus, Corp., Concord, CA). Noutra forma de realização, o composto fotossensível compreende 8-metiloxipsoraleno (8 MOP).

A população de células às quais foi adicionado o composto fotoactivável é tratada com uma luz de um comprimento de onda que activa o composto fotoactivável. A fase de tratamento que activa o composto fotoactivável é preferencialmente executada utilizando luz ultravioleta (UVA) com um comprimento de onda longo, por exemplo com um comprimento de onda entre 320 e 400 nm. A exposição à luz ultravioleta durante o tratamento de fotoforese é preferencialmente aplicada por um período de tempo suficiente para aplicar 1 - 2 J/cm² à população de células.

Os aparelhos de fotoforese extracorporal úteis para a presente invenção incluem os produzidos pela Therakos, Inc., (Exton, PA) com a designação UVAR®. Encontra-se uma descrição deste aparelho na Pat. U.S. nº 4,683,889. O sistema UVA® utiliza um sistema de tratamento é constituído por três fases, incluindo: 1) a recolha de uma fracção da camada leuco-plaquetária (enriquecida em leucócitos), 2) irradiação da fracção de camada leuco-plaquetária recolhida e 3) reperfusão dos leucócitos tratados. A fase de recolha contém seis ciclos de fases de recolha de sangue, centrifugação e reperfusão. Durante cada ciclo, o sangue total é centrifugado e separado numa taça de férese. Desta separação retém-se plasma (volume em cada ciclo é determinado pelo operador do instrumento UVAR®) e 40 ml de camada leuco-plaquetária em cada ciclo de recolha. Os glóbulos vermelhos e todo o plasma adicional são reperfundidos no doente antes de iniciar o ciclo de recolha seguinte. Finalmente, separa-se e retém-se para irradiação

UVA um total de 240 ml de camada leuco-plaquetária e 300 ml de plasma.

A irradiação do sangue enriquecido em leucócitos no circuito de irradiação tem início durante a recolha da camada leuco-plaquetária do primeiro ciclo de recolha. O plasma e camada leuco-plaquetária recolhidos são misturados com 200 ml de soro fisiológico normal heparinizado e 200 mg de UVADEX® (8-metoxipsoralina hidrossolúvel). A mistura flui numa camada de 1,4 mm de espessura, através da câmara de fotoactivação PHOTOCEPTOR® que é inserida entre duas filas de lâmpadas UVA do PHOTOCSETTE®. As lâmpadas UVA PHOTOCSETTE® irradiam ambos os lados desta câmara PHOTOCEPTOR® transparente, permitindo uma exposição de 180 minutos à luz ultravioleta A, rendendo uma exposição média por linfócito de 1 a 2 J/cm². Estima-se que a preparação final da camada leuco-plaquetária contém 20% a 25% do componente celular mononuclear de sangue periférico total e possui um hematócrito entre 2,5% e 7%. Após o período de fotoactivação, o volume é reperfundido no doente durante um período de 30 a 45 minutos. O pedido de patente norte-americana nº 09/480,893 descreve outro sistema para utilização em administração FEC. As patentes norte-americanas nº 5,951,509; 5,985,914; 5,984,887, 4,464,166; 4,428,744; 4,398,906; 4,321,919; publicações PCT nºs. WO 97/36634; e WO 97/36581 incluem também a descrição de dispositivos e métodos úteis neste contexto.

Outro sistema que pode ser útil na utilização da presente invenção encontra-se descrito na WO 01/80924. Esse sistema inclui um aparelho que permite a redução do volume de fluido recolhido ou removido do sujeito durante a FEC. A quantidade efectiva de energia luminosa que é aplicada à

população de células pode ser determinada utilizando os métodos e sistemas descritos na patente norte-americana nº 6,219,584.

São bem conhecidos vários outros métodos de indução da apoptose numa população de células e podem ser adoptados para utilização na presente invenção. Um tratamento desses inclui a submissão de uma população de células a radiação ionizante (raios gama, raios-x, etc.) e/ou radiação electromagnética não-ionizante, incluindo luz ultravioleta, aquecimento, arrefecimento, derivação do soro, derivação do factor de crescimento, acidificação, diluição, alquilação, alteração da força iónica, deprivação do soro, irradiação ou uma combinação destes. Em alternativa, a apoptose pode ser induzida, submetendo uma população de células a ultrassons.

Ainda noutro método de indução da apoptose inclui a aplicação extracorporal de tensão oxidativa a uma população de células. Esta operação pode ser executada tratando a população de células em suspensão com agentes químicos oxidantes, tais como peróxido de hidrogénio, outros peróxidos e hidroperóxidos, ozono, permanganatos, periodatos e semelhantes. Agentes oxidantes biologicamente aceitáveis podem ser utilizados para reduzir potenciais problemas associados a resíduos e contaminações da população de células induzida por apoptose.

Durante a preparação da população de células com apoptose induzida deve-se ter o cuidado de não aplicar níveis excessivos de tensão oxidativa, radiação, tratamento farmacológico, etc. porque caso contrário pode existir um risco significativo de necrose de pelo menos algumas das células em tratamento. A necrose provoca a ruptura da

membrana celular e a libertação do conteúdo celular, frequentemente com resultados biologicamente prejudiciais, particularmente episódios inflamatórios, de forma que é melhor evitar a presença de células necróticas e respectivos componentes juntamente com a população de células que compreende células apoptóticas. Os níveis apropriados de tratamento da população de células para induzir a apoptose e o tipo de tratamento eleito para induzir a apoptose são facilmente determinados pelos peritos na técnica.

Um processo de acordo com a presente invenção envolve a cultura de células do sujeito ou de uma linhagem de células de mamífero compatível. As células cultivadas podem então ser tratadas extracorporeamente para induzir a apoptose e criar uma população de células. O tratamento extracorporeal pode ser seleccionado do grupo constituído por anticorpos, agentes quimioterapêuticos, radiação, fotoforese extracorporeal, ultrassons, proteínas e agentes oxidantes. As células suspensas no plasma do sujeito ou outro meio adequado, tal como soro fisiológico ou um meio de cultura de células de mamífero equilibrado, podem então ser administradas como indicado seguidamente.

Os métodos de detecção e quantificação da apoptose são úteis para a determinação da presença e nível da apoptose na preparação a ser administrada ao sujeito. O número de células apoptóticas numa população de células necessário para se obter as vantagens clínicas necessárias num sujeito pode variar conforme a fonte das células, o estado do sujeito, a idade e peso do sujeito e outros factores relevantes, que são facilmente determináveis por métodos bem conhecidos. De preferência, o número de células

apoptóticas que são administradas a doentes são .1 a 50 biliões, mais preferencialmente, 1 a 10 e o mais preferido 2,5 a 7,5 biliões.

Numa forma de realização, as células submetidas à apoptose podem ser identificadas por um "escalamento" característico do ADN, observado na electroforese em gel de agarose, resultante da clivagem do ADN numa série de fragmentos. Noutra forma de realização, a expressão de superfície da fosfatidil-serina em células pode ser utilizada para identificar e/ou quantificar uma população de células induzida por apoptose. A medição das alterações do potencial da membrana mitocondrial, que reflecte alterações da membrana mitocondrial é outro método reconhecido de identificação de uma população de células. Vários outros métodos de identificação de células submetidas à apoptose e de uma população de células, muitos utilizando anticorpos monoclonais contra marcadores específicos para uma população de células foram também descritos na literatura científica.

A administração de células apoptóticas da presente invenção e antagonista de TNF- α é útil no tratamento da artrite e outras doenças autoimunes. São também úteis no tratamento ou profilaxia de pelo menos uma doença relacionada com problemas autoimunes numa célula, tecido, órgão, animal ou paciente, incluindo, sem constituir limitação patologias imunitárias ou autoimunes agudas e crónicas, tal como lúpus sistémico eritematoso, artrite reumatóide, tiróidose, doença enxerto contra hospedeiro, esclerodermia, diabetes mellitus, doença de Graves e semelhantes e doenças atópicas, incluindo patologias inflamatórias crónicas, tal como sarcoidose, doença

inflamatória intestinal crónica, colite ulcerosa e doença de Crohn.

A título de exemplo, o transplante de órgãos sólidos pode ser tratado mais vantajosamente pela presente invenção do que mediante a administração de um antagonista do TNF- α isolado. A rejeição aguda do transplante de um órgão sólido ocorre em 30% a 60% dos doentes na sequência do transplante pulmonar e em menor escala no caso do fígado, rim, coração, etc. devido ao sucesso de agentes imunossuppressores. A reacção imunitária mediada por linfócitos (células) contra os antígenos do transplante consiste no principal mecanismo de rejeição aguda. Uma rejeição retardada ou crónica provoca a destruição do enxerto meses ou anos após o transplante e é caracterizado por destruição vascular conducente a necrose do tecido transplantado. Esta rejeição não é actualmente suprimida em grande nível pelos regimes padrão e a necessidade de uma tolerância imunitária mais sustentável constitui uma necessidade significativa por satisfazer.

A deterioração tardia do enxerto ocorre ocasionalmente e este tipo crónico de rejeição progride frequentemente de forma insidiosa apesar da maior terapêutica imunossopressora. O quadro patológico difere do da rejeição aguda. O endotélio arterial está inicialmente envolvido com extensiva proliferação que pode gradualmente obstruir o lúmen do vaso resultando em isquemia e fibrose do enxerto.

Os imunossuppressores são actualmente muito utilizados para controlar a reacção de rejeição e são os principais responsáveis pelo êxito do transplante. No entanto, estes fármacos suprimem todas as reacções imunológicas, tornando

assim uma forte infecção a principal causa de morte em receptores de transplantes.

O tratamento existente com imunossupressores pode diferir no caso de diferentes tipos de transplantes. Os aloenxertos hepáticos são rejeitados de forma menos agressiva do que outros aloenxertos de órgãos. Por exemplo, a rejeição hiperaguda de um transplante hepático não ocorre invariavelmente em doentes que tenha sido previamente sensibilizados a antigénios HLA ou incompatibilidades ABO. A terapia típica com imunossupressores num adulto envolve a utilização de ciclosporina, normalmente administradas IV a 4 a 6 mg/kg/dia, com início no momento do transplante e depois 8 a 14 mg/kg/dia po quando a alimentação é tolerada. As doses são ajustadas de modo descendente se ocorre disfunção renal e os níveis no sangue são utilizados como escalas aproximadas da dose adequada.

No transplante de coração, os regimes imunossupressivos são semelhantes aos transplantes dos rins ou fígado. No entanto, a rejeição aguda nos transplantes pulmonares e cardio-pulmonares ocorre em > 80% dos doentes, podendo, no entanto, ser gerida com sucesso. Os doentes são tratados com corticosteróides, considerando, administrando IV rapidamente em dosagem elevada, ATG ou OKT3. ALG ou OKT3 profilácticos são também frequentemente administrados durante as duas primeiras semanas após o transplante. O transplante do pâncreas é único entre os transplantes de órgãos vascularizados: Em vez de ser utilizado para salvar uma vida, tenta-se estabilizar ou prevenir as complicações do órgão alvo devastador da diabetes tipo I. Porque o receptor troca os riscos da injeção de insulina com os riscos de imunossupressão, o transplante do pâncreas tem

sido geralmente limitado principalmente a doentes que já necessitam de fármacos drogas imunossupressores (isto é, doentes diabéticos com insuficiência renal que recebem um transplante de rim).

Os doentes com mielóide aguda ou leucemia linfoblástica podem beneficiar do transplante de medula óssea (TMO). TMO pediátrica tem-se expandido devido ao seu potencial para curar crianças com doenças genéticas (por exemplo, talassemia, anemia falciforme, imunodeficiências, deficiências congénitas do metabolismo). Outra opção para o TMO é o transplante autólogo (remoção da medula do próprio doente, quando se induz uma remissão completa, seguida por tratamento ablativo do doente na esperança de destruir qualquer tumor residual e resgate com a própria medula óssea do doente). A partir do momento em que se utiliza um auto-enxerto, não é necessária qualquer imunossupressão para além da quimioterapia de alta dose a curto prazo utilizada para erradicação do tumor e ablação da medula óssea, problemas pós-transplante com DECH são mínimas.

A taxa de rejeição é $< 5\%$ em transplantes para doentes com leucemia de dadores HLA idênticos. Para multiplicar os doentes com transplantes com anemia aplástica, a taxa de rejeição foi também significativamente reduzida devido ao aumento de imunossupressão durante a indução de transplante. No entanto, as complicações podem surgir, incluindo a rejeição pelo hospedeiro do enxerto de medula, DECH aguda e infecções. As complicações tardias incluem DECH crónica, imunodeficiência prolongada e recidiva da doença.

Enxerto versus hospedeiro (DECH) é mais beneficemente tratado por esta invenção do que pela administração de

qualquer outro antagonista do TNF- α isoladamente ou FEC. A doença crónica de enxerto-contra-hospedeiro (DECH) ocorre em 30% a 60% dos doentes após o transplante alogénico de medula óssea (TMO). Tanto a terapia com FEC como com anti-TNF α têm revelado efeitos positivos nesta doença, mas nenhuma destas terapias se pode considerar completa e a anti-TNF α tem sido associada a eventos adversos graves.

Vários outros transplantes podem ser tornados mais eficazes com o tratamento da combinação da presente invenção. Os exemplos incluem, transplante de córnea, aloenxertos de pele, aloenxerto de cartilagem, enxertos ósseos, e transplantes de intestino delgado.

Uma série de outras doenças podem ser tratadas de forma mais eficaz utilizando a presente invenção. Por exemplo, o linfoma cutâneo de célula T é uma doença em que os linfócitos T se tornam malignos e afectam a pele. São comumente utilizados três tipos de tratamento: radiação; quimioterapia e fotoforese. O tratamento do linfoma cutâneo de células T depende do estágio da doença e da idade do doente, assim como da saúde em geral. O tratamento padrão pode ser considerado devido à sua eficácia em doentes em estudos anteriores, ou pode também ser considerada a participação num ensaio clínico. A maioria dos doentes com linfoma cutâneo de célula T não são curados com a terapia padrão e alguns tratamentos padrão pode ter mais efeitos colaterais que os desejados. O tratamento utilizando a presente invenção pode também ser utilizado no tratamento desta doença.

A presente invenção pode também ser utilizada em cirurgia de implantes, por exemplo, com a cirurgia de implante comumente realizada em cirurgia plástica

cosmética e não cosmética. Os implantes podem incluir enxerto dentário, de gordura, por exemplo, para as bochechas, lábios e nádegas, implantes faciais, incluindo os do nariz, bochechas, testa, queixo e no crânio, implantes nas nádegas, implantes mamários, etc. Outros implantes incluem, mas não se limitam a, o anel corneano, cortical, orbital, coclear, músculo (todos os músculos, incluindo os peitorais, glúteos, abdominais, gastrocnêmio, sóleo, bíceps, tríceps), a substituição das articulações e ossos aloplásticos, os implantes de reparação óssea (parafusos, barras, traves, barras, molas), placas de metal, da coluna vertebral, vértebras, cabelo, injeções de botox/colagénio/restylane/ perlane, implantes penianos, implantes de sementes na próstata, implantes mamários (cosmética e reconstrutiva), dispositivos intra-uterinos, implantes hormonais, fetais ou implante de células-tronco, pacemaker, desfibrilhador, artérias/veias/válvulas artificiais e órgãos artificiais.

As doenças autoimunes podem também ser mais eficazmente tratadas utilizando a presente invenção. Estas são doenças, nas quais o sistema imune produz anticorpos para um antígeno endógeno, com lesões consequentes nos tecidos. Os indivíduos podem ser identificados como tendo uma doença através de vários métodos, incluindo, mas não se limitando a, tipagem de ligação HLA, ensaios com base no soro e sangue ou identificação de variantes genéticas, por exemplo, poliformismos de nucleótidos simples(PNSs). Por exemplo, uma vez que se determina que um indivíduo tem a ligação HLA DR4 e foi-lhe diagnosticada artrite reumatóide, pode ser prescrito o tratamento de combinação antagonista FEC e TNF- α . O antagonista TNF- α é infliximab. outros

alelos HLA, também conhecidos como alelos MHC, que são associados a doenças autoimunes incluem B27 (espondilite anquilosante); DQA1 * 0501 e DQB1 * 0201 (doença celíaca); DRB1 * 03, DRB1 * 04, DQB1 * 0201, DQB1 * 0302 e DMA * 0101 (Diabetes Tipo I) e Cw6 (Psoríase). Esses alelos podem ser utilizados para determinar se um indivíduo está a experimentar uma doença auto-imune e, deste modo, se o tratamento de combinação antagonista FEC e TNF- α pode ser utilizado.

Os ensaios com base em soro e no sangue podem ser utilizados para avaliar a predisposição para uma doença. Existe, por exemplo, um ensaio que detecta a presença de anticorpos autonucleares no soro, o que pode dar lugar ao aparecimento de lúpus. Os ensaios com base no soro existem também para prever miocardite autoimune. Para além disso, os ensaios com base no soro podem ser utilizados para determinar níveis de insulina (diabetes) ou enzimas do fígado e do coração para outras doenças. Níveis T-3 podem ser indicadores de Tiroidite de Hashimoto. Depois de ser diagnosticada uma doença a um indivíduo utilizando um ensaio baseado em soro ou sangue, a presente invenção pode ser utilizada para prevenir ou atrasar o aparecimento de, ou reduzir os efeitos destas doenças. Os indivíduos podem ser identificados como tendo predisposição para doença através da identificação de variações genéticas, incluindo, mas não se limitando a, PNSs. Deste modo, numa outra utilização da presente invenção, determina-se primeiramente que um doente tem uma doença autoimune ou tem predisposição para uma doença autoimune, sendo então prescrito a este doente uma combinação de FEC (ou outra administração de células apoptóticas) e um antagonista TNF- α .

Podem ser utilizados testes de diagnóstico padrão para determinar se um doente tem uma doença do tipo acima descrito.

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos não limitativos descrevem ainda a presente invenção.

Nos exemplos 1-5, Células dendríticas derivadas de monócitos foram obtidas da seguinte forma: CMSP foi isolado do sangue periférico de dadores saudáveis por fraccionamento sobre centrifugação em gradiente Ficoll-Hypaque. Os monócitos foram positivamente seleccionados utilizando o kit de isolamento MACS CD14 e o sistema Automacs (Miltenyi Biotec, Alemanha). Os monócitos CD14⁺ foram cultivados em RPMI completa suplementada com 40 ng/ml IL-4 e GM-CSF (Sistemas R&D) durante 5 dias. A secreção de citocina foi induzida por estimulação das células dendríticas com lipopolissacarídeos ("LPS", Sigma). Os procedimentos ELISA standard foram utilizados para medir os níveis de TNF α e IL-12 (Sistemas R&D) nos sobrenadantes de cultura.

Exemplo 1 (Estudo *in vitro* de Inibição de Produção de TNF α)

As células CD14⁺ isoladas de fresco e as células dendríticas derivadas de monócitos (5×10^5 células/poço) foram co-cultivadas numa placa de cultura de tecido de 24 poços com células CD15⁺ tratadas com FEC ($2,5 \times 10^6$ células/poço). Após 2 horas, foram adicionados 0,5 mg/ml LPS a estas culturas. Após 24 horas de estimulação, os sobrenadantes foram recolhidos destas culturas para efeitos de medição de citocinas. Descobriu-se que as células

tratadas com FEC inibiam a produção de $\text{TNF}\alpha$ a partir de células que apresentavam antígenos activados por LPS.

Exemplo 2 (Estudo *in vitro* de Inibição de Produção de $\text{TNF}\alpha$)

As células dendríticas derivadas de monócitos (1×10^5 células/poço) foram colocadas em cultura na presença de quantidades elevadas de LPS isolado ou com células CD15^+ tratadas com FEC (5×10^5 células/poço), com 200 ng/ml de mAb infliximab isolado ou com a combinação de mAb e células CD15^+ tratadas com FEC. Os sobrenadantes de cultura foram colhidos destas culturas às 48 horas para efeitos de medição de produção de $\text{TNF}\alpha$. Descobriu-se que as células tratadas apenas com mAb infliximab tinham aproximadamente 100 pg/ml $\text{TNF}\alpha$. Descobriu-se que as células tratadas apenas com FEC tinham aproximadamente 1000 pg/ml. Enquanto cada um destes tratamentos representa uma redução do valor base em mais de 1000 pg/ml, os níveis sofreram uma descida para uma média inferior a 50 pg/ml ao se utilizar a presente invenção.

Exemplo 3 (Estudo *in vitro* de Inibição de Produção de $\text{TNF}\alpha$)

As células dendríticas derivadas de monócitos (1×10^5 células/poço) foram colocadas em cultura na presença de 0,1 mg/ml LPS isolado ou com células CD15^+ tratadas de fresco com FEC (5×10^5 células/poço), com 200 ng/ml de MAb infliximab isolado ou com a combinação de mAb e células CD15^+ tratadas com FEC. Os sobrenadantes de cultura foram colhidos destas culturas às 48 horas para efeitos de quantificação de produção de $\text{TNF}\alpha$. Descobriu-se que as células tratadas apenas com mAb infliximab tinham aproximadamente 500 pg/ml $\text{TNF}\alpha$. Descobriu-se que as células

tratadas apenas com FEC tinham aproximadamente 1.700 pg/ml. Enquanto cada um destes tratamentos representa uma redução do valor base em mais de 2.300 pg/ml, os níveis sofreram uma descida para aproximadamente 100 pg/ml ao se utilizar a presente invenção.

Exemplo 4 (Estudo *in vitro* de Inibição de Produção de TNF α)

As células dendríticas derivadas de monócitos (1×10^5 células/poço) foram colocadas em cultura na presença de LPS isolado ou com células CD15⁺ tratadas com FEC (5×10^5 células/poço), com 200 ng/ml de mAb infliximab isolado ou com a combinação de mAb e células CD15⁺ tratadas com FEC. Os sobrenadantes de cultura foram colhidos destas culturas às 48 horas para efeitos de medição de produção de TNF α . Outro grupo de células dendríticas foi semelhantemente tratado e os sobrenadantes da cultura foram colhidos destas culturas às 48 horas para efeitos de quantificação de produção de TNF α . Descobriu-se que as células tratadas apenas com mAb infliximab tinham aproximadamente 1.000 pg/ml TNF α . Quando se administrou esta mesma dose de mAb infliximab mAb e o FEC foi conduzido, o nível caiu para aproximadamente 1500 pg/ml. Quando se administraram 8ng/ml de mAb infliximab isolado, o nível foi superior a 1300 pg/ml; a adição do tratamento com FEC reduziu este valor para aproximadamente 100 pg/ml. Doses de mAb infliximab de 40 ng/ml superiores com ou sem a combinação de FEC reduziram o nível para menos do que 100 pg/ml. O efeito de terapia combinada foi, na maioria, pronunciada a níveis baixos de administração mAb infliximab (por exemplo, 2 ng/ml). Estas doses não são normalmente consideradas

terapêuticas e demonstram eficácia a níveis, nos quais normalmente não se prevêem efeitos adversos.

Exemplo 5 (Estudo *in vitro* de Inibição de Outras Citoquinas Pró Inflamatórias)

As células dendríticas derivadas de monócitos (1×10^5 células/poço) foram colocadas em cultura na presença de quantidades aumentadas de MAb infliximab isolado ou com células CD15⁺ tratadas de fresco com FEC (5×10^5 células/poço). As células foram estimuladas com 0,8 ng/ml de LPS. Os sobrenadantes de cultura foram colhidos destas culturas às 48 horas para efeitos de medição de produção de IL-12. Os níveis IL-12 foram reduzidos a partir de um valor base de aproximadamente 150 pg/ml até aproximadamente 125 pg/ml pela utilização de FEC. Uma combinação de FEC e 2 ng/ml de mAb infliximab deram lugar a uma redução dos níveis de IL-12 até aproximadamente 10 pg/ml. Quando foram utilizados 200 ng/ml de mAb infliximab em combinação com FEC, o nível de IL-12 apresentou-se quase como indetectável. Deste modo, a combinação de células tratadas com FEC e mAb infliximab diminuíram significativamente a produção de IL-12 por meio de células dendríticas.

Exemplo 6 (Modelo de Ratinho em Aplicação *In Vivo*) (Profético)

M

Ratinhos

Ratinhos do sexo masculino C3H/HeJ (C3H; H2k), (B6xC3H)F1

(H2bxk), (B6xDBA/2)F1 (H2bxk), C57BL/6 (B6; H2b), e CBA/JCr (CBA; H2k) serão adquiridos a partir do *National Cancer Institute Research and Development Center* (Frederick, MD). Ratinhos B10.BR (H2k) serão adquiridos a

partir dos *Jackson Laboratories* (Bar Harbour, ME). Os ratinhos utilizados para experiências terão entre 6-10 semanas de idade e serão colocados em caixas micro-isoladoras esterilizadas dentro de um local livre de patogénio, onde recebem alimentos autoclavado e água *ad libitum*.

Meios

Uma solução salina tamponada com fosfato (PBS), suplementado com albumina bovina a 0,1% (BSA, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) será utilizada para todas as manipulações *in vitro* de dadores de medula óssea e linfócitos. Imediatamente antes da injeção, as células serão lavadas e ressuspensas em PBS isoladamente. Para se manterem linhas celulares e para ensaios *in vitro*, será utilizado um meio RPMI 1640 (Mediatech, Herndon, VA), suplementado com 10% de soro fetal bovino FBS; GIBCO, Grand Island, NY), 2 mmol/L L-glutamina, 50 IU/mL penicilina e 50 µg/mL estreptomicina.

Anticorpos

A cV1q (aka.CNTO 2213) mAb, um rato/ratinho Fc quimérico IgG2a construído com unidades de rato (Fab)₂ específicas para TNF α murina, e seu controlo isótipo M-T412, um mAb anti-CD4 humano serão facultados pelo Centocor, Malvern, PA. O fluido ascítico que contém mAb será gerado a partir de linhas específicas para as proteínas Thy-1,2 (J1j; AT- TCTIB-184), CD4 (RL172), ou CD8 (3.168) e será utilizado para a preparação de enxertos celulares. IgG anti-ratinho de cabra purificado por afinidade (Cappel, Cosa Mesa, CA) será utilizado para a supressão de células B. Complemento de porquinhos da Índia será adquirido a partir da Rockland Immunochemicals (Gil-

bertsville, PA). Anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-B220, e mAb controlo isotópico, todos acoplados à ficoeritrina (PE), serão todos adquiridos na BD Biosciences (Palo Alto, CA).).

Fotoforese Experimental

Esplenócitos serão colhidos a partir de ninhadas singénicas de ratinhos saudáveis e trabalhado numa suspensão de células individuais por meio de trituração com a parte posterior de uma seringa em PBS. Estas células serão ressuspensas e as células serão lavadas duas vezes com PBS antes de voltar a ser suspensas a $12,5 \times 10^6$ células / ml de PBS. Após a lavagem as células serão ressuspensas num meio gelado e semeadas em aproximadamente 10^6 células/ml num frasco T75. Psoraleno (solução UVADEX) será adicionado a uma concentração final de 200 ng/ml, que é uma diluição de 100 vezes a partir de solução mãe fornecida por Therakos. O frasco será colocado (deitado) na câmara de irradiação de UVA, recebendo aproximadamente 1,5 J/cm² de luz, o que corresponde a 1,5 minuto de luz de fundo quando o tabuleiro se encontra a 6 cm da fonte de luz. As células serão rapidamente removidas do frasco de modo a evitar aderência e colocadas na concentração apropriada para injeção. Se se verificar alguma aderência, o frasco será suavemente raspado ou vertido para que se possa remover a maioria das células.

Transplante de Medula Óssea

A medula óssea será colhida a partir da tíbia e fémur dos ratinhos dadores por meio de lavagem com PBS contendo 0,01% de BSA (PBS / BSA). As células da medula óssea serão esgotadas de células T utilizando um mAb anti-Thi 1,2 (J1 j; American Type Culture Collection, Rockville, MD) na

diluição de 1:100 complemento de porquinho da índia (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA), a uma diluição de 1:6 durante 45 minutos a 37°C. Os linfócitos serão isolados dos baços e nódulos linfáticos dos ratinhos dadores. Os esplenócitos serão tratados com solução salina de lise equilibrada Gey contendo 0,7% de cloreto de amónio (NH_4Cl) para remover as células vermelhas do sangue (RBCs). Após o esgotamento de RBC, o baço e células do nódulo linfático serão reunidos e esgotados de células B ao serem colocadas num prato de Petri de plástico, previamente revestidas com uma diluição de 5 mg/ml IgG anti-ratinho de cabra durante 1 hora a 4°C. Estima-se que estes tratamentos resultem em populações de dadores de aproximadamente 90% - 95% de células CD3^+ , como quantificado por citometria de fluxo fluorescente. Os subconjuntos de células T serão depois isolados por selecção negativa utilizando anti-CD8 (3,168) ou mAb anti-CD4 (RL172) e complemento. Espera-se que estes tratamentos reduzam as populações de subgrupo de células T alvo para níveis de fundo, como determinado pela análise por citometria de fluxo. Os ratinhos receptores serão expostos a uma irradiação total do corpo a 13 Gy a partir de uma fonte a ^{137}CS a 1,43 Gy/min, administrada numa dose separada de 6,5 Gy cada, com um intervalo de 3 horas. Estes ratinhos serão depois transplantados com células de medula óssea tratadas com anti-Thi 1.2 2×10^6 (ATBM; esgotada de células T) em conjunto com o número indicado de células T apropriadas (células T dadoras CD4 ou CD8 enriquecidas), por via intravenosa (i.v.) através da veia caudal. Os ratinhos serão tratados com cV1q anti-TNF- α ou controlo isótipo mAb M-T412 (1 mg; i.p.) 1 dia antes do transplante e uma vez mais nos dias 0, 4, 8 e 12 (todos a

0,5 mg; i.p.). Para experiências GVL, os ratinhos receptores B6 serão testados com uma injeção de células MMB3.19 (1×10^5 em 0.5 mL PBS;

1.p.) um dia antes do transplante do dador ATBM e células T com um horário semelhante de tratamento mAb anti-TNF α . Em ambas as experiências, DECH e GVL, os ratinhos serão diariamente testados relativamente a morbilidade e mortalidade até se concluir a experiência. Os dados serão reunidos a partir de 2-3 experiências e o tempo médio de sobrevivência (MST) será determinado como o ponto de sobrevivência interpolado de 50% de uma regressão linear ao longo de todos pontos de dados do dia da morte, incluindo o zero. As comparações estatísticas para a sobrevivência entre grupos experimentais serão efectuadas pelo ensaio de grau não paramétrico de Wilcoxon. O significado em termos de comparações de peso será determinado pelo teste T em pontos de tempos individuais.

CITOMETRIA DE FLUXO

mAbs adequadas em volumes de 25 μ L será incubada com células $2-5 \times 10^5$ nos poços de uma microplaca de 96 poços com fundo em U a 4°C durante 30 minutos, centrifugada a 1500 rpm durante 3 minutos, e lavada com PBS contendo 0,1% BSA e 0,01% de azida de sódio (tampão de lavagem). A percentagem de células positivas e a intensidade de fluorescência no meio aritmético serão calculadas para cada amostra.

Análise Patológica

Biópsias de pele de espessura total da orelha (3x2 mm) serão recolhidas como amostra a partir de cada ratinho considerando os vários grupos de tratamento e imediatamente fixadas em glutaraldeído a 4% de um dia para o outro e depois lavadas com 0,1 M tampão cacodilato de sódio (pH

7,4). Os tecidos serão pós-fixados com 2% de tetróxido de ósmio durante 2 horas, desidratados em etanol graduado e incorporados em Epon 812. As secções de um micron de espessura serão cortadas com um ultramicrotomo Porter-Blum MT2B, coradas com azul de toluidina e, finalmente, mergulhadas em álcool a 95% para análise microscópica de luz. O número de células epidérmicas disceratóticas/lineares mm, como anteriormente determinado, será contado com um objectivo de x100 e com um óculo de x10 de um microscópio de luz. Mais do que dez mm lineares da epiderme será avaliada em cada animal e cada ponto de tempo. A análise será realizada mediante condições cegas no que se refere aos grupos de tratamento.

Efeito de mAb anti-TNF α em DECH mediado por célula T CD8

Para se determinar se o tratamento mAb anti-TNF α poderia afectar o desenvolvimento de DECH mediado por células T CD8, será utilizado o modelo DECH compatível com MHC e díspar com miHA B10.BRàCBA GVHD, uma vez que é uma etiologia bem estabelecida. Os ratinhos CBA serão letalmente irradiados (13 Gy, dose dividida) e transplantados com células B10.BR. As células ATBM (2×10^6), isoladas, ou para além de uma população altamente enriquecida (95%) de células Tf CD8⁺ (3×10^6). Os ratinhos vão ser deixados de ser tratados ou tratados com MT412 mAb controlo compatível com isótipo ou o mAb anti-TNF α cV1q) mAb no dia -1 (1 mg, i.p.) e dias 0,4,8 e 12 do transplante (0,5 mg; i.p.) Enquanto todos os receptores de células ATBM isoladas irão sobreviver durante, pelo menos, 70 dias, os ratinhos transplantados com células T dadoras e deixados de tratar ou tratados com mAb MT412 de controlo, irão

sucumbir ao DECH com valores MST semelhantes de aproximadamente 20 dias. Por contraste, os receptores CBA de células T de dador, mas que receberam cV1q mAb, irão exibir uma sobrevivência de aproximadamente 40% com uma MST de aproximadamente 50 dias, a qual será significativamente diferente da do grupo de controlo MT412. Para além disso, os ratinhos sobreviventes tratados com anti-TNF α mAb não irão apresentar sintomas evidentes de GVHD (por exemplo, pele enrugada, lesões cutâneas, postura arqueada, ou diarreia) e o seu peso corporal apresentará um nível relativamente constante variando entre 5-12% abaixo do grupo de controlo ATBM transplantado. Os ratinhos que efectivamente desenvolvem DECH fatal na presença de cV Iq irão fazê-lo com cinéticas mais lentas comparativamente aos grupos MT412 tratados e não tratados. Quando cV1q é administrado a 0,1 mg i.p. não se verifica uma redução significativa no início da DECH.

FEC experimental será administrado por injeção intravenosa de 10^7 esplénocitos singénicos a partir de uma ninhada de ratinhos de controlo no mesmo dia em que o BMP e 3 dias depois. Receptores CBA de células T do dador, mas que recebeu células tratadas com FEC, irão exibir uma sobrevivência de aproximadamente 20% com uma MST de aproximadamente 30 dias, o que será significativamente diferente do grupo de controlo. Para além disso, os ratinhos sobreviventes tratados com FEC irão apresentar evidência diminuída de sintomas de GVHD (por exemplo, pele enrugada, lesões cutâneas, postura arqueada, ou diarreia) e o seu peso corporal apresentará um nível relativamente constante variando entre 5-20% abaixo do grupo de controlo ATBM transplantado. Os ratinhos que efectivamente

desenvolvem DECH fatal na presença de células tratadas com FEC irão fazê-lo com cinéticas mais lentas comparativamente aos grupos não tratados.

A combinação do tratamento com FEC com doses sub-eficazes de tratamento anti-TNF α irá ser superior a qualquer tratamento isolado. Receptores CBA de células dadoras T, mas administradas com cV1q mAb a 0,1 mg conjuntamente com FEC, irão exibir uma sobrevivência de aproximadamente 60% com uma MST de aproximadamente 70 dias, a qual será significativamente diferente do grupo de controlo. Para além disso, os ratinhos sobreviventes duplamente tratados não irão apresentar sintomas evidentes de GVHD (por exemplo, pele enrugada, lesões cutâneas, postura arqueada, ou diarreia) e o seu peso corporal apresentará um nível relativamente constante variando entre 5-12% abaixo do grupo de controlo ATBM transplantado. Os ratinhos que desenvolvem GHVD fatal na presença de terapia dupla irão fazê-lo com uma cinética mais lenta comparativamente aos grupos não tratados e mais lenta comparativamente ao FEC ou grupos anti-TNF isolados.

Efeito de mAb anti-TNF α em DECH através de uma barreira MHC

O modelo do ratinho haploidêntico C3H α (B6xC3H)F1 será utilizado para determinar se a neutralização de TNF α por tratamento de cV1q poderia afectar uma barreira completa de MHC. As células C3H T (CD4+ e CD8+; 5×10^6) e as células ATMB (2×10^6) serão transplantadas i.v. em ratinhos F1 letalmente irradiados (13 Gy, dose dividida) (B6xC3H), o que induz a uma resposta DECH aguda rápida caracterizada por perda de peso considerada grave e morte antecipada (MST de aproximadamente 5 dias). Foram obtidos resultados

semelhantes em receptores tratados com MT412 mAb de controlo, mas estes ratinhos tratados com cV1q (1 mg i.p. no dia 1 e 0,5 mg nos dias 0, 4, 8 e 12) irão exibir uma sobrevivência a longo prazo de aproximadamente 40% com uma MST de aproximadamente 40 dias o que será significativamente diferente comparativamente aos grupos sem tratamento ou grupos de controlo MT412. Tratamento com 0,1 mg de cv1q irá apresentar um efeito não significativo mas notável no início da DECH.

FEC experimental será administrado por injeção intravenosa de 10^7 esplenócitos singénicos a partir de uma ninhada de ratinhos de controlo no mesmo dia em que o BMP e 3 dias depois. Receptores CBA de células dadoras T, mas células administradas tratadas com FEC, irão exibir uma sobrevivência de aproximadamente 20% com uma MST de aproximadamente 10 dias, e que será diferente, embora não significativamente diferente, do grupo de controlo. Para além disso, os ratinhos sobreviventes tratados com FEC irão apresentar evidência diminuída de sintomas de DECH (por exemplo, pele enrugada, lesões cutâneas, postura arqueada, ou diarreia) e o seu peso corporal apresentará um nível relativamente constante variando entre 5-20% abaixo do grupo de controlo ATBM transplantado. Os ratinhos que efectivamente desenvolvem DECH fatal na presença de células tratadas com FEC irão fazê-lo com uma cinética mais lenta comparativamente aos grupos não tratados.

A combinação do tratamento de FEC com doses sub-eficazes do tratamento com anti-TNF α será superior a qualquer tratamento isolado. Receptores CBA de células dadoras T, mas administradas com cV1q mAb a 0,1 mg conjuntamente com FEC, irão exibir uma sobrevivência de

aproximadamente 60% com uma MST de aproximadamente 70 dias, a qual será significativamente diferente do grupo de controlo. Para além disso, os ratinhos sobreviventes duplamente tratados não irão apresentar sintomas evidentes de DECH (por exemplo, pele enrugada, lesões cutâneas, postura arqueada, ou diarreia) e o seu peso corporal apresentará um nível relativamente constante variando entre 5-12% abaixo do grupo de controlo ATBM transplantado. Os ratinhos que desenvolvem DECH fatal na presença de terapia dupla irão fazê-lo com uma cinética mais lenta comparativamente aos grupos não tratados e mais lenta comparativamente ao FEC ou grupos anti-TNF isolados.

Em termos de perda de peso, após uma queda inicial ligeira nos primeiros dias, devido às condições de irradiação, os ratinhos ATBM de controlo irão constantemente ganhar de peso durante todo o restante período da experiência. Por outro lado, os grupos MT412 não tratados e tratados transplantados com células dadoras T não irão nunca recuperar da queda inicial e é muito provável que, ao invés, continuem rapidamente a perder peso até morrer, consistente com GHVD severa. No entanto, os ratinhos tratados com cv1q anti-TNF α mAb irão, de alguma forma, recuperar ao dia 9 e os animais sobreviventes ao dia 37 irão continuar a ganhar peso durante o curso remanescente da experiência, acompanhando aproximadamente 6-12% abaixo do grupo ATBM. Os animais tratados com 0,1 mg de cvlg irão perder peso em apenas uma cinética ligeiramente melhor, embora insignificamente diferente, comparativamente aos animais de controlo. Os animais tratados com FEC irão apresentar um ganho de peso significativamente melhorado e a combinação de anti-TNF e

FEC será virtualmente idêntica para os animais de controle que não recebem BMT ou um grupo anti-TNF de 1 mg.

Efeito de mAb anti-TNF α em DECH mediada pela célula T CD4⁺

Considerando que as respostas das células dadoras CD4⁺ T tendem a dominar o desenvolvimento de DECH no modelo C3H δ (B6xC3H)F1 e à luz da observação inicial de um efeito moderado do tratamento mAb anti-TNF α , quando um inóculo completo de células dadora T foi transplantado, iremos então focar a nossa atenção no componente DECH mediado por CD4. A injeção de células 3x10⁶ C3H CD4⁺ T conjuntamente com células 2x10⁶ ATBM em ratinhos F1 (13 Gy, dose dividida) (B6xC3H) irradiados, irá fazer com que a maioria de ratinhos não tratados (aproximadamente 75%; MST de 10-30 dias) e ratinhos de controle MT412 (aproximadamente 80%; MST de 10-30 dias) sucumbam a DECH aguda severa. Por contraste, 100% dos ratinhos tratados com o mAb anti-TNF α cV1q (1 mg i.p. no dia 1 e 0,5 mg nos dias 0, 4, 8, & 12) irão sobreviver para além de 60 dias. Estes ratinhos não irão apresentar quaisquer sintomas visíveis de DECH e irão rapidamente recuperar da sua perda de peso inicial a seguir à irradiação e irão continuar a ganhar peso até ao final da experiência em paralelo ao grupo de controle ATBM. O efeito altamente significativo do tratamento com cV1q na sobrevivência na DECH mediada com CD4 irá sugerir que o efeito mais modesto observado anteriormente com a transferência de um inóculo completo da célula dadora T se deverá provavelmente à menor inibição das respostas classe I anti-MHC mediadas pela CD8. No entanto, esta situação não pode ser testada directamente neste modelo porque as células C3H CD8⁺ T purificadas não têm, por si só,

capacidade para mediar DECH letal sem a presença de células $CD4^+$ T.

O tratamento com 0,1 mg de anticorpos cV1q anti-TNF α apresentará um efeito mais modesto na inibição de DECH. Aproximadamente 40% dos animais irão sobreviver após 60 dias. Os ratinhos sobreviventes irão apresentar sinais iniciais de DECH, mas estes irão desaparecer e a perda de peso não será melhorada tão rapidamente como no grupo cV1q de 1 mg. No entanto, estes sinais serão significativamente diferentes comparativamente aos grupos de controlo.

FEC experimental será administrado por injeção intravenosa de 10^7 esplenócitos singénicos a partir de uma ninhada de ratinhos de controlo no mesmo dia em que o BMP e 3 dias depois. Receptores F1 de células dadoras T, mas células administradas tratadas com FEC, irão exibir uma sobrevivência de aproximadamente 20% com uma MST de aproximadamente 10-25 dias, e que será diferente, embora não significativamente diferente, do grupo de controlo. Para além disso, os ratinhos sobreviventes tratados com FEC irão apresentar evidência diminuída de sintomas de DECH (por exemplo, pele enrugada, lesões cutâneas, postura arqueada, ou diarreia) e o seu peso corporal apresentará um nível relativamente constante variando entre 5-20% abaixo do grupo de controlo ATBM transplantado. Os ratinhos que efectivamente desenvolvem DECH fatal na presença de células tratadas com FEC irão fazê-lo com cinéticas mais lentas comparativamente aos grupos não tratados.

A combinação do tratamento com FEC com doses sub-eficazes de tratamento anti-TNF α irá ser superior a qualquer tratamento isolado. Os receptores CBA de células dadoras T, mas administradas com mAb cV1q a 0,1 mg

conjuntamente com FEC, irão exibir uma sobrevivência ao dia 60, a qual será significativamente diferente dos grupos de controlo. Para além disso, os ratinhos sobreviventes duplamente tratados não irão apresentar sintomas evidentes de DECH (por exemplo, pele enrugada, lesões cutâneas, postura arqueada, ou diarreia) e o seu peso corporal apresentará um nível relativamente constante variando entre 5-12% abaixo do grupo de controlo ATBM transplantado. Os ratinhos que desenvolvem GHVD fatal na presença de terapia dupla irão fazê-lo com uma cinética mais lenta comparativamente aos grupos não tratados e, embora não estatisticamente significativo, mais lenta comparativamente ao FEC ou grupos anti-TNF isolados.

Exemplo 7 (Pedido de Patente Humana para efeitos de sinergia e redução da toxicidade da terapia anti-TNF- α isolada) (Profético)

Exemplo Sumário

Este exemplo irá demonstrar que o regime de intensidade de anti-TNF α em conjunto com FEC possui um perfil de toxicidade significativamente melhor do que os propostos na literatura. Inicialmente será utilizado 1 mg/kg de infliximab anti TNF α . No entanto, a proporção de doses úteis pode variar de 0,1 mg/kg a 3 mg/kg.

Doentes

Os doentes irão receber um transplante de uma célula estaminal hematopoiética alogénica (HSC) utilizando um regime modelo ditado pelos locais e protocolos acordados e não se limitará aos seguintes medicamentos; incluídos corticosteróides orais e intravenosos, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, micofenolato de mofetil (MMF). Os doentes a receber transplantes HSC não-mieloablativos irão

receber uma quimioterapia condicionada com busulfano e fludarabina, e todos os regimes de profilaxia DECH diferentes. O seroestatuto CMV de pares receptor-dador e os períodos de acompanhamento médios serão semelhantes. FEC será administrado utilizando um procedimento estandardizado antes do HSC e possivelmente em vários momentos a seguir ao HSC. O infliximab será administrado após o HSC a uma dose de 0,5 mg/kg. Os doentes serão acompanhados e classificados utilizando procedimentos estandardizados, tal como a escala modificada de Glucksberg e os dados serão recolhidos num regime profiláctico DECH, data do início e total máximo e grau de órgão específico.

IFIs serão classificados de acordo com o consenso internacional *2002 European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)/National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)*. Casos de IFI serão identificados por revisão dos registos médicos de todos os doentes identificados no grupo e por revisão de todas as bases de dados da patologia, microbiologia, controlo de infecção e radiologia. Os médicos irão documentar as suas descobertas sem conhecimento da exposição de infliximab.

Para efeitos de análise, será apenas considerada IFI comprovada ou provável e não derivada de espécies *Cândida*. A data para IFI será documentada como o dia em que o procedimento de diagnóstico será efectuado para IFI comprovada ou como o dia em que os dados de radiologia e microbiologia se encontrarem disponíveis aos médicos para IFI provável. Se for realizado um diagnóstico de IFI após morte, a data IFI será considerada a data da morte, mas uma vez confirmado um diagnóstico de IFI provável no exame pós

morte, a data IFI será documentada como o dia em que será realizado o diagnóstico de IFI provável.

Todas as doses de corticosteróides recebidas pelos doentes com DECH severa serão transformadas em equivalentes de prednisona utilizando a tabela de equivalência de corticosteróides. A dose de corticosteróides cumulativa, ajustada ao peso corporal, será calculada desde o dia de HSCT até à morte, o desenvolvimento de IFI, o final do período de acompanhamento de grupo, ou quando os corticosteróides quando ajustados a uma dose abaixo de 20 mg/d durante mais de 30 dias. A utilização antifúngica empírica e profiláctica será documentada.

Os doentes sobreviventes serão censurados nessa data ou na última consulta antes dessa data O estudo será aprovado por órgãos administrativos/reguladores apropriados.

Análise Estatística

O teste exacto de Fischer de dois lados, o teste de Wilcoxon, ou o teste χ^2 serão utilizados como apropriados em termos de comparação das características base. As taxas de incidência de IFI a rácio de taxa de incidência serão calculadas de acordo com categorias de exposição diferentes desde o dia do transplante no grupo HSCT, e desde o dia do início de DECH nos doentes que desenvolveram DECH severa; os doentes serão censurados à morte ou na última consulta antes do final do acompanhamento. Intervalos de confiança para taxas de incidência e rácios de taxa de incidência serão calculados utilizando o método Haensze e Byar, respectivamente. As curvas de Kaplan-Meier serão calculadas em termos de sobrevivência e tempo para IFI a partir da data do transplante. Nesses doentes com DECH severa, será igualmente calculado o tempo para a IFI desde

o aparecimento de DECH severa. Os tempos para o evento serão comparados utilizando o teste de log-rank. A análise de regressão de Cox dependente do tempo para a IFI desde o aparecimento de DECH será realizada para controlar possíveis contornos ou interações entre as variáveis para doentes com DECH severa. Os modelos Cox univariáveis serão calculados para todos os factores de risco possíveis entre os doentes com DECH severa. Todas as variáveis com um valor P de menos de .2 na análise de Cox univariável da IFI serão considerados no modelo Cox multivariável. O infliximab será adoptado como uma variável dependente do tempo; a sua exposição será assumida como constante a partir do momento em que se iniciarem as perfusões semanais. Serão apenas retidas as variáveis candidatas que serão associadas estatisticamente de modo significativo ($P < ,05$) com IFI no modelo final a não ser que se registem contornos significativos. O sistema SAS para Windows, versão 8.01 (SAS Institute, Carey, NC), será o utilizado para as análises acima mencionadas.

Resultados

Incidência de e tratamentos para DECH aguda

FEC será administrado aproximadamente 2 vezes antes do HSC aos dias -10 a -4 antes do HSC. Para além disso, a terapia FEC será administrada aproximadamente semanalmente para ainda prevenir o desenvolvimento de DECH aguda durante os primeiros 100 dias após o transplante. Uma análise preliminar irá demonstrar uma sobrevivência semelhante e as taxas da IFI entre doentes sem DECH e aqueles com DECH grau I para II; conseqüentemente, estes grupos serão reunidos em nenhuma DECH ou numa DECH não severa. A DECH severa será definida com um grau total de III ou IV. Cerca de 20% no

grupo irão desenvolver DECH aguda grave. A proporção de dadores não relacionados será superior em doentes com DECH severa quando comparada com o resto do grupo; caso contrário, as características base serão semelhantes. Os receptores de transplante HSC mieloablativo e não-mieloablativo, a proporção de qualquer grau de DECH ou DECH severa será semelhante.

Os doentes diagnosticados com DECH severa podem receber múltiplos medicamentos que podem incluir MMF e corticosteróides numa dose inicial de pelo menos 2mg/kg/d, ajustados conforme a resposta e a adição ou aumento na dose de um inibidor de calcineurina ou sirolimus.

A administração de infliximab será iniciada aproximadamente 10-50 dias após o diagnóstico inicial de DECH aguda. Os doentes irão receber 2-15 doses de 1 mg/kg numa base semanal ou bissemanal. Ao se estabelecer uma comparação com os doentes que não receberam infliximab, verifica-se que os receptores terão maior probabilidade de apresentar sinais e sintomas de DECH.

IFIs no grupo

IFIs comprovadas ou prováveis não derivadas de espécies Cândida (aspergiloses, zigomicoses, etc.) serão diagnosticadas no grupo durante o período de observação.

A IFI IR total entre os doentes com DECH severa será de aproximadamente 1 caso/1000 doentes DECH-dia. Entre as características base, a HSCT não-mieloablativa será associada a uma IFI IR significativamente aumentada de aproximadamente 3 casos/1000 doentes DECH-dia, enquanto os receptores de transplante HSC mieloablativo que desenvolveram DECH severa apresentam uma IFI IR inferior a 1 caso/1000 doentes DECH-dia. Características de protocolos

HSCT não mieloablativos, tais como, regime de condicionamento, tendo recebido células tronco do sangue periférico, e uso de ciclosporina para profilaxia de DECH, serão também associados a um risco ligeiramente maior de IFI.

O tempo da IFI desde o aparecimento de DECH entre os doentes com DECH aguda será estratificado pela utilização de 3 mg/kg infliximab. Existirá uma probabilidade significativamente maior de IFI em receptores de infliximab. O tratamento com FEC não apresentará um aumento estatisticamente significativo em IFI.

O modelo de análise de regressão Cox dependente do tempo para desenvolvimento de IFI em doentes com DECH aguda irá ser desenvolvido. Os rácios de perigo univariáveis (HRs) serão calculados para todos os possíveis factores de risco de IFI. Apenas as características com valores HR P não ajustados de menos do que 0,20 serão consideradas no modelo multivariável.

As variáveis que serão colineares com um HSCT não-mieloablativo descrito não serão incluídas separadamente, e considerando que as 10 IFIs serão analisadas, duas co-variáveis com os maiores valores HR e valor P inferior a 0,05 serão mantidas no modelo final. Considerando que o infliximab será administrado preferencialmente aos doentes com DECH gastrointestinal severa e que o grau 3 ou 4 de órgão específico gastrointestinal será considerado como estando significativamente associado à IFI no modelo Cox univariável, esta co-variável será mantida no modelo final para minimizar contornos por indicação, mesmo que se torne não significativa na presença de outras co-variáveis adaptadas. O HR ajustado pela utilização de infliximab,

como uma co-variável dependente do tempo, será de aproximadamente 14; o HR ajustado de HSCT não mieloablativo será de aproximadamente 8. O HR ajustado de DECH de órgão específico gastrointestinal severo de grau 3 ou 4 será de aproximadamente 4 na presença da utilização de infliximab e tipo de transplante como co-variáveis. O tempo para a função de perigo de IFI de exposição de infliximab 3 mg / kg irá apresentar um perigo crescente ao longo do tempo. A utilização de 1mg/kg ou menos de infliximab não irá revelar um aumento significativo em HR. A FEC isolada irá apresentar um HR não significativamente diferente comparativamente àqueles doentes tratados apenas com o regime standard. A combinação de infliximab de dose baixa com FEC resultará numa HR significativamente mais baixa comparativamente a infliximab de dose alta isoladamente. Em conjunto com o aumento da eficácia desse tipo de tratamento está uma modalidade de tratamento mais eficaz e mais segura.

Sobrevivência

A sobrevivência média de todo o grupo no final do acompanhamento será de aproximadamente 250-400 dias. Quando estratificada de acordo com a severidade de DECH, a sobrevivência média dos doentes com DECH severa será significativamente menor do que em doentes com nenhuma DECH ou DECH não severa. Entre os doentes com DECH severa, a sobrevivência média de receptores de infliximab 3 mg/kg pode ser significativamente inferior do que a dos não receptores. Os doentes tratados com FEC apresentarão um modelo de sobrevivência significativo relativamente aos doentes com um regime standard ou aos doentes que recebem infliximab de dose baixa isoladamente. O facto de se

diminuir a dose de infliximab para 1 mg/ kg ao longo do regime FEC standard irá resultar em melhoramentos significativos na classificação de DECH ainda que a IFI associada a níveis elevados de infliximab será drástica e estatisticamente reduzida.

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista das referências citadas pelo requerente serve apenas para conveniência do leitor. Esta lista não faz parte do documento da patente europeia. Apesar da compilação cuidadosa das referências, os erros ou as omissões não podem ser excluídos e o EPO rejeita toda a responsabilidade a este respeito.

Documentos de patente citados na descrição:

- US 6365362 B
- US 6361749 B
- US 6228624 B
- US 6136182 B
- US 6120856 B
- US 6013532 B
- US 6013188 B
- US 5993665 B
- US 5985153 B
- US 5876593 B
- US 5795470 B
- US 5741714 B
- US 5698271 B
- US 5660990 B
- US 5646001 B
- US 5622831 B
- US 5597531 B
- US 5541072 B
- US 5512332 B
- US 5466574 B
- US 5200084 B
- US 5186827 B
- US 5108933 B

- US 4795698 B
- US 6451203 B
- US 6442397 B
- US 6315707 B
- US 6284142 B
- US 6251284 B
- US 6033561 B
- US 6027441 B
- US 5494578 B
- US 4321919 A
- US 5399719 A
- US 4683889 A
- US 480893 A
- US 5951509 A
- US 5985914 A
- US 5984887 A
- US 4464166 A
- US 4428744 A
- US 4398906 A
- WO 9736634 A
- WO 9736581 A
- WO 0180924 A
- US 6219584 B

Literatura, não relacionada com patentes, citada na descrição:

- Redei et al. Salvage therapy with infliximab for patients with severe acute and chronic GVHD. Blood, vol.98 (11), 399a
- Couriel et al. Infliximab for the treatment of graft-versus-host disease in allogeneic transplant recipients: an update. Blood, vol. 96 (11), 400A

- Rook et al. Photopheresis: Clinical applications and mechanism of action. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, vol. 4(1), 85-90
- Salvioli et al. FEBS LETTERS, 1997, vol. 411, 77-82
- Teiger et al. J. CLIN. INVEST., 1996, vol. 97, 2891-97

REIVINDICAÇÕES

1. Produto combinado compreendendo:
 - a) uma população *ex vivo* de células previamente sujeitas a um tratamento *ex vivo* indutor da apoptose e
 - b) infliximab numa dose que não exceda 3 mg/kg, para administração simultânea ou sequencial a um doente, para utilização no tratamento de uma doença autoimune ou na melhoria de um ou mais dos respectivos sintomas.
2. Produto para utilização de acordo com a reivindicação 1, destinado a administração simultânea.
3. Produto para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por a população de células ser obtida a partir de uma porção de sangue.
4. Produto para utilização de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por as células serem leucócitos autólogos.
5. Produto para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado por a população de células ter sido submetida a um tratamento indutor da apoptose, que é um procedimento de fotoforese extracorporal (FEC) que emprega um composto fotoactivável em conjunto com luz de um comprimento de onda que activa o referido composto fotoactivável.

6. Produto para utilização de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o composto fotoactivável ser um psoraleno e a luz ser UVA.
7. Produto para utilização de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o psoraleno ser 8-metoxipsoraleno (8-MOP).
8. Produto para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, para utilização em tratamento de lúpus sistémico eritematoso (LSE), artrite reumatóide, tiroidose, doença enxerto contra hospedeiro, esclerodermia, diabetes mellitus, doença de Graves, sarcoidose, doença intestinal inflamatória crónica, colite ulcerativa e doença de Crohn.
9. Produto para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, para utilização no tratamento da doença enxerto contra hospedeiro.
10. Produto para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, para utilização na administração a um receptor de um transplante.
11. Produto para utilização de acordo a reivindicação 10, caracterizado por os componentes a) e b) serem adaptados para serem administrados de acordo com o programa seleccionado do grupo constituído por dois dias, uma semana antes do transplante; três dias, uma semana antes da colheita do referido transplante; dois dias por semana durante duas semanas antes do

transplante; e três dias por semana durante três semanas antes do transplante.

12. Produto para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, em que a referida população de células consiste numa população autóloga obtida do doente antes do transplante e em que o produto compreende ainda uma segunda população de células autólogas obtidas do doente depois de o referido doente ter recebido o referido transplante e em que a referida segunda população de células foi submetida ao tratamento indutor da apoptose.
13. Produto para utilização de acordo com a reivindicação 12, em que os componentes a) e b) são adaptados para serem administrados de acordo com um programa seleccionado do grupo constituído por dois dias, uma semana antes do referido receptor receber o referido transplante; três dias, uma semana antes do referido receptor receber o referido transplante; dois dias por semana durante duas semanas antes do referido receptor receber o referido transplante e três dias por semana durante três semanas antes do referido receptor receber o referido transplante; e a fase c) é executada de acordo com um programa seleccionado do grupo constituído por semanalmente, mensalmente, duas vezes por mês, três vezes por mês, dois em dois meses, três em três meses, seis em seis meses e anualmente.
14. Composição compreendendo infliximab para utilização num método de tratamento de um doente com uma doença

autoimune ou predisposição para uma doença autoimune, em que o referido método compreende o exame do doente para determinar se o doente é portador de uma doença autoimune e administração de infliximab numa dose que não exceda 3 mg/kg e FEC num doente com uma doença autoimune ou predisposição para essa doença.