República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0708446-3 A2**

BRPI0708446A2

(22) Data de Depósito: 23/02/2007
(43) Data da Publicação: 07/06/2011
(RPI 2109)

(51) Int.Cl.:
A61K 45/00 2006.01
A61K 38/21 2006.01
A01N 63/00 2006.01

(54) Título: **TRATAMENTO DE CÂNCER COMBINANDO AGENTE DE LINFODEPLEÇÃO COM CTLS E CITOCINAS**

(30) Prioridade Unionista: 01/03/2006 US 60/778,516

(73) Titular(es): Janssen Pharmaceutica N.V.

(72) Inventor(es): Ann Moriarty, Jon M. Richards, Per A. Peterson, Zeling Cai

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007004841 de 23/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/103009de 13/09/2007

(57) Resumo: TRATAMENTO DE CÂNCER COMBINANDO AGENTE DE LINFODEPLEÇÃO COM CTLs E CITOCINAS. A presente invenção refere-se a um tratamento de câncer combinando terapia celular com quimioterapia, células T $CD8_+$ autôlogas que são obtidas de um paciente, ativadas ex vivo através de contato delas com células apresentando antígeno xenogênicas carregadas com antígeno de peptideo selecionado, deste modo gerando linfócitos T citotóxicos ativados específicos de antígeno. Tais CTLs ativados são administrados ao paciente em conjunto com um regime de linfodepleção e manutenção de CTL compreendendo um agente náo-mieoablativo, mas de linfodepleção, tal como cladribina ou denileucina diftitox, e citocinas estimuladoras interleucina-2 e interferon-º-2b.

PI0708446-3

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"TRATAMENTO DE CÂNCER COMBINANDO AGENTE DE LINFODEPLEÇÃO COM CTLs E CITOCINAS".**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO RELACIONADO

O presente pedido reivindica prioridade do Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos Nº 60/778.516 depositado em 1º de março de 2006.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos para tratamento de câncer em pacientes envolvendo a administração de linfócitos T citotóxicos ativados, citocinas tais como IL-2 e IFN-alfa-2b e cladribina ou denileucina diftitox como um agente de linfodepleção.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Para facilitar uma compreensão da invenção, esta seção pode discutir os antecedentes históricos e técnicos que levam ao desenvolvimento da invenção, incluindo observações, conclusões e pontos de vista que podem ser únicos a um inventor. Deste modo, as declarações de antecedentes aqui não devem ser consideradas como uma admissão com relação ao teor da técnica anterior.

Várias terapias foram desenvolvidas para tratar uma variedade de cânceres. Muitos desses esforços centraram em torno de regimes quimioterapêuticos. Em um regime de quimioterapia de combinação particular chamado tratamento para melanoma metastático, taxas de resposta de 35-50% foram relatadas com o "Regime Dartmouth" (uma combinação de DTIC, cisplatina, BCNU e tamoxifeno), mas a duração de sobrevivência permaneceu em 6 a 10 meses. Altas taxas de remissão também foram relatadas para quimioterapia de intensidade de alta dose agressiva[1] e repleção de hematopoiese com transplantes de medula óssea autólogos. Não obstante, a duração média de sobrevivência foi curta, aproximadamente 4 meses.[2]

Aperfeiçoamentos significantes em sobrevivência da ordem de vários anos foram notados em uma pequena porcentagem de pacientes com melanoma sofrendo certas imunoterapias. Isto inclui imunoterapia específica

ativa com vacinas para câncer, bem como o uso de reforçadores não-específicos do sistema imune, tal como interleucina-2 (IL-2) e interferon-alfa (IFN-α).[3-5]

A identificação de antígenos de tumor definidos por célula T em melanoma levou a testes clínicos que se direcionam a células de câncer através da tentativa de aumentar a resposta imune celular específica de antígeno. Esta abordagem tem sido seguida em várias estratégias de vacina onde os antígenos são aplicados em um contexto imunogênico em uma tentativa de induzir respostas de célula T potentes *in vivo*. Embora algumas respostas clínicas tenham sido observadas nos testes de vacina, a magnitude da resposta de célula T induzida tem sido geralmente baixa, ou indetectável e pobremente correlacionada com respostas clínicas. Imunização de pacientes com melanoma com antígenos de câncer pode aumentar o número de precursores de CTL em circulação; no entanto, ela não se correlacionou com regressão de tumor clínica, sugerindo um defeito em função ou ativação *in vivo*.

Estudos em modelos de tumor de camundongo demonstraram que imunoterapia adotiva, que envolve imunização *in vitro* de células T específicas para um ou mais antígenos de tumor, pode ser eficaz com toxidez mínima. Um obstáculo na aplicação desta estratégia para o tratamento de tumores humanos foi a identificação de antígenos imunogênicos que tornam as células de tumor suscetíveis à destruição mediada por CTL. O isolamento de células T reativas a tumor de pacientes com melanoma levou à identificação de alguns dos antígenos de tumor (epítopos) aos quais CTLs são direcionados. Esses incluem tirocinase, MART-1/Melan A, gp100 e MAGE. Desses, tirocinase e MART-1 são quase que universalmente expressos em melanoma e então representam uma escolha-alvo desejada para imunoterapia adotiva[6-13].

Terapia de célula T adotiva envolve a remoção de células T do ambiente hospedeiro onde mecanismos tolerogênicos são ativos *in vivo* em pacientes com câncer e contribuem para as respostas ineficazes demonstradas nesta população de paciente. Células T $CD8^+$ podem ser estimuladas

ex vivo para gerar CTLs específicos de antígeno (vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 6.225.042). Abordagens de imunoterapia adotiva iniciais usavam linfócitos ativados como um tratamento para vários cânceres.[14] Inicialmente, células assassinas ativadas com linfocina (LAK), e mais tarde linfócitos infiltrantes em tumor (TIL), ativados *ex vivo* com IL-2, foram usados, mas a demonstração da eficácia foi equivocada. Esses testes clínicos controlados, iniciais, falharam em mostrar uma vantagem para o uso das células ativadas *ex vivo* sobre a administração direta de IL-2 a pacientes com melanoma. Estudos mais recentes por Yee e outros (Fred Hutchinson Cancer Research Center)[15] e Dudley e outros (NCI)[16] demonstraram o potencial para certas abordagens terapêuticas de célula T adotiva. Esses estudos envolveram o uso ou de clones de célula T específicos para MART-1 ou gp100 e IL-2 de baixa dose, ou TILS expandidos *ex vivo* com células nutridoras alogênicas e IL-2 de alta dose. Esses estudos confirmaram que imunoterapia adotiva é uma promessa de um tratamento de câncer, embora seu desenvolvimento integral tenha sido impedido pela falta de métodos reproduzíveis para geração *ex vivo* de números terapêuticos de CTLs de $CD8^+$ específicos de antígeno.[17]

Células T $CD8^+$ citotolíticas são uma linha principal de defesa contra infecções virais. Linfócitos $CD8^+$ especificamente reconhecem e lisam células hospedeiras que são infectadas com um vírus. Embora fosse desejável controlar a atividade citotóxica de CTLs, alguns procedimentos *in vitro/ex vivo* foram disponibilizados para especificamente ativar CTLs. A identificação de antígenos associados a melanoma-chave e um método para ativação *in vitro* específica de CTLs permitem uma avaliação eficiente de imunoterapia adotiva para melanoma metastático.[15-18]

Onde for possível usar células apresentando antígeno de ocorrência natural (APCs) para ativação de $CD8^+$ *in vitro* (por exemplo, células dendríticas, macrófagos, células de tumor autólogas), a eficiência de ativação é baixa uma vez que as moléculas de Classe I de MHC de APCs nativas contêm muitos outros epítopos de peptídeo, então permitindo apresentação mínima de epítopos de peptídeo associados a tumor. A maioria desses pep-

tídeos apresentados representa proteínas endógenas inócuas, normais. Uma abordagem mais direta para este problema seria ativar células T $CD8^+$ especificamente para aqueles epítopos relevantes para combater a doença, neste caso particular, antígenos associados a melanoma.

Recentemente, uma APC artificial foi desenvolvida utilizando uma linhagem de célula embriônica de *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), que expressa as moléculas de Classe I de complexo de histocompatibilidade principal (MHC).[18,19] Vide também Patentes U.S. Nºs 6.225.042 e 6.355.479. Uma vez que o inseto *Drosophila* não tem um sistema imune avançado, os transportadores de peptídeo TAP-1,2, que estão envolvidos no carregamento de epítopos de peptídeo nas moléculas de Classe I humana, estão ausentes. Como resultado, as moléculas de Classe I transfectadas aparecem na superfície de célula de *Drosophila* como recipientes vazios. Ao incubar essas células de *Drosophila* transfectadas com peptídeos sintéticos exógenos que se ligam a moléculas de Classe I específicas (isto é, epítopos de peptídeo de célula T de antígeno de tumor), todas as moléculas de Classe I disponíveis podem ser ocupadas com epítopo(s) de peptídeo específico(s), restrito(s) a MHC. A expressão de alta densidade das moléculas de Classe I apresentando epítopos únicos ou múltiplos, e a adição de moléculas co-estimuladoras-chave B7-1 (CD80), CD70, LFA-3 (CD58) e ICAM-1 (CD54) nessas APCs de *Drosophila* permitem a geração *in vitro* de células T $CD8^+$ citotóxicas autólogas, potentes, que são específicas para os peptídeos antigênicos.[20]

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Vários aspectos gerais e modalidades preferidas da invenção são refletidos nas reivindicações apensas a este relatório descritivo, que são incorporadas aqui a título de referência. Outras modalidades, características e vantagens preferidas dos vários aspectos da invenção se tornarão aparentes a partir da descrição detalhada tomada em conjunto com as figuras dos desenhos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 ilustra atividade citotóxica de CTLs gerados *ex vivo*

direcionados contra células-alvo carregadas com peptídeo. Células T $CD8^+$ isoladas de um paciente com melanoma foram imunizadas *in vitro* com APCs de *Drosophila* carregadas com cinco epítopos de peptídeo associados a melanoma diferentes. As células T ativadas $CD8^+$ foram culturadas *in vitro* usando IL-2 e IL-7 para seletivamente expandir os CTLs específicos de melanoma. Atividade foi avaliada como lise específica de células-alvo T2 marcadas com ^{51}Cr individualmente carregadas com cada peptídeo (Tyr-1_{689}, Tyr-2_{792}, gp100-1_{817}, gp100-2_{853} ou MART-1_{819} versus células T2 carregadas com um peptídeo controle HLA-A2).

A Figura 2 provê uma ilustração esquemática de duas modalidades preferidas de regimes de tratamento de acordo com a invenção junto com um regime controle.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO E SUAS MODALIDADES PREFERIDAS

Os vários aspectos da invenção são ilustrados abaixo através da descrição detalhada de modalidades específicas e preferidas. Por questão de brevidade, as descrições de todas as patentes e outras publicações citadas aqui são incorporadas a título de referência. A menos que aqui definido de outro modo ou aparente a partir do contexto, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme geralmente usado na técnica.

Os termos "incluindo", "compreendendo" e "contendo" são usados aqui em seu sentido não-limitante, aberto.

Os regimes terapêuticos da invenção, que compreendem administração de CTLs que foram ativados pelo contato de xAPCs carregadas com peptídeo selecionado em conjunto com citocinas e pelo menos um agente de linfodepleção selecionado de cladribina e DAB-IL2, podem ser empregados para tratar câncer em um indivíduo com necessidade de tal tratamento. De preferência, o câncer é selecionado de melanoma maligno, mieloma múltiplo, câncer de próstata, linfoma, linfoma de não-Hodgkin, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide aguda, leucemia linfocítica crônica, leucemia mielóide crônica, linfoma de Burkitt, câncer da tireóide,

câncer uterino, câncer de fígado, câncer ovariano, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de fígado, câncer pancreático, câncer de próstata, câncer de colo, câncer de pele, câncer de estômago e câncer cervical.

Então, em uma modalidade preferida, a invenção provê um regime de terapia de CTL adotiva para tratamento ou melhora de um melanoma metastático compreendendo: obtenção de células T $CD8^+$ puras de um indivíduo; contato das células T $CD8^+$ puras com células apresentando antígeno xenogênicas (xAPCs) que foram carregadas com antígeno de peptídeo selecionado, deste modo gerando CTLs ativados que se direcionam a células expressando o antígeno de peptídeo selecionado; administração de CTLs ativados de volta ao indivíduo; administração de pelo menos um agente de linfodepleção selecionado de cladribina e DAB-IL2; e administração de pelo menos duas citocinas que realizam persistência de CTL. O regime de terapia de CTL adotiva emprega de preferência células T $CD8^+$ que são ativas *ex vivo*, que quando ativadas e administradas a um indivíduo de acordo com a invenção são capazes de destruição *in vivo* de células de tumor carregando epítopos antigênicos associados a câncer.

O termo "indivíduo" neste contexto refere-se a um paciente mamífero com necessidade de tratamento para um câncer. Por exemplo, um indivíduo pode ser um ser humano diagnosticado com um melanoma, tal como um melanoma metastático maligno avançado, por exemplo, um paciente que foi diagnosticado ser HLA-A2 positivo e ter doença não-ressectável Estágio III/IV.

O agente CTL é preparado a partir de xAPCs. Células apresentando antígeno xenogênicas exemplares (xAPCs) que são adequadas para uso podem incluir os componentes que seguem: uma molécula de MHC I exógena; uma ou mais moléculas de auxílio exógenas para auxiliar na ativação de células T puras; e células hospedeiras capazes de expressão das moléculas exógenas em sua superfície. De preferência, as moléculas exógenas são codificadas por ácido nucléico xenogênico que foi introduzido nas células hospedeiras. As xAPCs de preferência também expressam moléculas co-estimuladoras e de adesão exógenas, que potencializam a capacida-

de de ativação de célula T das xAPCs. De preferência, as células hospedeiras são células de inseto, com mais preferência células de *Drosophila,* tais como células Schneider 2 (S2). xAPCs exemplares e métodos para sua fabricação são descritos nas, por exemplo, Patentes U.S. Nºs 6.225.042 e 6.355.479.

As xAPCs podem ser carregadas com antígeno de peptídeo através de uma variedade de métodos conhecidos ou disponíveis na técnica. Peptídeos são selecionados que são capazes de ligação às moléculas de Classe I de MHC vazias. Peptídeos selecionados de preferência correspondem a epítopos compreendendo seqüências de aminoácido antigênicas ou imunogênicas derivadas de proteína expressa nas superfícies de células, que vão servir como alvos para as células T empregadas na terapia de CTL adotiva. A fim de carregar moléculas de Classe I de MHC vazias com peptídeo selecionado, uma ou mais espécies de peptídeo antigênico ou imunogênico que se ligam a moléculas de Classe I de MHC podem ser contatadas com as xAPCs sob condições adequadas para a ligação acontecer.

Uma ou mais espécies de peptídeo antigênico ou imunogênico podem ser selecionadas. Se mais de uma espécie for selecionada, elas podem ser contatadas com as xAPCs simultaneamente ou em casos distintos, resultando em complexos de MHC-peptídeo multiantigênicos ou multiimunogênicos produzidos nas xAPCs.

Carregamento do peptídeo selecionado em moléculas de MHC vazias de preferência acontece sob condições que se aproximam de condições de ligação biológica, que podem ser aproximadas *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Na seleção de peptídeos, o versado pode considerar um ou mais fatores tais como considerações termodinâmicas, eletrostáticas, energéticas e entrópicas, bem como aminoácidos específicos dentro de peptídeos selecionados que são requeridos para ligação eficaz a moléculas de MHC.

Peptídeos preferidos incluem, por exemplo, os peptídeos correspondendo a seqüências de aminoácido selecionadas de uma proteína tirocinase, uma proteína gp100 e uma proteína MART-1. Outros peptídeos preferidos incluem YMNGTMSQV (SEQ ID NO:1), YMDGTMSQV (SEQ ID NO:2),

AAGIGILTV (SEQ ID NO:3), ITDQVPFSV (SEQ ID NO:4), YLEPGPVTA (SEQ ID NO:5) e KTWGQYWQV (SEQ ID NO:6). Peptídeos exemplares adicionais que podem ser selecionados incluem, por exemplo, as seqüências de aminoácido que seguem, onde a proteína da qual cada peptídeo é derivado é escrita parenteticamente : SILSLKEAST (C-Lectina; SEQ ID NO:1), KMASRSMRL (C-Lectina; SEQ ID NO:2), ALALAALLVV (Pec 60; SEQ ID NO: 3), ALLVVDREV (Pec60; SEQ ID NO: 4), YMNGTMSQV (Tirocinase; SEQ ID NO:5), YMDGTMSQV (Tirocinase; SEQ ID NO:6), ITDQVPFSV (gp100; SEQ ID NO:7), YLEPGPVTA (gp100; SEQ ID NO:8), AAGIGILTV (MART-1; SEQ ID NO:9), ELAGIGILTV (MART-1; SEQ ID NO:10), CLTSTVQLV (Her-2/neu; SEQ ID NO:11), HLYQGCQVV (Her-2/neu; SEQ ID NO:12), KIFGSLAFL (Her-2/neu; SEQ ID NO:13), IISAVVGIL (Her-2/neu; SEQ ID NO:14), PLTSIISAV (Her-2/neu; SEQ ID NO:15), VMAGVGSPYV (Her-2/neu; SEQ ID NO:16), VLVKSPNHV (Her-2/neu; SEQ ID NO:17), ELVSEFSRM (Her-2/neu; SEQ ID NO:18), YLSGANLNL (CEA; SEQ ID NO:19), GPLTPLPV (AES; SEQ ID NO:20), SLLMWITQC (NY-ESO-1; SEQ ID NO:21), KALFAGPPV (CA-125; SEQ ID NO:22), YLETFREQV (CA-125; SEQ ID NO:23), GLQSPKSPL (CA-125; SEQ ID NO:24), VLLKLRRPV (CA-125; SEQ ID NO:25), ELYIPSVDL (CA-125; SEQ ID NO:26), SLLMWITQV (NY-ESO-1; SEQ ID NO:27), ILAKFLHWL (Telomerase; SEQ ID NO:28), STAPPVHNV (MUC-1; SEQ ID NO:29), FLWGPRALV (MAGE-3; SEQ ID NO:30), FMWGNLTLA (CA-125; SEQ ID NO:31), RLVDDFLLV (Telomerase; SEQ ID NO:32), HLSTAFARV (G250; SEQ ID NO:33), QLSLLMWIT (NY-ESO-1; SEQ ID NO:34), ELWTHSYKV (FBP; SEQ ID NO:35), KVAELVHFL (MAGE-3; SEQ ID NO:36), YIFATCLGL (MAGE-3; SEQ ID NO:37), HLYIFATCL (MAGE-3; SEQ ID NO:38), MLMAQEALAFL (CAMEL; SEQ ID NO:39), STLEKINKT (SSX-4; SEQ ID NO:40), KASEKIFYV (SSX-2; SEQ ID NO:41), SLLMWITQCFL (NY-ESO-1; SEQ ID NO:42), ELTLGEFLKL (Survivina; SEQ ID NO:43), LTLGEFLKL (Survivina; SEQ ID NO:44), SLLEKREKT (SP17; SEQ ID NO:45), TLGEDDPWL (SART-1; SEQ ID NO:46), KLGLKPLEV (SART-1; SEQ ID NO:47), YLWTSAKNT (SCP-1; SEQ ID NO:48), STAPPAHGV (MUC-1; SEQ ID NO:49), GMGSEELRL (LIVIN; SEQ ID

NO:50), SLGSPVLGL (LIVIN; SEQ ID NO:51), YLFFYRKSV (hTRT; SEQ ID NO:52), CQQEETFLL (CA-125; SEQ ID NO:53), TLAKFSPYL (PRAME; SEQ ID NO:54), NLTHVLYPV (PRAME; SEQ ID NO:55), STFKNWPFL (Survivina; SEQ ID NO:56), SLLQHLIGL (PRAME; SEQ ID NO:57), FLDQRVFFV (gp100; SEQ ID NO:58), FLDQRVFVV (gp100; SEQ ID NO:59), FLDQVAFVV (gp100; SEQ ID NO:60), GLDREQLYL (MUC-16; SEQ ID NO:61), VMQHLLSPL (MUC-16; SEQ ID NO:62), QQTHGITRL (MUC-16; SEQ ID NO:63), LQPLSGPGL (MUC-16; SEQ ID NO:64), TLDRDSLYV (MUC-16; SEQ ID NO:65), QLYLELSQL (MUC-16; SEQ ID NO:66), KVLEYVIKV (MAGE-1; SEQ ID NO:67), KVADLVGFL (MAGE-1; SEQ ID NO:68) e KTWGQYWQV (SEQ ID NO:70).

Peptídeos selecionados podem ser apresentados às células através de uma variedade de meios e métodos na técnica. Peptídeos selecionados podem ser apresentados de uma maneira que os permite entrar em um grupo intracelular de peptídeos. Por exemplo, peptídeos podem ser apresentados através de carregamento osmótico. De preferência, peptídeos são adicionados ao meio de cultura do sistema de xAPC. Os peptídeos podem ser adicionados ao meio de cultura na forma de um polipeptídio ou proteína intacto que é subseqüentemente degradado através de processos celulares, tais como, por exemplo, degradação enzimática. Alternativamente, o polipeptídio ou proteína intacto pode ser degradado através de alguns outros meios tais como digestão química (por exemplo, brometo de cianogênio) ou proteases (por exemplo, tripsina e quimiotripsina) antes da adição ao meio de cultura do sistema de xAPC. Alternativamente, uma seqüência de proteína ou polipeptídio inteira pode ser clonada em um vetor apropriado e inserida em uma célula procariótica, como o que a célula gera quantidades significantes do polipeptídio antigênico que são então coletadas, purificadas e digeridas em peptídeos que são então adicionados ao meio de cultura de sistema de xAPC.

Uma quantidade suficiente de cada peptídeo selecionado pode ser adicionada à cultura de célula para permitir que moléculas de MHC de Classe I se liguem e subseqüentemente apresentem uma densidade grande

do peptídeo sobre a superfície de células expressando MHC de Classe I humanas.

As xAPCs podem ser ensaiadas quanto à função de APC aumentada comparado com a função de APC de células apresentando antígeno não-xenogênicas ou endógenas. Função de APC aumentada pode ser determinada medindo qualquer um de uma variedade de parâmetros de ativação de célula T $CD8^+$, tais como, por exemplo, um grau de uma ou mais expressões de proteínas de superfície celular, que é indicativa de ativação de célula T $CD8^+$, tal como expressão de superfície de célula CD69, um grau de diferenciação, um grau de habilidade de morte citotóxica, um grau de lise de célula específica e um grau de produção de citocina.

Purificação de proteínas e peptídeos pode ser conseguida através de várias técnicas que são conhecidas na arte, tal como cromatografia de imunoafinidade, cromatografia de afinidade, precipitação de proteína, trocas de tampão, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de exclusão de tamanho. CTLs estimulados por antígeno podem ser detectados ou isolados por tingimento de tetrâmero peptídeo-MHC pMHC, onde CTLs detectados são específicos para um peptídeo selecionado apresentado pelas xAPCs.

Leucócitos de sangue periférico (PBLs) são obtidos de um indivíduo, e de preferência purificados. *Métodos para purificação de PBLs incluem, métodos empregando gradientes Ficoll podem ser utilizados para este propósito.* Os PBLs purificados são então misturados com células xAPCs pré-incubadas com os peptídeos antigênicos apropriados. De preferência, PBLs são purificados através de sistemas de purificação de conta magnética que estão na técnica, tais como contas Miltenyi (Myltenyi Biotec) e sistemas Dynabead (Dynal Biotech). PBLs podem ser também purificados através de procedimentos de classificação celular, tais como com métodos baseados em classificação de célula auxiliada por fluorescência (FACS), ou outros dispositivos e metodologia de separação de células apropriados. Tais métodos de separação de célula ou separação de células sanguíneas vermelhas usando proteína fluorescente (GFP) como um marcador para várias proteínas

específicas de célula.

Células T puras são incubadas em cultura com as xAPCs apropriadas e carregadas com peptídeo selecionado por um período de tempo suficiente para ativar e enriquecer mais uma população de células $CD8^+$. Por exemplo, a Patente U.S. Nº 4.690.915 descreve um método de obtenção de números grandes de linfócitos através de linfocitoferese. De preferência, as células $CD8^+$ são ativadas de uma maneira específica de antígeno. A razão de células $CD8^+$ em repouso ou precursoras (efetoras) para células apresentando antígeno pode variar de indivíduo para indivíduo e pode depender ainda de variáveis tais como a tendência dos linfócitos de um indivíduo a condições de cultura e a natureza e severidade do câncer. De preferência, no entanto, a razão de linfócito:célula apresentando antígeno (por exemplo, célula de *Drosophila*) está de preferência na faixa de cerca de 30:1 a 300:1. Por exemplo, em uma modalidade, $3x10^7$ PBL humano e $1x10^6$ células de *Drosophila* vivas são misturados e mantidos em 20 ml de meio de cultura RPMI 1640.

A cultura efetora/apresentando antígeno pode ser mantida por um tempo mais longo do que necessário para ativar e enriquecer uma população de um número terapeuticamente útil ou eficaz de células $CD8^+$. Com um nível de ativação de $CD8^+$ específico máximo geralmente sendo observado após um a dez dias de cultura, por exemplo, após cinco dias de cultura, um tempo preferido é de a partir de cerca de três a sete dias. Em uma modalidade da presente invenção, ativação *in vitro* de células T $CD8^+$ pode ser detectada dentro de um breve período de tempo após transfecção de uma linhagem de célula. Em uma modalidade, expressão transiente em uma linhagem de célula transfectada capaz de ativação de células T $CD8^+$ é detectável dentro de 48 horas de transfecção. Então, culturas ou estáveis ou transientes de células transformadas expressando moléculas de MHC de Classe I são eficazes na ativação de células T $CD8^+$.

Linfócitos T citotóxicos ativados podem ser eficazmente separados de xAPCs (por exemplo, células de *Drosophila*) usando um método adequado conhecido ou disponível na técnica. Por exemplo, anticorpos mono-

clonais específicos para as APCs artificiais, para os peptídeos carregados nas APCs artificiais ou para os CTLs (ou um segmento dos mesmos), podem ser utilizados para ligar seu ligante complementar apropriado. Células marcadas com anticorpo podem então ser extraídas da mistura de célula estimuladora-efetora através de qualquer um de uma variedade de métodos na técnica, tais como, por exemplo, métodos de imunoprecipitação e imunoensaio. Alternativamente, uma etapa de separação pode ser omitida completamente e as xAPCs inativadas podem ser deixadas em cultura com os CTLs ativados.

Quantidades citotóxicas, terapeuticamente eficazes, dos CTLs ativados podem ser selecionadas conforme adequado para os usos *in vitro* e *in vivo* descritos, por exemplo, em vista da quantidade e tipo de células que são o alvo final dessas células de CTL. A quantidade será também selecionada em vista da condição do paciente e pode ser determinada através da consideração de todos os fatores apropriados pelo praticante. De preferência, cerca de $1x10^6$ a cerca de $1x10^{12}$, com mais preferência cerca de $1x10^8$ a cerca de $1x10^{11}$, com mais preferência ainda cerca de $1x10^9$ a cerca de $1x10^{10}$, células $CD8^+$ ativadas são utilizadas para seres humanos adultos, comparado com cerca de $5x10^6 - 5x10^7$ células usadas em camundongos.

De preferência, as células $CD8^+$ ativadas, que são CTLs, são coletadas conforme acima descrito da cultura de xAPC antes da administração das células CTLs ao indivíduo sendo tratado. O sistema de cultura celular de preferência não é tumorigênico. Deste modo, se separação completa de células de *Drosophila* e células $CD8^+$ ativadas não for conseguida, não deve haver nenhum perigo inerente associado com a administração de um número pequeno de células de *Drosophila*.

Células T $CD4^+$ ou células T $CD8^+$ puras, ou ambas células T $CD4^+$ e células T $CD8^+$, podem ser de preferência extraídas de um indivíduo antes da incubação com culturas de xAPC. Indivíduos podem sofrer qualquer um de uma variedade de procedimentos de separação de célula sanguínea conhecidos ou disponíveis (por exemplo, leucoferese) para coletar células sanguíneas brancas.

Células T puras podem ser coletadas de um indivíduo antes do início de outro tratamento ou terapia que possa interferir com, atenuar ou de qualquer modo limitar a ativação específica de métodos e usos de células T puras conforme provido na presente invenção. Por exemplo, no tratamento de um indivíduo com uma neoplasia ou tumor, uma amostra de células T puras pode ser obtida antes do início de um tratamento de quimioterapia ou de radiação e mantida em cultura. Após as células puras serem ativadas com xAPCs carregadas com peptídeo, as células T puras podem ser expandidas e ativadas, e os CTLs ativados podem ser introduzidos de volta no indivíduo. Alternativamente, células T puras podem ser ativadas, e os CTLs ativados podem ser introduzidos de volta no indivíduo de onde as células T puras foram obtidas antes, após, ou em conjunto com outras formas de tratamento opcionais, tais como quimioterapia ou radiação.

Os CTLs ativados podem ser também suspensos em um veículo apropriado para aplicação e infusão em um indivíduo. Técnicas de reintrodução de componentes celulares são conhecidas na arte e incluem procedimentos tais como aqueles exemplificados nas Patentes U.S. Nºs 4.844.893 e 4.690.915. Por exemplo, administração de células de CTLs ativados através de infusão intravenosa pode ser empregada. Infusões múltiplas podem ser requeridas, e essas infusões podem acontecer durante um período de várias semanas ou mais.

Nos regimes de tratamento da invenção, citocinas são também administradas para atingir persistência de CTL e então aumentar as propriedades de meia-vida, atividade, potência e/ou seletividade dos CTLs que são administrados a um indivíduo. Tal persistência pode resultar de um efeito direto sobre os CTLs ou de um efeito indireto que envolve supra-regulagem de expressão de antígeno em células alvo dos CTLs. Citocinas preferidas são IFN-α-2b e IL-2.

Agentes de linfodepleção Cladribina (2-CdA, Leustatin®) e/ou DAB IL-2 (ONTAK®) são também administrados nos regimes de tratamento da invenção. Esses agentes são não-mieloablativos e elicitam uma imunossupressão transiente em indivíduos recebendo a terapia de CTL.

O momento e a duração da administração de cada um do CTL, citocina e agentes de linfodepleção podem ser selecionados pelo versado na técnica com base em experimentação de rotina e a orientação aqui, incluindo os exemplos abaixo.

Para ilustrar vários aspectos e características da invenção, os exemplos que seguem são providos.

EXEMPLOS

Preparação Ex-Vivo de CTLs

Linhagens de APC xenogênica (xAPC) são geradas de células Schneider S2 (células S2), que foram estabelecidas em 1969 de várias centenas de embriões de *Drosophila melanogaster* (Oregon-R) Oregon-R (tipo selvagem) de 20 a 24 horas de vida, de acordo com procedimentos publicados (Schneider, *J. Embryol. Morph.* 27:353-365, 1972). A linhagem de célula S2 foi depositada com o American Type Cultura Collection (CRL10974). O fornecimento original de células S2 usado para derivar as linhagens de célula das quais as xAPCs derivaram é obtido desta fonte. A fim de gerar xAPCs, células S2 são transfectadas com vetores derivados de vetor de plasmídeo pRMHa-3 (vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 6.225.042). Uma linhagem de xAPC, chamada clone A, é transfectada com vetores codificando HLA-A2.1 Classe I, B7.1 e ICAM-1. Uma segunda linhagem de xAPC, chamada clone B, é transfectada com vetores codificando HLA-A2.1 Classe I, B7.1, B7.2, ICAM-1 e LFA-3. Uma terceira linhagem de xAPC, chamada clone C, é transfectada com vetores codificando HLA-A2.1 Classe I, B7.1, ICAM-1, LFA-3 e CD70. Então, clone A expressa HLA-A2, B7.1 e ICAM-1, clone B expressa HLA-A2.1 Classe I, B7.1, B7.2, ICAM-1 e LFA-3 e clone C expressa HLA-A2.1 Classe I, B7.1, ICAM-1, LFA-3 e CD70.B7.2 e LFA-3.

Culturas contínuas independentes de células descendentes de clone A e clone B são mantidas em meio Schneider suplementado com soro bovino fetal a 10% e 500 µg/ml de geneticina (G418) e são divididas duas vezes por semana com meio fresco adicionado durante cada divisão para ajustar a densidade celular para aproximadamente 1 x 10^6 células/mL. Aproximadamente um dia antes da indução (dia -2 a -4; dia 0 definido como o dia

que as células são testadas quanto à expressão de moléculas exógenas e são carregadas com peptídeo), 3 x frascos T75 são inoculados com um volume de suspensão celular mantida em culturas de estoque equivalente a 1,5 x 10^7 células/frasco. Meio Drosophila-SFM completo sem G418 é adicionado para trazer o volume até 15 ml/frasco. Os frascos são então incubados em uma câmara em aproximadamente 27°C. Aproximadamente no dia -1 a -3, as células são então induzidas através da adição de sulfato de cobre ($CuSO_4$) para uma concentração final de 1,0 mM (diluição 1:200 de estoque a 200 mM de $CuSO_4$; 75 µl de $CuSO_4$ para cada frasco T75 contendo 15 ml de suspensão celular) e retornadas para a câmara a 27°C. O tempo de indução dura aproximadamente 24 a 72 horas.

No dia 0, frascos contendo culturas de célula induzida são checados visualmente e microscopicamente quanto à evidência de contaminação. Frascos não-contaminados são agrupados e células viáveis contadas. Amostras de culturas de célula agrupadas de aproximadamente 6x10^6 células são avaliadas através de citometria de fluxo usando análise de separação de célula auxiliada por fluorescência (FACS) para determinar o nível de expressão de moléculas exógenas. Culturas de célula (aproximadamente 1 x 10^7 células) são então testadas para verificar a expressão de HLA-A2.1, B7.1 e ICAM-1 (para células de Clone A) ou HLA-A2.1, B7.1, B7.2, ICAM-1 e LFA-3 (para células de Clone B) exógenas antes do carregamento de peptídeo. Uma vez a expressão de moléculas exógenas sendo verificada, cada cultura de célula é lavada dividindo cada cultura em dois tubos cônicos de 50 ml estéreis. Cada tubo é então enchido com meio HYQ SFX-Insect (Hyclone) e centrifugado a 1.700 rpm (600 x g) por aproximadamente sete minutos para peletizar as células. Sobrenadantes são descartados, e os tubos contendo pélete de célula são novamente centrifugados a 1.700 rpm (600 x g) por aproximadamente um minuto. Sobrenadantes são removidos com uma pipeta de ponta fina. Péletes de cada cultura de célula dividida são então recombinados e ressuspensos em 8 mL de meio SFX Insect para uma densidade celular de aproximadamente 1 x 10^7 célula/mL. Aproximadamente 40 µL de uma solução de estoque de microglobulina β2 a 1,0 mg/mL e 24 µL de uma

diluição 1:50 de uma solução combo de peptídeo de estoque a 1,67 mg/mL para cada peptídeo são adicionados a cada cultura ressuspensa. Então, cada suspensão de cultura celular contém microglobulina β2 em uma concentração final de aproximadamente 5 µg/mL e cada peptídeo selecionado pode ser carregado a xAPCs em uma concentração final de aproximadamente 0,1 µg/mL por peptídeo. Culturas de célula são incubadas na suspensão contendo microglobulina β2 e peptídeos por pelo menos quatro horas, e não mais do que oito horas, com serpenteamento a cada 30 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação de peptídeo, alíquotas de aproximadamente 1 mL de cada cultura celular são distribuídas separadamente em oito tubos de polipropileno (Falcon 2006). Qualquer suspensão de cultura de célula residual é descartada.

Células $CD8^+$ isoladas de amostras de leucaferese através de seleção positiva com um anticorpo anti-CD8 são estimuladas contra peptídeos associados a melanoma humano (tirocinase-689369-377, tirocinase-792369-377, MART-1-81927-35, gp100-817209-217, gp100-818280-288 e gp100-835154-162) apresentados por células de *Drosophila* expressando moléculas de Classe I humanas e co-estimulação/adesão HLA-A2.1, B7.1, CD70, LFA3 e ICAM-1. Células $CD8^+$ são reestimuladas por duas rodadas com monócitos autólogos (pulsados com os epítopos descritos) na presença de IL-2 e IL-7. O número de células efetoras é então aumentado através de estimulação não-específica com anticorpo monoclonal anti-CD3 na presença de células nutridoras autólogas irradiadas com gama e IL-2. Atividade de linfócito T citotóxico é medida contra células T2 carregadas com peptídeo e um painel de células de melanoma, enquanto a pureza de células T $CD8^+$ estimuladas *in vitro* é avaliada através de citometria de fluxo.

Materiais

Linhagem de Célula	Fonte
Drosophila S2	ATCC
Malme 3	ATCC (Fibroblasto de pele normal de um paciente com melanoma)
Malme 3M	ATCC (Melanoma metastático de pulmão, mesmo paciente que Malme 3)

Linhagem de Célula	Fonte
M14	UCSD; vide US 5.208.146 e Cahan e outros, *PNAS U.S.A.* 1982, Vol. 79(24), pp. 7629-7633 (HLA-A2.1 melanoma humano)
01-KN	J&JPRD; vide US 2004-0071671 (Linhagem de célula de melanoma HLA-A2.1, negativo para antígeno de melanoma)
K562	ATCC (Linhagem de célula eritroleucêmica humana; alvo para células NK)
Células T2	ATCC (Híbrido de linfoblasto B e T humano, negativo para classe II)

Reagentes

rhIL-7. Interleucina-7 humana recombinante (IL-7) é uma linfocina produzida em *E. coli* e purificada pelo fornecedor (PreproTech) usando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) mas não anticorpo. IL-7, recebida como um pó, é diluída em DPBS estéril contendo albumina de soro humano a 1%. A solução bruta é então filtrada através de um filtro de 0,2 µm, separada em alíquota (30.000 U/mL, concentração de 1000X) em frascos estéreis e armazenada a -80°C antes do uso.

rhIL-2. Interleucina-2 humana recombinante (IL-2) é produzida através de tecnologia de DNA recombinante e fornecida pela Chiron Corporation (Proleukin®). IL-2, recebida como um pó, é diluída em diluente de IL-2 (albumina de soro humano a 0,5% em ácido acético a 50 mM), filtrada através de um filtro de 0,2 µm, separada em alíquota em frascos estéreis (20.000 U/mL, concentração de 1000X) e então armazenada a -80°C antes do uso.

Peptídeo de Tirocinase YMNGTMSQV. Um peptídeo de tirocinase (tyr 369-377), correspondendo aos aminoácidos 369-377 de tirocinase humana, é fabricado e purificado usando padrões obedientes a GLP (Synpep Corporation). O pó de peptídeo conforme recebido do fabricante (Synprep Corporation) é dissolvido em sulfóxido de dimetila (DMSO) para atingir uma solução de peptídeo de estoque em uma concentração de 10 mg/mL, e é armazenado a -72°C a -88°C antes do uso. Esta solução de peptídeo de estoque é mistura em partes iguais com outras soluções de estoque de pep-

tídeo (também em uma concentração de 10 mg/ml) para gerar soluções de peptídeo de combinação para uso em carregamento de xAPCs. As soluções de peptídeo de combinação são separadas em alíquota em frascos estéreis em uma sala limpa de Classe 10.000 sob condições assépticas em uma cabine de biossegurança de Classe II.

Peptídeo de Tirocinase YMDGTMSQV. Uma forma desaminada do peptídeo tyr 369-377 descrito acima, que contém um resíduo de ácido aspártico no lugar de um resíduo de asparagina na posição três do peptídeo, é fabricada e purificada usando padrões obedientes a GLP (Synpep Corporation). Esta forma de desaminação é chamada tyr 369-377d. O pó de peptídeo recebido do fabricante é dissolvido em sulfóxido de dimetila (DMSO) para atingir uma solução peptídeo de estoque em uma concentração de 10 mg/mL e é armazenado a -72°C a -88°C antes do uso.

Peptídeo de gp100 ITDQVPFSV. Um peptídeo de gp100 ($gp100_{209-217}$), correspondendo aos aminoácidos 209-217 de gp-100 humano, é fabricado e purificado usando padrões obedientes a GLP (Synpep Corporation). O pó de peptídeo é dissolvido em sulfóxido de dimetila (DMSO) para atingir uma solução de peptídeo de estoque em uma concentração de 10 mg/mL e é armazenado a -72°C a -88°C antes do uso.

Peptídeo de gp100 KTWGQYWQV. Um peptídeo de gp100 ($gp100_{154-162}$), correspondendo aos aminoácidos 154-162 de gp100 humano, é fabricado e purificado usando padrões obedientes a GLP. O pó de peptídeo conforme recebido da Synpep Corporation é dissolvido em sulfóxido de dimetila (DMSO) para atingir uma solução de peptídeo de estoque em uma concentração de 10 mg/mL e é armazenado a -72°C a -88°C antes do uso.

Peptídeo de gp100 YLEPGVTA. Um peptídeo de gp100 ($gp100_{280-288}$), correspondendo a aminoácidos 280-288 de gp100 humano é fabricado e purificado usando padrões obedientes a GLP pela Synpep Corporation. O pó de peptídeo é dissolvido em sulfóxido de dimetila (DMSO) para atingir uma solução de peptídeo de estoque em uma concentração de 10 mg/mL, e é armazenado a -72°C a -88°C antes do uso.

Peptídeo de MART-1 AAGIGILTV. Um peptídeo de MART-1

(MART-1_{27-35}), correspondendo aos aminoácidos 27-35 de MART-1 humano, é fabricado e purificado usando obediência a GLP (Synpep Corporation). O pó de peptídeo é dissolvido em sulfóxido de dimetila (DMSO) para atingir uma solução de peptídeo de estoque em uma concentração de 10 mg/mL e é armazenado a -72°C a -88°C antes do uso.

DYNABEADS® M-450. DYNABEADS® M-450 (SAM) IgG são contas paramagnéticas estéreis revestidas com IgG anticamundongo de cabra policlonal que se liga à IgG de camundongo primária. DYNABEADS, disponíveis da Baxter Oncology, Inc., são armazenadas a 4°C antes do uso em isolamento de célula T usando o Isolex 300i Magnetic Cell Selector.

Albumina de Soro Humano. HSA a 25%, USP (Baxter Fenwal Laboratories; a fonte de plasma para cada lote testado ser negativo para HIV-1, HIV-2, HCV e HBV), é armazenada em temperatura ambiente antes do uso como uma fonte de proteína tamponada durante a preparação de célula T que segue e as etapas de ativação: purificação de células T $CD8^+$ e células T $CD8^-$; carregamento de peptídeo de células aderentes; e formulação final de células T ativadas.

Anticorpo anti-CD8. Anticorpo monoclonal anti-CD8 (37B1A) é um anticorpo monoclonal de murino direcionado contra o antígeno CD8 de células T, que é usado para selecionar células T $CD8^+$ com o sistema Isolex 300i Magnetic Cell Selector. A solução concentrada é diluída em DPBS estéril para uso em processos de isolamento ou ativação de célula T $CD8^+$. A solução é filtrada através de um filtro de 0,2 µm e então separada em alíquotas em frascos de uso único em uma sala de limpeza Classe 10.000 sob condições assépticas em uma cabine de biossegurança de Classe II. Alíquotas (10,0 mg/mL) são armazenadas a -80°C antes do uso.

Peptídeo de Cadeia Alfa CD8 – AAEGLDTQRFSG. Peptídeo de cadeia leve alfa CD8 (AAEGLDTQRFSG) é purificado e fabricado sob padrões obedientes a GLP. O peptídeo de cadeia alfa CD8 é usado em processos de isolamento de célula T $CD8^+$ para liberar células T $CD8^+$ capturadas usando anticorpo CD8 (38B1A) e o Isolex 300i Magnetic Cell Selector. Cada lote de peptídeo é fabricado pela Synprep Corporation para satisfazer

os padrões de grau farmacêutico, e é testado quanto à seqüência, pureza, peso molecular e aparência de peptídeo. O peptídeo de cadeia alfa CD8, recebido como um pó, é processado mais para criar uma solução de estoque de 10 mg/ml. Esta solução de estoque é diluída em DPBS, filtrada através de um filtro de 0,2 µm, separada em alíquotas em frascos estéreis e armazenada a -72°C a -88°C antes do uso. Enchimento do reagente de peptídeo em frasco é realizado em uma sala limpa de Classe 10.000 sob condições assépticas em uma cabine de biossegurança de Classe II.

Microglobulina β2M Humana. Um concentrado de microglobulina beta-2 humana (β2M) produzido através de tecnologia de DNA recombinante é diluído em DPBS estéril para atingir uma concentração de 1,0 mg/mL. A solução bruta é então filtrada através de um filtro de 0,2 µm, separada em alíquota em frascos estéreis e armazenada a -80°C antes do uso durante a preparação e carregamento de peptídeo de xAPCs e carregamento de peptídeo de células aderentes.

Solução de Citrato de Sódio. Uma solução de citrato de sódio anticoagulante não-pirogênica, estéril, USP (Baxter Fenwall), é armazenada em temperatura ambiente (RT) antes do uso como um aditivo de tampão para funcionamento do Isolex 300i Magnetic Cell Selector para seleção de células T $CD8^+$ e células T $CD8^-$.

Meio de Schneider. Meio de *Drosophila* de Schneider é um meio de cultura usado para cultura de células de *Drosophila.* Cada lote de meio é testado pelo fornecedor (Invitrogen Corporation) quanto à osmolaridade, pH, esterilidade e a habilidade em sustentar o crescimento de células de *Drosophila.* O meio de *Drosophila* de Schneider (concentração 1X) é armazenado a 2°C a 6°C antes do uso.

Soro Bovino Fetal. Soro bovino fetal (FBS), que é usado como uma fonte de proteína para o cultivo de células hospedeiras ou células xAPCs, é armazenado a -80°C. O FBS, disponível da Gemini Bioproducts, é processado de sangue fetal bovino de animais de origem dos Estados Unidos. Os animais maternos dos quais o sangue é derivado são livres de doenças infecciosas e contagiosas e parasitas prejudiciais.

Meio HYQ SFX Insect. Meio SFX Insect da Hyclone (Hyclone Corporation) é um meio de cultura livre de soro (concentração 1X) usado durante o carregamento de peptídeo de xAPCs e é armazenado a 2°C a 6°C antes do uso. Este meio não contém produtos de origem bovina.

Sulfato de Cobre. Pentaidrato de sulfato de cobre (II) (Aldrich) é usado para indução de células hospedeiras modificadas para expressar moléculas humanas HLA, co-estimuladoras e de adesão. A solução de estoque é formulada através da dissolução do $CuSO_4$ cristalino em água estéril livre de endotoxina para atingir uma concentração de 200 mM e assepticamente filtrando a solução através de um filtro de 0,2 µm em um recipiente estéril em uma cabine de biossegurança de Classe II. A solução de estoque filtrada é armazenada a 2°C a 6°C antes do uso.

RPMI. Meio de cultura RPMI (disponível da Invitrogen Corporation ou Gibco), que é livre de soro e antibiótico (concentração 1X), é usado para cultivar células T. Meio de cultura RPMI é armazenado a 2 a 6°C antes do uso.

Solução Salina Tamponada com Fosfato da Dulbecco (DPBS). Solução salina tamponada com fosfato da Dulbecco (DPBS) (disponível da Invitrogen Corporation ou Gibco, concentração 1X) é armazenada em RT antes do uso. DBPS é usada para os procedimentos que seguem: funcionamento do instrumento Isolex 300i Magnetic Cell Selector durante a seleção de células T $CD8^+$ e células T $CD8^-$; lavagem de células não-aderentes durante etapas de reestimulação e lavagem de anticorpo monoclonal OKT3 não-ligado durante expansão não-específica; e diluição de microglobulina β2 humana, IL-7, peptídeo CD8 e OKT3.

Meio de Leibovitz. Meio L-15 de Leibovitz (sem L-glutamina; concentração 1X), disponível da Sigma-Aldrich, é armazenado a 2°C a 6°C antes do uso durante carregamento de peptídeo do processo de ativação de célula T.

Anticorpo OKT® 3. Orthoclone OKT® 3 (1,0 mg/mL), um anticorpo monoclonal de murino específico para o antígeno CD3 de células T fornecido em ampolas como uma solução estéril aprovado para uso clínico

(disponível da Ortho), é separado em alíquotas em frascos de uso único sob condições estéreis e armazenado congelado a -80°C antes do uso na ativação de células T.

Geneticina (G418). Geneticina (Invitrogen Corporation) é um antibiótico seletivo usado na cultura de células de *Drosophila* para manutenção da expressão de moléculas exógenas codificadas por ácido nucléico xenogênico. Geneticina é fornecida como uma solução de estoque estéril (50 mg/mL) e é armazenada a 2 a 6°C antes do uso.

Cloreto de Cálcio. Hidrato de cloreto de cálcio é usado para coagulação de plasma autólogo obtido do produto de linfoferese para gerar soro autólogo usado em processos de isolamento ou ativação de célula T $CD8^+$. Hidrato de cloreto de cálcio é recebido como um pó cristalino, é composto em uma solução de estoque (1M) e armazenado a 2°C a 6°C antes do uso. A solução de estoque é formulada dissolvendo cloreto de cálcio em água estéril livre de endotoxina e assepticamente filtrando através de um filtro de 0,2 µm em um recipiente estéril em uma cabine de biossegurança de Classe II.

Ácido Acético. Ácido acético (17,4M) usado para a preparação de soluções de estoque de IL-2 é obtido da Sigma Corporation e armazenado em RT antes do uso.

FICOLL-PAQUE® Plus. Seguindo o isolamento de células T $CD8^+$ e células T $CD8^-$ com o Isolex 300i Magnetic Cell Selector, células mononucleares da fração não-$CD8^+$ são fracionadas mais usando FICOLL-PLAQUE® Plus (concentração 1X), um reagente de gradiente Ficoll sem quaisquer componentes animais disponível da Amersham Pharmacia Biotech usado para remover células mortas, neutrófilos e células vermelhas do sangue. O reagente é armazenado em RT antes do uso.

PENTASPAN®. PENTASPAN (B. Braun Medical Inc.) é uma solução estéril de pentaamido a 10% em cloreto de sódio a 0,9% para uso clínico (NDC 0264-1972,10) e é armazenada em RT antes do uso. Ela é usada (concentração 1X) como um crioprotetor na criopreservação de células T $CD8^-$ e células T $CC8^+$ isoladas.

Sulfóxido de Dimetila (DMSO). DMSO é usado como um crioprotetor na criopreservação de células T $CD8^-$ e células T $CD8^+$ isoladas. A solução de DMSO (concentração 1X), disponível da Sigma-Aldrich, é armazenada em RT antes do uso.

L-Glutamina. L-Glutamina (USP), 200 mM (concentração 100X), disponível da Invitrogen Corporation, é usada como um meio de cultura RPMI suplementado, e é armazenada a -80°C antes do uso.

Solução de Piruvato de Sódio MEM. Solução de piruvato de sódio MEM (100 mM, concentração 100X), disponível da Invitrogen Corporation, é usada para suplementar meio RPMI e é armazenada a 2 a 6°C antes do uso.

Aminoácidos Não-essenciais. Aminoácidos não-essenciais (10 mM; concentração 100X) da Invitrogen Corporation, usados para suplementar meio RPMI, são armazenados a 2 a 6°C antes do uso.

Solução HEPES. Solução tampão HEPES a 1M (concentração 200M) (Invitrogen Corporation), usada para suplementar meio RPMI, é armazenada a 2°C a 6°C antes do uso.

Meio de Célula X-Vivo 10. Meio de cultura de célula X-vivo10, fornecido pela BioWhittaker, é armazenado a 2°C a 6°C antes do uso. Este meio (concentração 1X), que é livre de soro, vermelho fenol e antibiótico, é usado durante a fase de expansão não-específica de células T ativadas por exposição a xAPCs carregadas com peptídeo.

Injeção de Cloreto de Sódio. Uma solução de cloreto de sódio a 0,9%, USP, disponível da Baxter Fenwal Laboratories, é usada para procedimentos de lavagem de célula durante coleta de células T. A solução, que é estéril, não-pirogênica e livre de componentes animais, é armazenada em RT antes do uso.

Solução de Dextrose + Cloreto de Sódio. Uma solução injetável de dextrose a 0,5% e cloreto de sódio a 0,9%, USP (Baxter Fenwall Laboratories), é obtida como uma solução não-pirogênica, estéril, livre de componentes animais. A solução, que é usada como um tampão de armazenamento para células T ativadas, é armazenada em RT antes do uso.

Solução de Ringer Lactada. Uma solução de Ringer Lactada a 0,9%, USP (Baxter Healthcare Laboratories), que é uma solução de cloreto de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de sódio e lactato de sódio em água para injeção (livre de componentes animais) de baixa endotoxina, estéril, é armazenada em RT antes do uso em coleta e suspensão de células T.

Água Destilada. Água destilada de grau de cultura celular, que é obtida através de filtragem em membrana e peneiramento de endotoxina (Invitrogen Corporatio), é usada como um solvente para a preparação de soluções de estoque de sulfato de cobre, cloreto de cálcio e interleucina-2 (IL-2) e é armazenada em RT antes do uso.

Outros Materiais

Produtos de linfoferese são coletados de indivíduos humanos diagnosticados com melanoma e são armazenados em RT antes do uso para a geração de um produto de célula específico de paciente, autólogo.

Soro humano autólogo é usado como uma fonte de proteína para cultura de células T isoladas. Plasma humano autólogo é preparado de produto de linfoferese através da adição de cloreto de cálcio para conseguir coagulação de fibrina e então coleta da fase de soro líquida. A fase de soro líquida coletada é armazenada a 4°C por armazenamento a curto prazo e a -80°C para armazenamento a longo prazo.

Uma linhagem de xAPC de *Drosophila*, derivada do clone B de *Drosophila* xenogênica, que é usada como um estoque de semente para criar uma cultura de xAPC de *Drosophila* contínua, é obtida conforme descrito abaixo.

Procedimentos

Isolamento de Células $CD8^+$ Humanas

Células $CD8^+$ são isoladas de amostras de leucaferese usando uma máquina Isolex 300i (Baxter) através de seleção positiva com um anticorpo monoclonal anti-CD8 (anticorpo1) seguido por um procedimento de isolamento de Dynabeads™ (Dynal) usando IgG anticamundongo de cabra (anticorpo2) revestido sobre contas magnéticas (contas SAM). O anticorpo monoclonal de camundongo CD8 anti-humano é adicionado às células lava-

das ressuspensas em PBS da Dulbecco suplementado com HSA a 1% (Baxter-Hyland) e citrato de sódio a 0,2%. Contas magnéticas Dynal (Dynabeads®) são adicionadas em uma razão de conta para célula de 1:1 a 1:2 dependendo do número de PBMCs. As células $CD8^+$ isoladas são removidas através de separação magnética. A fração não-CD8 restante é coletada e criopreservada para uso futuro durante as etapas de reestimulação e expansão não-específica. Dissociação do complexo célula CD8-anticorpo1-anticorpo2-conta é conseguida através da incubação a 37°C por 45 minutos na presença de $peptídeo_{59-70}$ de CD8 (AAEGLDTQRFSG), o peptídeo para o qual anticorpo1 foi gerado. Contas liberadas são removidas magneticamente e as células $CD8^+$ são contadas e analisadas através de citometria de fluxo para avaliar a pureza. Recuperação de células $CD8^+$ é tipicamente maior do que 80%. Soro inativado por calor é preparado coletando o plasma autólogo no momento da etapa de lavagem de célula inicial. Fibrina é coagulada usando $CaCl_2$ e o coágulo de fibrina removido. Soro é inativado com calor, filtrado, separado em alíquota e congelado a -80°C. Células não-$CD8^+$ são retidas do procedimento de seleção positivo e purificadas usando um gradiente Ficoll. Essas células são criopreservadas em DMSO, Pentaspan e soro autólogo inativado com calor e armazenadas em nitrogênio líquido (LN_2). Essas células são usadas como a fonte de células aderentes no momento das reestimulações e são pulsadas com peptídeo antes do uso como células apresentando antígeno.

Imunização In vitro de células T $CD8^+$ humanas purificadas

Estimulação Primária. Células S2 de *Drosophila* transfectadas são incubadas em meio de Schneider (10^6 células/mL) suplementado com soro bovino fetal a 10% e sulfato de cobre a 27°C por 24 a 72 horas. Células S2 (clone 1120-3-9) são coletadas, lavadas e ressuspensas em meio HYQ SFX-Insect (Hyclone) contendo 0,1 µg/mL de cada peptídeo $gp100_{154-162}$, $gp100_{209-217}$, $gp100_{280-288}$, $MART\text{-}1_{27-35}$, tirocinase-$N_{369-377}$ e tirocinase-$D_{369-377}$ humano e 5 µg/mL de proteína recombinante de microglobulina β2 humana purificada de *E. coli*. Seguindo incubação em temperatura ambiente (23-25°C) por quatro horas, as células S2 são misturadas com células $CD8^+$ em

uma razão de 1:10 (Células de *Drosophila*:células T) em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Gibco) suplementado com soro autólogo a 5-10%. A mistura de célula é incubada a 37°C tempo durante o qual as células de *Drosophila* morrem (em 48 horas). No dia quatro, IL-2 (20 U/mL) e IL-7 (30 U/mL) são adicionadas para seletivamente expandir a população de CTL específica de melanoma.

Reestimulações. PBMCs depletadas de CD8, autólogas, obtidas no momento de linfaferese e congeladas para uso futuro, são descongeladas, lavadas e ressuspensas a 10^7 células/mL em meio RPMI contendo soro autólogo a 10%, 5 µg/mL de microglobulina β2 humana recombinante e 5 µg/mL de peptídeos $gp100_{154-162}$, $gp100_{209-217}$, $gp100_{280-288}$, $MART\text{-}1_{27-35}$, tirocinase-$N_{369-377}$ e tirocinase-$D_{369-377}$. Seguindo irradiação y 50 Gy (5.000 rads), as células são incubadas a 37°C por duas horas nos frascos usados para reestimulação. Células não-aderentes são removidas através de lavagem com PBS da Dulbecco. Monócitos aderentes são carregados com os epítopos de peptídeo e incubados por 90 minutos em meio Leibovitz contendo 5 µg/Mc de microglobulina β2 humana em HSA a 1% e 5 µg/mL de cada peptídeo. O sobrenadante é removido e a suspensão de célula $CD8^+$ ativada com *Drosophila* (2,5 x 10_6 células/mL em meio RPMI com soro autólogo a 10%) é adicionada em uma razão de cerca de 10 células $CD8^+$ a um monócito aderente. Após três a quatro dias de cultura a 37°C, IL-2 (20 U/mL) e IL-7((30 U/mL) são adicionadas com uma mudança no meio para seletivamente expandir a população de CTL específica de melanoma.

Expansão não-específica. Células efetoras $CD8^+$ que sofreram duas rodadas de reestimulação são expandidas em bolsas de cultura celular junto com células nutridoras (células selecionadas não-$CD8^+$ autólogas irradiadas) após serem estimuladas com anticorpo OKT3. Células selecionadas não-CD8+ congeladas são descongeladas, lavadas e então irradiadas com gama (3.500 rads). Uma razão de 4:1 (nutridora:efetora) é posta em frascos T-225 que foram revestidos com anticorpo OKT3. Estimulação de OKT3 é realizada em meio RPMI completo contendo soro autólogo a 10% suplementado com 20 U/mL de IL-2. Dois dias depois, as células T estimuladas são

diluídas com meio fresco (meio X-vivo 10) e transferidas para bolsas de cultura celular para expansão. Meio fresco e IL-2 são suplementados aproximadamente a cada dois a três dias para alimentar as células T se expandindo rapidamente.

Preparação e Liberação de CTLs

Coleta de Célula e Formulação de Produto Final. Coleta do produto de célula final é realizada através de centrifugação para remover meio de cultura e para concentrar as células. Após centrifugação, células são lavadas em solução salina contendo albumina de soro humano (HSA) a 1%, filtradas através de um filtro de 70 µm e então diluídas em meio de infusão. O produto de célula para infusão contém CTLs autólogos em 300 mL de Injeção de Ringer Lactada, USP (76% v/v), Dextrose a 5% em cloreto de sódio a 0,9% (4% v/v) e HSA a 25% (20% v/v). Células de produto final são embaladas em uma bolsa de transferência de 1000 mL em um recipiente de transporte isolado resfriado com um miniregistrador ("dote logger")de temperatura.

Teste do Produto. Testes realizados antes da liberação de produto de CTL são listados abaixo. Atividade específica direcionada contra peptídeos individuais é avaliada medindo a atividade citotóxica das células efetoras contra células T2 marcadas com cromo carregadas com cada peptídeo individual de uso para estimulação. Atividade citotóxica é também medida contra alvos de melanoma marcados com cromo (Malme 3M, M14), usando fibroblastos normais (Malme 3) ou linhagem de célula de melanoma (01-KN) negativa para tirocinase, gp100 e MART-1 como controles.

Fenótipo: Uma porção da coleta de célula é usada para testar o fenótipo do produto de CD8 antes do carregamento. A especificação do produto final é expressão de CD3, CD8 e TCR. Avaliação fenotípica adicional para marcadores de acordo com memória, ativação, etc, é medida e registrada.

Identidade: O estado de HLA-A2, HLA-C e HLA-DR da amostra é determinado através da análise de uma preparação de DNA isolada de uma amostra de PBMC preparada no momento do recebimento da leucafe-

rese inicial e de células T $CD8^+$ coletadas no final da cultura, tomadas do produto de célula coletado. Análise de PCR de amostras de DNA é realizada com *oligos iniciador* específicos de HLA providos pela Genovision. A especificação do produto final é identidade com amostra do dia 0.

Contagens de Célula: A dose de célula desejada para infusão é 10^{10} células T $CD8^+$. O limite de infusão de produto final é 10^{10} células. O número total de células geradas é dependente do paciente. Doses de célula foram em média 9 x 10^9 em um estudo anterior onde as células foram geradas sob o mesmo protocolo *ex vivo*. A contagem de célula final é feita através da determinação do número de células viáveis.

Viabilidade: A viabilidade de dose de célula final é >70%. O número de células viáveis é estabelecido através de contagem microscopicamente de células que excluem corante azul tripano.

Teste de Micoplasma: Teste das células quanto a micoplasma é realizado antes das células serem administradas ao paciente para confirmar detecção de micoplasma negativo. O Roche PCR kit é usado que também inclui um ensaio ELISA. Ainda, amostras das culturas de célula T são coletadas na primeira alimentação de citocina (dia 6) e enviadas para BioReliance para realizar o procedimento de cultura de 28 dias. Os resultados da cultura são recebidos pós-infusão de célula T.

Teste de Endotoxina: O teste de endotoxina no produto celular final é realizado usando um ensaio Limulus Amebocyte Lysate (Bio Whittaker, Walkersville, MD). O limite de nível de endotoxina é menos do que 5 EU/kg infundidos nos pacientes. A especificação de produto de célula final é <1EU/mL.

Testes de Esterilidade de Produto Em Processo: Teste em processo quanto à esterilidade é realizado usando o sistema BacT/Alert. Amostras são tomadas durante momentos de mudanças de meio. Uma amostra da dose final é também testada pelo sistema BacT/Alert, e a especificação do produto final está ausente de crescimento.

Detecção de DNA de Drosophila e RNA Viral de Inseto. DNA é isolado do produto de célula T $CD8^+$ final e usado como um molde para um

ensaio de PCR de DNA de *Drosophila,* que usa *iniciadores* específicos para o vetor de inseto usado para preparar as APCs de *Drosophila* recombinantes. Esta amostra é comparada com a amostra de $CD8^+$ pura que age como controle negativo e DNA de célula de *Drosophila* é usado como o controle positivo. RNA total é também isolado das mesmas amostras de célula T $CD8^+$ e uma RT-PCR de tempo real quantitativa, que pode detectar 20 cópias/µg de cDNA de três vírus de RNA viral de inseto conhecidos, diferentes, é realizada. A especificação de produto para ambos ensaios é detecção negativa de ácido nucléico de inseto genômico e viral.

Atividade Lítica: Atividade lítica é avaliada para o produto de célula T $CD8^+$ final através de um ensaio de liberação de cromo em ambos alvos de célula T2 carregada com peptídeo, para medir atividade antipeptídeo, e alvos HLA-A2 de célula de melanoma estabelecida ou autóloga e linhagens de tumor e não-tumor compatíveis com doador (Malme 3 e Malme 3M) para avaliar morte específica de melanoma. A especificação de produto é morte específica de células alvo.

Também, para facilitar monitoramento os testes que seguem podem ser realizados em adição a testes de liberação descritos acima:

Tingimento Tetramérico: Células T $CD8^+$ para a amostra derivada de leucaferese pura são avaliadas quanto à presença de células T específicas de antígeno com moléculas tetraméricas que foram feitas para enumerar células T com especificidade para os epítopos de peptídeo usados para gerar os CTLs *ex vivo.* Isto permite o monitoramento de células T específicas de antígeno após tratamento.

Células de Tumor Melanoma em Amostras de Sangue Periférico: Ensaios de PCR de tempo real quantitativa, sensível, permitem o monitoramento de células de melanoma em circulação em amostras de sangue de paciente, antes, durante e após tratamento com fármaco. Embora nem todos os pacientes com melanoma de estágio III/IV demonstrem células de tumor em circulação, a detecção dessas células pode ser usada como um marcador substituto para resposta à terapia.

Produtos de CTL preparados conforme descrito acima podem

ser usados nos regimes de tratamento de terapia de combinação da invenção conforme ilustrado pelas modalidades preferidas descritas nos exemplos que seguem.

Tratamento de Pacientes com Melanoma Metastático Usando Linfócitos $CD8^+$ Autólogos Estimulados Ex Vivo com Células de Drosophila Carregadas com Peptídeos Associados a Melanoma (MART-1, gp100 e Tirocinase) e Administração Subcutânea de IFNα-2b e IL-2, Com e Sem Administração de 2-CdA ou DAB IL-2

Esses exemplos ilustram tratamentos compreendendo a administração de linfócitos T citotóxicos autólogos (CTLs) que são específicos para epítopos de peptídeos derivados de antígenos associados a melanoma em combinação com um agente de linfodepleção selecionado de cladribina e DAB IL2 bem como citocinas IL-2 e IFN-α-2b, bem como um tratamento de controle. O agente de terapia celular, que compreende CTLs autólogos que foram ativados de modo que eles especificamente se direcionam a células de melanoma expressando MART-1, gp100 e tirocinase através de contato de xAPCs de *Drosophila* carregadas com peptídeos antigênicos derivados de MART-1, gp100 e tirocinase, é feito para aumentar e manter o direcionamento imune de um paciente de células de melanoma expressando MART-1, gp100 e tirocinase. A adição de imunomoduladores IFN-α-2b e IL-2 é incluída para aumentar a resposta dos CTLs. Um regime preparativo (cladribina), não-mieloablativo, mas de depleção de linfócito, ou uma denileucina diflitox de depleção de subconjunto de célula T específico (DAB IL-2) é administrado antes da infusão de CTL para aumentar o enxerto de CTLs. O tratamento é feito para causar regressão de tumor e benefício clínico através da persistência de CTLs específicos de melanoma.

Mais particularmente, pacientes clínicos com melanoma maligno, avançado, que são positivos para HLA-A2, são administrados com um regime preparativo não-mieloablativo, mas de depleção de linfócito, consistindo em ou cladribina (0,12 mg/kg/dia x 5 dias) ou DAB IL-2 (uma injeção única de 18 μg/kg). Ainda, um regime concomitante de interferon-α-2b (IFN-α-2b; 10MIU/m^2) é administrado diariamente, por 5 dias consecutivos, através de

injeção subcutânea antes da infusão de CTL. Subseqüentemente, os pacientes recebem uma dose única de células T $CD8^+$ autólogas, estimuladas com xAPC de *Drosophila*, geradas *ex vivo*, que mostram o fenótipo de CTL. A infusão celular é imediatamente seguida por administração diária subcutânea de IL-2 de dose baixa (por exemplo, 3MIU), por vinte e oito (28) dias, seguido por avaliação do tumor. Administração diária, subcutânea, de IL-2 de dose baixa (por exemplo, 3MIU) é continuada em pacientes sem evidência de progressão de doença.

Os CTLs são gerados através de um método onde células T $CD8^+$ puras purificadas são estimuladas com xAPCs de *Drosophila* apresentando seis epítopos de peptídeo de célula T associados a melanoma diferentes no contexto de restrição de classe I de MHC humano, resultando em CTLs que mostram especificidades múltiplas para MART-1, gp100 e tirocinase, após aproximadamente 34 dias em cultura.

Sangue é coletado na avaliação para qualificar pacientes para o estudo e o procedimento de leucaferese preparativo acontece no dia 0 ou dia 1. Pacientes sofrem uma leucaferese 2,0-3,0X o volume de sangue padrão para obter células de sangue brancas requeridas para preparar o agente de terapia de célula. Nos momentos indicados, procedimentos de leucaferese adicionais (≤ do terço da quantidade usada para se obter a amostra de CD8 inicial) devem ser realizados para se obter células de sangue periférico para análise. Essas amostras são usadas para monitorar a presença de células T específicas de antígeno e possivelmente células de tumor de melanoma em circulação. Células de plasma e sangue são também coletadas para satisfazer os requisitos de xenotransplante para arquivamento de amostras pré- e pós-tratamento. Produtos de leucaferese são transportados para uma instalação onde células T $CD8^+$ são isoladas, estimuladas e culturadas por aproximadamente 34 dias.

Uma avaliação de lesões que podem ser medidas é conduzida em ambas 4 e 8 semanas seguindo a infusão de CTL. Um objetivo do estudo é determinar se administração de uma depleção de linfócito, não-mieloablativa, total (cladribina) ou uma depleção de subconjunto de célula T

seletiva (DAB IL-2), antes da infusão de célula T e em conjunto com um regime de citocina de aumento imune estabelecido, vai resultar em persistência de célula T específica de antígeno com regressão de tumor objetiva acompanhante.

Preparação de Linfócitos Citotóxicos

Células $CD8^+$ isoladas de amostras de leucaferese através de seleção positiva com um anticorpo anti-CD8 são estimuladas com peptídeos antigênicos associados com melanoma humanos (tirocinase$_{369-377}$ (nativa), tirocinase$_{369-377}$ (D371 modificada), MART-$_{127-35}$, gp100$_{154-163}$, gp100$_{209-217}$ e gp100$_{280-288}$) apresentados por xAPCs de *Drosophila* expressando moléculas de classe I humanas e co-estimuladoras (HLA-A2.1, β2 microglobulina, B7.1, CD70, ICAM-1 e LFA-3). As mesmas células $CD8^+$ são reestimuladas por duas rodadas de células mononucleares pulsadas com peptídeo, autólogas, na presença de IL-2 e IL-7. Uma etapa de expansão não-específica com mAb anti-CD3 (OKT3) é também incluída para aumentar o número total de células: geralmente 25 vezes maior do que aquele obtido no final da segunda etapa de reestimulação. Atividade de célula T citolítica é medida contra células T2 carregadas com peptídeo e um painel de células de melanoma $A2^+$, enquanto a pureza das células T $CD8^+$ estimuladas *in vitro* é avaliada através de citometria de fluxo. Adicionalmente, produção de interferon-gama, em resposta à estimulação específica de antígeno e análise tetramérica específica de peptídeo, confirma a função efetora e especificidade dos CTLs gerados, respectivamente.

Potência de CTLs Gerados de Células T $CD8^+$ Puras Isoladas de Pacientes de Câncer Melanoma

Foi demonstrado em pacientes com melanoma que CTLs específicos de antígeno, isolados de amostras de sangue periférico, são parte de uma população heterogênea de células que varia de baixa a alta avidez para o complexo peptídeo específico/MHC ao qual o TCR é direcionado. No entanto, a maioria desses CTLs são de baixa avidez, e apenas os CTLs com alta avidez demonstram lise de célula de tumor significante.[21] Ainda, linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) foram isolados de massas de tumor em paci-

entes com melanoma. A expansão *in vivo* desses TILs na presença de IL-2 de alta dose resultou em respostas objetivas em pacientes com melanoma; no entanto, essas respostas foram de curta duração e as células T clonadas altamente reativas originando-se dos TILs falharam em gerar quaisquer respostas completas.[16]

Em contraste, CTLs gerados *ex vivo* com xAPCs de *Drosophila* são células T específicas de antígeno, de alta avidez, potentes, capazes de lise específica de peptídeo (vide, por exemplo, Figura 1) e morte de célula de tumor melanoma forte. A geração reproduzível dos CTLs, com atividade citolítica forte para células de tumor, é acreditada ser atribuível a vários fatores contribuintes. Primeiro, purificação de $CD8^+$ com um anticorpo monoclonal anti-CD8, específico de peptídeo, selecionado para células com alta densidade de CD8, enquanto a liberação de anticorpo na presença de peptídeo específico, evitou estimulação não-específica de células T. Segundo, as células T $CD8^+$ altamente purificadas (Tabela I) são estimuladas com xAPCs apresentando epítopos de célula T específicos no contexto de moléculas de MHC, onde uma alta densidade de apresentação de antígeno resulta em uma resposta imune de célula T primária potente. A inclusão de moléculas de co-estimulação múltiplas nas APCs otimiza a estimulação de célula T. Terceiro, as etapas de reestimulação incorporam células mononucleares, autólogas, que foram carregadas com os mesmos epítopos de célula T associados a melanoma usados na estimulação primária e provêem um reforço para as células T em proliferação. Finalmente, uma etapa de expansão não-específica única com OKT3, células nutridoras autólogas e IL-2 de baixa dose mantém a mesma porcentagem de células T específicas de antígeno registrada no final da segunda etapa de reestimulação, enquanto aumentando o número total de células T ~25 vezes.

Tabela I: Purificação de Células $CD8^+$ Através de Seleção Positiva e Analisada Através de Citometria de Fluxo (dados representam sumário de total de 28 pacientes)

	PBMC		Pós-seleção	
Tipo de Célula	(%)	(Faixa)	(%)	(Faixa)
Células T $CD3^+$	45	(26-64)	83	(59-98)
Células T $CD4^+$	27	(16-46)	2	(0,5-4)
Células T $CD8^+$	17	(8-31)	84	(60-96)
Monócitos $CD14^+$	27	(11-43)	5	(0,5-17)
neutrófilos $CD15^+/CD16^+$	2	(0,5-9)	0,5	(0,5-1)
Células NK $CD16^+/CD15^-$	15	(8-47)	8	(2-20)
células CD19 B	1	(0,5-2)	1	(0,5-3)

Este protocolo de estimulação de célula T $CD8^+$ de xAPC *ex vivo* resultou em CTLs com lise de célula de tumor potente, alta avidez para o complexo peptídeo/MHC e especificidade de antígeno conforme avaliado através da enumeração com moléculas tetraméricas específicas de peptídeo, liberação de interferon-gama em resposta a estímulos antigênicos específicos e lise de tumor específica.

Avaliação de Terapia de CTL em Melanoma Metastático Maligno de Estudos Anteriores

Dois testes de fase I e um teste de fase II foram conduzidos, os quais envolviam um total de 55 indivíduos com melanoma de Estágio III ou Estágio IV. O estudo 1, "Autologous Cytotoxic T Lymphocytes ($CD8^+$) Serially Cultured Ex Vivo with Drosophila Antigen Presenting Cells, Interleukin-2, Interleukin-7, then Adherent Monocytes, and Tyrosinase Peptide", era um estudo aberto em 10 pacientes com melanoma de Estágio IV. Os pontos finais clínicos foram: 1) segurança e tolerabilidade de CTLs autólogos reinfundidos após imunização *in vitro;* 2) determinação da cinética dos CTLs infundidos na circulação sistêmica através de análise de diluição limitante; 3) disposição de corpo integral de CTLs marcados com ^{111}índio através de radiocintigrafia; 4) composição celular de nódulos que sofreram biópsia através de análise imunoistoquímica (CTLs, TH, NK, células B) e 5) regressão de lesões que podem ser medidas e duração de resposta durante dois meses.[22]

No Estudo 2, "Pilot Study of Subcutaneous Interferon-Alpha with Infusion of Drosophila Cell Stimulated Autologous $CD8^+$ Lymphocytes for the Treatment of Advanced Melanoma", um total de 15 pacientes de melanoma de Estágio III/IV foi infundido com células T $CD8^+$ autólogas em terapia de manutenção antecedente com IFNα-2b. Terapia de CTL foi avaliada através de: 1) monitoramento da segurança e tolerância dos CTLs reinfundidos; 2) composição celular de nódulos que sofreram biópsia; 3) regressão de lesões que podem ser medidas e 4) duração de resposta durante três meses. Indivíduos que tinham doença estável ou demonstraram uma resposta clínica na avaliação de acompanhamento (quatro semanas após a primeira infusão) receberam um segundo ciclo de tratamento. Oito (8) dos quinze (15) indivíduos sofreram um segundo ciclo de terapia de CTL, quatro (4) indivíduos entraram em um terceiro ciclo e um (1) indivíduo foi tratado com quatro ciclos de terapia de célula T.[23]

No estudo 3, "Randomized Phase II Trial of Subcutaneous Interferon-α-2b (IFN) and Interleukin-2 (IL-2) with or without Infusion of Drosophila Cell-stimulated Autologous CD8 Lymphocytes for the Treatment of Advanced Melanoma", um total de 30 pacientes com melanoma de Estágio III/IV foi tratado com citocinas sozinhas (IFNα e IL-2) ou citocinas mais células T. Ele foi um estudo aleatorizado onde pacientes entraram no braço apenas de citocina (Braço A) ou braço de citocinas mais células T (Braço B). Os pacientes que entraram e continuaram no Braço A receberam uma oportunidade de passar para o braço de citocinas mais célula T (Braço C). O ponto final primário deste estudo foi comparar o tempo de progressão (TTP) de doença entre os dois grupos (Braço A versus Braço B). Significância estatística foi atingida em TTP em pacientes que entraram no Braço B versus aqueles que entraram no Braço A (Figura 11). Em pacientes que passaram do Braço A para o Braço C, significância estatística em TTP foi também detectada em pacientes recebendo células T. Segurança e tolerabilidade de IFNα e IL-2 nas doses e no programa prescritos foram também monitoradas.[24]

<u>Argumento para Usar Interferon-α-2b (IFN-α-2b)</u>

Interferon-alfa (IFN-α) tem um espectro amplo de efeitos imuno-

moduladores e antiproliferativos em uma variedade de males. Acredita-se que um mecanismo de ação de IFN-α seja a supra-regulação de expressão de antígeno de tumor em células de melanoma. Ele tem a habilidade em aumentar a expressão de moléculas imunologicamente importantes sobre a superfície do tumor. Essas incluem antígenos de MHC, moléculas acessório, bem como antígenos associados a tumor.[25-27] Esses efeitos imunomoduladores podem melhorar a atividade do sistema imune, incluindo ambos os anticorpos e linfócitos, para reconhecer e atacar células de tumor *in vivo*. Imunoterapia específica, ativa, demonstrou respostas clínicas significantes no tratamento de melanoma disseminado. Os resultados de estudos de função imune discutidos acima demonstraram que tratamento de vacina para melanoma aumenta a freqüência de CTLs antimelanoma. Acredita-se que essas duas modalidades de imunoterapia possam agir sinergisticamente. Um curso de cinco (5) dias de IFN-α (10MU/m^2; subcutaneamente) foi incluído no Estudo 2, e os resultados de tingimentos de IHC de tecido demonstraram que o momento e a dose eram suficientes para supra-regular expressão de antígeno associado com ambos classe I e melanoma em amostras de biópsia seriais obtidas de um único paciente nos tempos destinados especificados. O mesmo curso de 5 dias em estudo clínico foi incluído no Estudo 3.

Argumento para Uso de Interleucina-2

Interleucina-2 (IL-2) recombinante humana é uma linfocina produzida através de tecnologia de DNA recombinante que foi mostrada exibir uma variedade de atividades biológicas. IL-2 estimula o sistema imune e exerce seus efeitos biológicos seguindo ligação a receptores específicos sobre a superfície de células-alvo. *In vitro*, ela foi mostrada aumentar proliferação de célula T e citotoxidez de linfócito, induzir a atividade assassina de ambas as células assassinas ativadas por lifocina e naturais e induzir produção de interferon-gama. Administração de IL-2 de alta dose a 283 pacientes produziu uma taxa de remissão de 7% com 9 respostas completas e os pacientes permaneceram livres de doença de 9 a mais de 91 meses.[28] Embora IL-2 de alta dose parecesse ser mais eficaz do que infusões contínuas de baixa dose, altas doses de IL-2 são também mais tóxicas. Os efeitos colate-

rais mais comuns foram sintomas tipo gripe. Os efeitos colaterais mais severos foram hipotensão, síndrome de vazamento capilar e perfusão de órgão reduzida. Administração subcutânea de IL-2 de baixa dose (em 3MIU/dia x 28 dias) foi usada em parte do Estudo 3, para aumentar e manter o nível de células T autólogas adotivamente transferidas. Ela foi adicionada após um curso curto de IFN-α e imediatamente seguindo a infusão de CTL para aumentar a mitogênese de linfócito, citotoxidez de linfócito e produção de interferon-gama em um esforço em manter as células T específicas de antígeno *in vivo*.

Transferência Adotiva de Linfócitos Seguindo um Regime de Quimioterapia Imunossupressor Não-Mieloablativo

Estudos em camundongo demonstraram que indução de imunossupressão com quimioterapia antes da administração de células T foi essencial para permitir a transferência adotiva de linfócitos para mediar regressão de tumor máxima.[29,30] Com base nesses estudos, protocolos clínicos foram iniciados para tratar pacientes com a transferência adotiva de linfócitos seguindo a aplicação de um regime quimioterapêutico não-mieloablativo.[16,31] Regimes preparativos não-mieloablativos têm sido usados para tratar pacientes recebendo transplantes de medula óssea alogenéicos, e esses regimes parecem idealmente adequados para induzir a imunossupressão transiente que pode aumentar o efeito de linfócitos T adotivamente transferidos. Um regime de ciclofosfamida e fludarabina originalmente usado em pacientes com câncer de célula renal recebendo alotransplantes compatíveis com HLA[32] foi recentemente usado em pacientes com melanoma metastático[16,31]. O argumento para a incorporação de um regime de linfodepleção antes da transferência adotiva de células T foi possivelmente destruir células reguladoras, romper a regulagem homeostática de célula T ("criando espaço") e anular outros mecanismos tolerogênicos normais que potencialmente pudessem aumentar o enxerto das células T transferidas. Nenhuma mortalidade relacionada a tratamento foi observada, e então quimioterapia não-mieoablativa em combinação com linfócitos antitumor mais IL-2 de alta dose deve ser segura. A não-mieloablação foi induzida com fludarabina (25

mg/m^2) e ciclofosfamida (60 mg/kg) e foi seguida por uma infusão de linfócito e IL-2 de alta dose (720.000 IU/kg).

A combinação de agentes quimioterapêuticos ciclofosfamida e fludarabina, embora não completamente mieloablativa, foi demonstrada ser mielossupressora, afetando neutrófilos, linfócitos, plaquetas e células sanguíneas vermelhas. Níveis de neutrófilo, que caíram para um ponto mais baixo no dia 10 seguindo o início da quimioterapia, foram registrados em 6/mm^3 e recuperados para cerca de 500/mm^3 no dia 14 com apoio de filgrastim (G-CSF). Os níveis de linfócito tinham um ponto mais baixo de 6/mm^3 e recuperaram para cerca de 200/mm^3 durante o mesmo período de tempo. Pacientes geralmente mostraram contagens de neutrófilo acima de 500/mm^3 e contagens de plaqueta acima de 20.000/mm^3, 2-3 semanas após o início da quimioterapia. Quaisquer pacientes necessitaram de uma transfusão de célula tronco para recuperar função da medula, e então o tratamento no geral parece ser seguro. No entanto, contagens de CD4 permaneceram persistentemente baixas (a contagem de CD4 média em aproximadamente dia 200 foi 156/mm^3, com uma faixa entre 46/mm^3 e 320/mm^3, que é um efeito colateral conhecido de imunossupressão induzida com fludarabina. O desenvolvimento de infecções oportunísticas aconteceu (isto é, erupção de *herpes zoster*), que melhorou seguindo o término de tratamento.

Cladribina (2-CdA, Leustatin®), um análogo de purina similar à fludarabina, é aprovada para uso no tratamento de leucemia de célula pilosa e foi avaliada também em pacientes com esclerose múltipla (MS) em um esforço de reduzir linfócitos T auto-reativos. Em pacientes com MS uma diminuição específica em subconjuntos de célula T foi correlacionada com doses diferentes de cladribina.[33-35] Ela tem um perfil de toxidez muito favorável com relação a outros fármacos linfocitolíticos, enquanto induzindo uma linfopenia de longa duração. Níveis de linfócito caem imediatamente após a primeira infusão de cladribina, atingem um ponto mais baixo em 5 meses e começam a se recuperar em 6 meses quando administrada por 4 cursos mensais.[33,34] Linfopenia foi observada em todos os pacientes, e complicações de infecção não foram um problema sério. O fármaco pode ser dado

pela via subcutânea conveniente sem causar irritação local e com resultados farmacocinéticos e terapêuticos que parecem totalmente equivalentes à via IV.[36,37]

Um estudo recente em seres humanos identificando células T reguladoras (T_{reg}) como imunossupressores em um ambiente de vacina demonstrou uma resposta imune antitumor aumentada seguindo depleção do subconjunto T_{reg} que mostra um fenótipo CD4+/CD25+^{hi} junto com CD28, CTLA-4 e GITR.[38] Este subconjunto de célula T pode ser seletivamente depletado (aproximadamente 3 semanas) seguindo uma dose única de denileucina diftitix (DAB389IL-2, ONTAK®). Quatro dias seguindo a dose única, 37-77% de depleção de células T_{reg} foram notados em oito (8) pacientes com carcinoma de célula renal. Seguindo a depleção de célula T, uma vacina RNA-DC foi administrada e um aumento de 10 vezes na resposta imune para os antígenos de vacina foi notada nos pacientes recebendo ambos DAB IL-2 e vacina versus vacina sozinha. Então, a mesma dose (18 µg/kg) seis dias antes de uma transferência adotiva dos CTLs específicos de antígeno é uma dose preferida para uso em regimes de acordo com a invenção.

Seleção de Paciente

Indivíduos para o estudo são pacientes humanos diagnosticados com melanoma metastático que são positivos para HLA-A2. Um anticorpo monoclonal (BB7.2) é usado para analisar amostras de PBMC através de análise FACS e análise adicional é realizada usando o teste de PCR Olerup SSP® (GenoVision) para determinar o subtipo HLA-A*0201.

Esquema de Tratamento

A Figura 2 mostra os regimes de tratamento descritos em mais detalhes abaixo. Os pacientes são divididos em três grupos de indivíduos, com 10 em cada grupo. No regime do Grupo A, um controle para o regime de linfodepleção, CTLs mais citocinas são administrados. No regime do Grupo B, que é uma modalidade preferida da invenção, pacientes recebem cladribina (dias 0-4) mais CTLs (dia 36) mais citocinas. No regime do Grupo B, que é uma outra modalidade preferida da invenção, pacientes recebem DAB IL-2 (dia 30) mais CTLs (dia 36) mais citocinas. Os regimes experimentais

são descritos em mais detalhes abaixo.

CTLs Específicos para Antígenos Associados a Melanoma

Terapia de linfócito T citotóxico para melanoma maligno utiliza células T $CD8^+$ ativadas *in vitro* autólogas para destruir células de melanoma carregando epítopos antigênicos associados a melanoma. CTLs são preparados a partir de amostras de leucaferese geradas no sítio clínico e transferidos para uma instalação onde CTLs são gerados sob orientações de GMP e retornados para infusão.

No dia 0, pacientes com melanoma metastático sofrem leucaferese (administração de aproximadamente 10-15 litros, dependendo do peso e condição do paciente). As células obtidas são transportadas da noite para o dia em temperatura ambiente para processamento em uma instalação de fabricação GMP. Em momentos apropriados, leucaferese é realizada para se obter linfócitos de sangue periférico para análise. Essas amostras são usadas para monitorar a presença de células T específicas de antígeno e a presença de células de tumor de melanoma em circulação. O procedimento de leucaferese de monitoramento processa aproximadamente 5 litros de sangue periférico (ou um terço do volume coletado na leucaferese inicial para se obter células CD8 para infusão subseqüente) no sítio clínico e é transportado para a instalação de fabricação GMP. Um ensaio PCR é usado para determinar uma diminuição no nível de células de melanoma em circulação seguindo terapia. A detecção de células de melanoma em circulação pode ser medida através de um ensaio PCR de tempo real quantitativo, sensível.[39-41] A presença de células T específicas de antígeno é avaliada com tetrâmeros específicos de peptídeo/HLA-A2.

A preparação de CTL final para infusão contém 1×10^{10} CTLs autólogos em 300 mL, contidos em 76% (v/v) de Solução de Ringer Lactada, 4% (v/v) de D5NS e 20% (v/v) de albumina de soro humano (HSA) a 25%. O produto de CTL é preparado em uma bolsa estéril, adequada para infusão, mantido em gelo e infundido durante 30 minutos, dentro de quarenta e duas (42) horas de preparação.

Antes da infusão, os CTLs são monitorados quanto à atividade

lítica (lise de ambas as células direcionadas carregadas com peptídeo e célula de tumor melanoma), viabilidade e pureza através de análise FACS. A ausência de ambos os DNA de célula de *Drosophila* e RNA viral de inseto é checada com ensaios de PCR de tempo real, quantitativa sensível. Esterilidade é determinada através de análise BacT/Aler®, teste de micoplasma e análise de tingimento Gram.

Pacientes recebem uma infusão de CTL de aproximadamente 10^{10} células autólogas, que foram estimuladas e expandidas *ex vivo* para se tornarem linfócitos T citotóxicos capazes de direcionamento a células *in vivo* expressando os antígenos aos quais os CTLs são direcionados. As células são infundidas após o final do tratamento de IFN-alfa e imediatamente precedem o início do regime de IL-2.

Citocinas

Interleucina-2 (IL-2) é obtida da Chiron Corporation (Emeryville, CA). Ela é fornecida como frascos de uso único contendo 22 milhões UV (~1,3 mg) de IL-2 como uma torta liofilizada branca a esbranquiçada, estéril, mais 50 mg de manitol e 0,18 mg de dodecil sulfato de sódio, tamponada com aproximadamente 0,17 mg de fosfato de sódio monobásico e 0,89 mg de dibásico para um pH de 7,5 (faixa 7,2 a 7,8). O pó é reconstituído com 1,2 mL de Água Estéril para Injeção, USP, e a concentração resultante é 18 milhões IU/ml ou 1,1 mg/mL. Frascos intactos são armazenados no refrigerador (2º-8°C) e protegidos da luz. IL-2 reconstituída é diluída com 2,4 mL de água a 5%. A concentração final (6MU/mL), uma vez puxada para seringas plásticas, é boa por 14 dias após a reconstituição, se mantida refrigerada a 2-8°C. A diluição final de IL-2 é auto-administrada em uma base de paciente externo subcutaneamente em uma dose de 3 unidades de milhão (3MIU), iniciando imediatamente seguindo a infusão de CTL e diariamente até progressão da doença.

INTRON-A® é obtido da Schering-Plough Corporation (Kenilworth, NJ). Este produto de IFN-alfa-2b é fornecido ou como um pó liofilizado ou uma solução para injeção em frascos de 5 ml estéreis. Um frasco contém aproximadamente 3 x 10^6 U ou 18 x 10^6 U de IFN. O pó liofilizado é reconsti-

tuído de preferência um pouco antes do uso, como não há nenhum agente bacteriostático incluído; pó liofilizado, sem uso, é armazenado em um refrigerador ou freezer (-4°C a -20°C). Quando o agente é fornecido como uma solução injetável, ele é armazenado no refrigerador (2º-8°C ou 36º-46º F). A diluição final de IFN-_ é auto-administrada em uma base de paciente externo a 10 UM/m^2 nos dias 31-35 como uma injeção subcutânea.

$\underline{DAB_{389}IL\text{-}2}$

DAB_{389}L-2 (denileucina diftitox, ONTAK®) é uma proteína citotóxica derivada de DNA recombinante composta das seqüências de aminoácido para fragmentos da toxina da difteria A e B seguidas pelas seqüências para interleucina 2 que é expressa em *E. coli*. Ela é um fármaco direcionado, que se liga a células expressando CD25 (IL-2R) em sua superfície. Ela interage com o receptor de IL-2 de alta afinidade sobre a superfície de células T reguladoras malignas ou normais (T_{reg}) para inibir síntese de proteína intracelular, rapidamente levando à morte celular. DAB_{389}IL-2 é fornecida em frascos de uso único como uma solução congelada, estéril, pretendida para administração intravenosa (IV). Cada frasco de 2 mL de ONTAK contém 300 mcg de DAB-IL2 recombinante em uma solução estéril de ácido cítrico (20 nM), EDTA (0,05 mM) e polissorbato 20 (<1%) em água para injeção, USP. A solução tem um pH de 6,9-7,2. Frascos intactos são armazenados congelados ou -10°C, mas não congelados novamente. O material é trazido para a temperatura ambiente (25°C ou 77º F) antes da preparação da dose descongelando em um refrigerador por não mais do que 24 horas ou em temperatura ambiente por 1-2 horas, e diluído com NS para uma concentração de ≥ 15 mcg/mL. DAB_{389}IL-2 é administrada através de injeção intravenosa, de preferência através de infusão durante pelo menos 15 minutos. Pacientes designados para o Grupo C recebem uma injeção subcutânea única de DAB IL-2 no dia 30, que é um dia antes do início de IFN-α e seis dias antes da injeção dos CTLs. A dose é 10 μg/kg.

$\underline{Cladribina}$

Leustatina® (2-cloro-2'-desoxi-β-D-adenosina) é um agente antineoplástico sintético. Ela é um análogo de nucleosídeo de purina resistente

à ação de adenosina desaminase, que resulta em linfocitotoxidez preferencial. Em células com uma razão alta de desoxicitidina cinase para desoxinucleotidase (por exemplo, linfócitos e monócitos), cladribina é fosforilada no desoxinucleotídeo trifosfato, 2-CdATP, que acumula, causando um rompimento de metabolismo celular, dano de DNA e subseqüente morte celular. O fármaco é uma solução isotônica transparente, incolor, estéril, livre de conservante, fornecida em frascos de uso único contendo 10 mg (1 mg/mL) de cladribina. Cada mL de cladribina contém 1 mg do ingrediente ativo e 9 mg (0,15 mEq) de cloreto de sódio como um ingrediente da invenção. A solução tem uma faixa de pH de 5,5 a 8,0. Ácido fosfórico e/ou fosfato de sódio dibásico pode ser adicionado para ajustar o pH para 6,3 ± 0,3. Frascos intactos são armazenados refrigerados (2-8°C). A dose de cladribina para o Grupo B é 0,12 mg/kg/dia por um total de 5 dias, fracionada em 3-4 sítios onde um máximo de 3,0 cm^3 é administrado em um único sítio. A dose de cladribina total é 0,6 mg/kg. (Cladribina, administrada subcutaneamente neste mesmo programa (5 dias consecutivos) e em uma dose de 0,14 mg/kg/dia (dose total = 0,7 mg/kg) foi relatada ser segura em pacientes com leucemia de célula pilosa.[37] Adicionalmente, a cladribina administrada neste programa e nesta dose a sessenta pacientes produziu aproximadamente 70% de linfodepleção após um ciclo único com mielossupressão clinicamente segura. Como um resultado de uma mudança em padronização, Leustatina foi verificada ser 12% maior do que relatado em estudos clínicos anteriores comparado com um estoque de cladribina sintetizado em laboratório. A dose que foi relatada ser 0,1 mg/kg é agora estimada realmente ser apenas 0,087 mg/kg.[33] Com relação à segurança de administração subcutânea com a formulação Leustatina® fracionada em 2-3 sítios, um estudo em pacientes com esclerose múltipla recorrente-remitente usou 0,07 mg/kg/dia X 5 dias, mensalmente por 6 meses para uma dose cumulativa total de 2,1 mg/kg.[36] Um total de 27 pacientes aleatorizados para o braço de fármaco de tratamento. Infecções foram limitadas a um episódio de *herpes zoster* segmental leve que aconteceu em dois pacientes tratados com cladribina e em um paciente recebendo placebo. Não houve casos individuais de trombocitopenia significante, anemia

granulocitopenia ou supressão de medula óssea generalizada).

Cuidado de Apoio Opcional

Pacientes podem receber qualquer um dos que seguem para anular toxidez de IFN-alfa e IL-2 durante tratamento e em seguida: acetaminofeno (650 mg PO q4h prn), difenil hidramina (50 mg IM ou PO q4h prn), indometacina (25 mg PO TID ou 75 mg SR qd), proclorperazina (10 mg IV ou PO q4h prn náusea), Zantac® (150 mg BID gastrite). Outros agentes antiinflamatórios e antieméticos não especificamente prescritos podem substituir qualquer um dos fármacos de apoio acima.

Embora a invenção tenha sido descrita em detalhes acima com referência a exemplos ilustrativos e modalidades preferidas, o versado vai compreender que o escopo da invenção é definido na apenas pela descrição acima, mas pelas reivindicações apensas conforme apropriadamente construídas sob princípios de lei de patente.

Referências

1. Hryniuk W, Bush H. The importance of dose intensity in chemotherapy of metastatic breast cancer. J Clin Oncol 4:1162-1170, 1986.

2. Herzig, RH. Dose-intensive therapy for advanced melanoma. In: J.O. Armitage, K.H. Antman (eds.), High-Dose Cancer Therapy. Pharmacology, Hematopoietins, Stem Cells; Baltimore: Williams and Wilkins pp750-754, 1992.

3. Mitchell MS, Harel W, Kan-Mitchell J, et al. Active specific immunotherapy of melanoma with allogeneic cell lysates: rationale, results and possible mechanisms of action. In: J.-C. Bystryn, S. Ferrone and P. Livingston (eds.), Specific Immunotherapy of Cancer with Vaccines; Ann. N.Y. Acad. Sci. pp153-166, 1993.

4. Quan WDY Jr, Mitchell MS. Principles of biologic therapy. In: C.M. Haskell, ed. Cancer Treatment; Philadelphia: W.B. Saunders pp57-69, 1995.

5. Mitchell MS, Jakowatz J, Harel W, et al. Increased effectiveness of interferon-alfa 2b following active specific immunotherapy for melanoma. J Clin Oncol 12:402-411, 1994.

6. Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science 254:1643-1647, 1991.

7. Gaugler B, Van der Eynde B, Van der Bruggen P, et al. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. J Exp Med 179:921-930, 1994.

8. Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, et al. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. J Exp Med 180:347-352, 1994.

9. Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, et al. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. J Exp Med 178:489-495, 1993.

10. Robbins PF, el-Gamil M, Kawakami Y, Stevens E, Yannelli JR, Rosenberg SA. Recognition of tyrosinase by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient responding to immunotherapy. Cancer Res 54:3124-3126, 1994.

11. Bakker AB, Schreurs MW, de Boer AJ, et al. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. J Exp Med 179:1005-1009, 1994.

12. Wolfel T, Van Pel A, Brichard V, et al. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. Eur J Immnol 24:759-764, 1994.

13. Visseren MJW, Van Elsas A, Van der Voort EIH, et al. CTL specific for the tyrosinase autoantigen can be induced from healthy donor blood to lyse melanoma cells. J Immunol 154:3991-3998, 1995.

14. Rubin JT, Lotze MT. Adoptive cellular immunotherapy of cancer. In: M.S. Mitchell (ed.), Biological Approaches to Cancer Treatment. Biomodulation; New York: McGraw-Hill pp379-410, 1993.

15. Yee, C, Thompson, JA, Byrd, D, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones from the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration and antitumor effect of

transferred T cells. PNAS 99:16168-16173,2002.

16. Dudley ME, Wunderlich, JR, Robbins PF, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science 298:850-854, 2002.

17. Oelke M, Maus MV, Didiano, D et al. *Ex vivo* induction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Ig-coated artificial antigen-presenting cells. Nat Med 9:619-624, 2003.

18. Leturcq DL, Richards JM, Jackson MR, Peterson PA and Moriarty AM. *Ex Vivo* Generation of Potent Cytotoxic T Lymphocytes for the Treatment of Cancer: A Novel Antigen Presentation System. Society of Biological Therapy 17th Annual Meeting; Abstract #40,2002.

19. Jackson MR, Song ES, Yang Y, et al. Empty and peptide-containing conformers of class I major histocompatibility complex molecules expressed in *Drosophila melanogaster* cells. Proc Natl Acad Sci, USA 89:12117-12121, 1992.

20. Cai Z, Brunmark A, Luxembourg AT, et al. Probing the activation requirements for naïve CD8+ T cells with *Drosophila* cell transfectants as antigen presenting cells. Immunol Rev 165:249-265, 1998.

21. Yee, C., Savage, P.A., Lee, P.P et al. Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramer. J Immunol 162:227-2234, 1999.

22. Mitchell MS, Darrah D, Yeung D et al. Phase I trial of adoptive immunotherapy with cytolytic T lymphocytes immunized against a tyrosinase epitope. J Clin Oncol 20:1075-1086, 2002.

23. Richards JM, Moriarty AM, Leturcq DL, Jackson MR and Peterson PA. Treatment of advanced malignant melanoma with *ex vivo*-generated autologous T cells with specificity for melanoma-associated target antigens. ASCO Annual Meeting, San Francisco, CA, May 2001.

24. Richards JM, Moriarty AM, Leturcq DL et al. Treatment of advanced malignant melanoma with autolgous, *ex vivo*-generated T cells with specificity for melanoma-associated target antigens. ASCO Annual Meeting, Chicago, IL, June 2003.

25. Dorval, T, Palangies, T, Jouve M et al. Clinical phase II trial of recombinant DNA interferon (interferon alpha 2b) in patients with metastatic malignant melanoma. Cancer 58:215-218, 1986.

26. Sertoli MR, Bernengo MG, Ardizzoni A, et al. Phase II trial of recombinant alpha-2b interferon in the treatment of metastatic skin melanoma. Oncology 46:96-98, 1989.

27. Robincon WA, Mughal TI, Thormas MR, et al. Treatment of metastatic mealignant melanoma with recombinant interferon alpha 2. Immunobiology 172:275-282, 1986.

28. Rosenberg, SA, Yang JC, Topalian SL, et al. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin-2. JAMA 271:907-9113, 1994.

29. North, RJ. Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on the elimination of tumor induced suppressor cells. J Exp Med 155:1063-1074.

30. Mills, C.D., and North, R.J.: Expression of passively transferred immunity against an established tumor depends on generation of cytolytic T cells in recipient. J Exp Med 157:1448-1460, 1983.

31. Dudley, M., J. Wunderlich, J. C. Yang, et al. A Phase I study of non-myeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes inpatients with metastatic melanoma. J Immunother 25:243-251, 2002.

32. Childs, ., Chernoff, A., Contentin, N. et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. NEJM 343:750-758, 2000.

33. Beutler, E. et al. Marrow suppression produced by repeated doses of cladribine. Acta Haematol 91:10-15, 1994.

34. Beutler, E. et al. The treatment of chronic progressive multiple sclerosis with cladribine. Proc Natl Acad Sci, USA 93:1716-1720, 1996.

35. Rice, GPA et al. Cladribine and progressive MS: Clinical and MRI outcomes of a multicenter controlled trial. Neurology 54:1145-1155, 2000.

36. Romine, JS, Sipe, JC, Koziol, JA et al. A double-blind, placebo-controlled, reandomized trial of cladribine in relapsing-remitting multiple sclerosis. Proc Assoc Amer Physicians 111:35-44, 1999.

37. von Rohr, A, Schmitz, S-FH, Tichelli, A et al. Treatment of hairy cell leukemia with cladribine (2-chlorodeoxyadenosine) by subcutaneous bolus injection: a phase II study. Annals of Oncology 13:1641-1649, 2002.

38. View, J, Su, Z, and Dannull, J. Enhancement of antitumor immunity following depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells. Annual Meeting Proceedings ASCO Abst 2506, 2004.

39. Keilholz, U., Goldin-Lang, P, Bechrakis, NE et al. Quantitative detection of circulating tumor cells in cutaneous and ocular melanoma and quality assessment by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Clinical Cancer Research 10:1605-1612, 2004.

40. Hoon, DSB, Bostick, P, Kuo, C et al. Molecular markers in blood as surrogate prognostic indicators of melanoma recurrence. Cancer Research 60:2253-2257, 2000.

41. Goydos, JS and Reintgen, DS. A molecular technique useful in the detection of occult metastases in patients with melanoma. In: B.J. Nickoloff (ed.) Methods in Molecular Medicine, Vol 61: Melanoma: Methods and Protocols; Totowa, NJ:Humana Press pp.301-320.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratamento de um indivíduo com necessidade de tratamento para câncer compreendendo:

(a) obtenção de células T $CD8^+$ puras do indivíduo;

(b) contato das células T $CD8^+$ puras com células apresentando antígeno xenogênicas carregadas com um ou mais antígenos de peptídeo, deste modo gerando CTLs ativados que se direcionam a células expressando o dito um ou mais antígenos de peptídeo;

(c) administração ao indivíduo dos CTLs ativados;

(d) administração ao indivíduo de pelo menos duas citocinas que realizam persistência de CTL; e

(e) administração ao indivíduo de um agente de linfodepleção selecionado do grupo consistindo em cladribina e denileucina diftitox.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as ditas pelo menos duas citocinas compreendem interferon-α-2b e interleucina-2.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que o dito um ou mais antígenos de peptídeo compreende uma seqüência de aminoácido derivada de uma proteína selecionada de gp100, tirocinase e MART-1.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o dito um ou mais antígenos de peptídeo consiste em antígenos de peptídeo derivados de proteínas gp100, tirocinase e MART-1 humanas.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que cada um dos ditos um ou mais antígenos de peptídeo é selecionado do grupo consistindo em YMNGTMSQV (SEQ ID NO:1), YMDGTMSQV (SEQ ID NO:2), AAGIGILTV (SEQ ID NO:3), ITDQVPFSV (SEQ ID NO:4), YLEPGPVTA (SEQ ID NO:5) e KTWGQYWQV (SEQ ID NO:6).

6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que o dito câncer é um melanoma.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a administração do agente de linfodepleção começa antes da administração dos CTLs ativados.

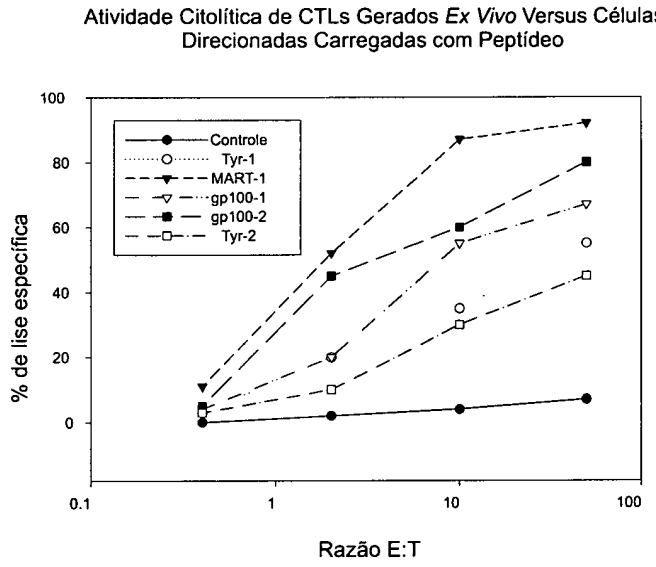

Atividade Citolítica de CTLs Gerados *Ex Vivo* Versus Células Direcionadas Carregadas com Peptídeo
% de lise específica
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
Razão E:T
Controle
Tyr-1
MART-1
gp100-1
gp100-2
Tyr-2

Fig. 1

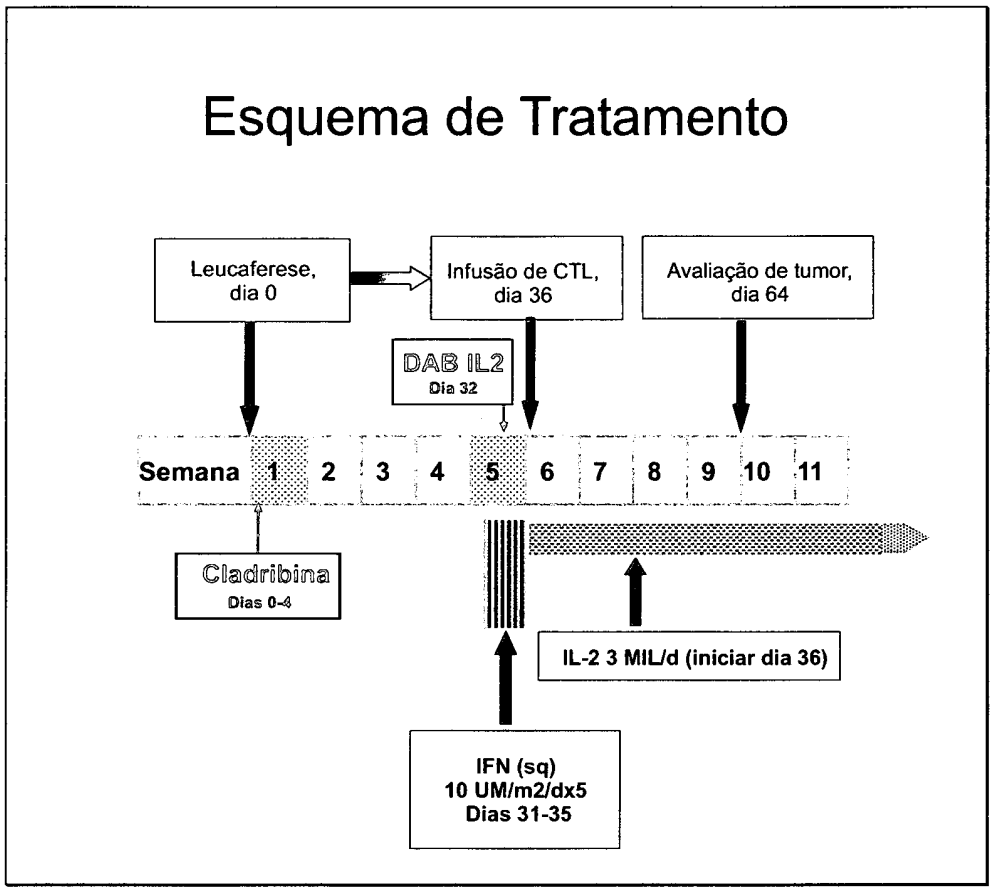

Esquema de Tratamento
Leucaferese, dia 0
Infusão de CTL, dia 36
Avaliação de tumor, dia 64
DAB IL2
Dia 32
Semana 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Cladribina
Dias 0-4
IL-2 3 MIL/d (iniciar dia 36)
IFN (sq)
10 UM/m2/dx5
Dias 31-35

Fig. 2

RESUMO

Patente de Invenção: **"TRATAMENTO DE CÂNCER COMBINANDO AGENTE DE LINFODEPLEÇÃO COM CTLs E CITOCINAS".**

A presente invenção refere-se a um tratamento de câncer combinando terapia celular com quimioterapia, células T $CD8^+$ autólogas que são obtidas de um paciente, ativadas *ex vivo* através de contato delas com células apresentando antígeno xenogênicas carregadas com antígeno de peptídeo selecionado, deste modo gerando linfócitos T citotóxicos ativados específicos de antígeno. Tais CTLs ativados são administrados ao paciente em conjunto com um regime de linfodepleção e manutenção de CTL compreendendo um agente não-mieoablativo, mas de linfodepleção, tal como cladribina ou denileucina diftitox, e citocinas estimuladoras interleucina-2 e interferon-α-2b.