

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2002.02.19	(73) Titular(es): ORTHO-MCNEIL-JANSSEN PHARMACEUTICALS, INC. 1125 TRENTON-HARBOURTON ROAD TITUSVILLE, NJ 08560	US
(30) Prioridade(s): 2001.02.20 US 270252 P		
(43) Data de publicação do pedido: 2004.01.07		
(45) Data e BPI da concessão: 2008.05.28 152/2008	(72) Inventor(es): MICHAEL R. JACKSON JULI DEGRAW ANN MORIARTY DIDIER J. LETURCQ PER A. PETERSON	US US US US US
	(74) Mandatário: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO DE TERAPIA CELULAR PARA O TRATAMENTO DE TUMORES**

(57) Resumo:

RESUMO

"MÉTODO DE TERAPIA CELULAR PARA O TRATAMENTO DE TUMORES"

As respostas de células T são frequentemente diminuídas em humanos com o sistema imunitário comprometido. Desenvolveu-se um método para isolar, estimular e expandir precursores de linfócitos T citotóxicos naíves (CTLp) para efectores específicos de antígenos, capazes de lisar células de tumor *in vivo*. Este protocolo *ex vivo* produz efectores totalmente funcionais. As células apresentadoras de antígenos artificiais (AAPC; *Drosophila melanogaster*) transfectadas com HLA de classe I humanas e moléculas acessórias definidas, são utilizadas para estimular células T CD8⁺ de dadores normais e de doentes com cancro. As moléculas de classe I expressas com uma densidade elevada à superfície das células de *Drosophila* estão vazias, permitindo o carregamento eficiente de péptidos múltiplos que resulta na produção de respostas policlonais que reconhecem as células tumorais que expressam de forma endógena os péptidos específicos. As respostas produzidas são robustas, específicas para o antígeno e reprodutíveis se o epitopo do péptido é um imunogénio definido. Este sistema de expressão artificial de antígenos pode ser adaptado para tratar a maior parte dos cancros numa maioria significativa da população.

DESCRIÇÃO

"MÉTODO DE TERAPIA CELULAR PARA O TRATAMENTO DE TUMORES"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O cancro continua a ser um dos maiores problemas de saúde, apesar do progresso significativo realizado no campo do tratamento. Os regimes convencionais de tratamento de quimioterapia, radioterapia, intervenção cirúrgica e combinações dos três, falham frequentemente na produção de uma cura de longa duração. Em muitos casos, o doente com cancro que se submeteu a tratamento, frequentemente recai no estado de doença após algum período de tempo, exacerbando ainda mais o problema e a gravidade destes regimes de tratamento para o doente.

Outro factor que complica o desenvolvimento de um tratamento de cancro é que se verificou que os cancros são provocados não por um simples agente ou factor biológico, mas por uma combinação de agentes e factores. Ao contrário de muitos tratamentos médicos em que um simples agente ou acontecimento causal é o foco do tratamento, a terapia do cancro requer o direccionamento para vários factores biológicos.

Nos últimos anos, a pesquisa foi direccionada para o desenvolvimento de terapias do cancro que utilizam o próprio sistema imunitário do doente. Uma destas abordagens é a imunoterapia adoptiva. A imunoterapia adoptiva exige a utilização das próprias células do doente para produzir linfócitos T citotóxicos (CrL) para tratar um tumor ou células

cancerosas. Contudo, esta técnica permanece largamente sem comprovação como um regime de tratamento clínico viável para doentes humanos. Para além do problema de identificação dos epitopos adequados com os quais imunizar os CrL, a tecnologia corrente não proporciona um método de apresentar um número suficiente de diferentes epitopos às APC de modo a atingir, de um modo adequado, múltiplos antigénios para tratar eficazmente o cancro. A presente invenção preenche necessidades não satisfeitas, proporcionando também outros benefícios.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona uma célula apresentadora de antigénio que não ocorre naturalmente (nnAPC), capazes de apresentar simultaneamente quatro a dez péptidos diferentes e métodos de preparação de nnACP.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1: Esta figura é uma representação gráfica da interacção entre células CD8⁺, também conhecidas como linfócitos T citotóxicos, com células apresentadoras de antigénio ou células alvo, neste caso células tumorais.

Figura 2, Painéis A e B: Esta figura é uma representação gráfica em dois

painéis de mecanismos de citose mediada por linfócitos.

Figura 3:

Esta figura apresenta o resultado de uma experiência em que vários péptidos diferentes foram testados num ensaio de competição para identificar ligantes de péptidos que podem ser utilizados para aplicar péptidos múltiplos em células de *Drosophila* que expressam moléculas de classe I humanas vazias.

Figura 4, Painéis A, B e C:

Esta figura apresenta o resultado de uma experiência em que três péptidos de melanoma foram testados quanto à capacidade de produzir CTL quando adicionados como epitopos únicos em células de *Drosophila*. Num único dador, a actividade de CTL foi estimulada para cada dos péptidos quando adicionados de forma isolada a três diferentes preparações de *Drosophila*. A especificidade

da resposta foi comparada com o péptido controlo HBc, um ligante com elevada afinidade.

Figura 5, Painéis A, B e C:

Esta figura mostra os resultados de uma série de experiências em que até quatro péptidos diferentes foram adicionados a células únicas de *Drosophila*. A actividade de CTL em cada dos péptidos representados foi observada após um protocolo de estimulação de três semanas e é graficamente apresentada nesta figura.

Figura 6, Painéis A, B e C:

Esta figura apresenta actividade de CTL após três diferentes protocolos de estimulação primária *in vitro*.

Figura 7, Painéis A e B:

Esta figura compara a capacidade das células de *Drosophila* versus células dendríticas para estimular as respostas de CTL a um único epitopo de péptido seguindo protocolos convencionais de estimulação.

Figura 8:

Esta figura mostra que as células dendríticas que apresentam o fenótipo maduro ou imaturo não foram tão eficientes como as células de *Drosophila* na estimulação específica das respostas de CTL quando foram utilizados péptidos definidos para pulsar as células.

Figura 9, Painéis A, B e C:

Esta figura apresenta a actividade de CTL produzida por um único dador em três diferentes protocolos de estimulação *in vitro* apresentando quatro péptidos.

Figura 10:

Esta figura apresenta a actividade de CTL produzida para dez (10) péptidos aplicados, em combinação, a células de *Drosophila*.

Figura 11:

Esta figura apresenta a capacidade de ligação do péptido dos péptidos HER-2 (826, 835, 861 e 863) nas células de *Drosophila* transfectadas com a molécula de classe I humana HLA-A2.1.

Figura 12:

Esta figura demonstra a resposta antipéptido e antitumor para as células efectoras específicas MART-1. As células T2 foram carregadas com péptido MART-1 ou com o controlo negativo (HBC). Malme3M é uma linha de melanoma, Malme3 é uma linha celular não tumoral.

Figura 13, Painéis A e B:

Esta figura apresenta a coloração tetramérica das células efectoras CD8 específicas HER-2 de dois diferentes dadores.

Figura 14:

Esta figura revela a resposta antipéptido para as células efectoras HER-2 avaliada em células T2 com péptido aplicado.

Figura 15, Painéis, A, B, C, D: Esta figura demonstra a morte facilitada de uma linha celular de tumor de ovário (HTB-77) quando transfectada com HLA-A2.1.

Figura 16:

Esta figura apresenta a morte facilitada de uma linha

celular de cancro da mama (HTB-133) quando transfectada com HLA-A2.1

Figura 17:

Esta figura mostra que o pré-tratamento com IFN γ é necessário para demonstrar a lise da linha celular de tumor HTB-77/A2.1.

Figura 18, Painéis A e B:

Este gráfico demonstra que a expressão á superfície de HLA-A2 e HER-2 não é afectada pela indução de IFN γ nas duas linhas de celulares (HTB-77 e HTB-77/A2.1).

Figura 19:

Este gráfico mostra que os níveis de ARNm de proteína são elevados nas células HTB-77/A21 após uma indução com IFN γ .

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um método para preparar uma suspensão de CD8⁺ para utilização no tratamento de um indivíduo com cancro. O método que é definido na reivindicação 1, compreende:

- a. preparação de uma linha de células apresentadoras de antigénio que não ocorrem naturalmente (nnAPC), em que a referida nnAPC apresenta simultaneamente de 4 a 10 diferentes moléculas de péptido associadas com cancro, em que cada péptido possui cerca de seis a doze aminoácidos de comprimento;
- b. estimulação de células $CD8^{+}$ recolhidas do referido indivíduo ou de um dador adequado com a referida linha celular nnAPC;
- c. adicionar as referidas células $CD8^{+}$ ao meio que contém uma citocina, seleccionada de IL-2, IL-7 e meio de crescimento condicionado (CGM), de um modo preferido, IL-2, ou IL-2 e IL-7 em combinação;
- d. misturar monócitos do sangue periférico não ressuspensos ou, alternativamente, monócitos do sangue periférico sem CD-8 colhidos do referido indivíduo ou um dador adequado com cerca de 10 a 50 ug/mL de um dos referidos péptidos;
- e. irradiar a referida suspensão de monócitos do sangue periférico com uma dose suficiente de radiação γ , necessária para evitar a proliferação destas células na suspensão, tal como uma dose no intervalo de cerca de 3000 a 7000 rads, de um modo preferido, cerca de 5000 rads,
- f. isolar monócitos do sangue periférico aderentes;

- g. aplicação dos referidos monócitos do sangue periférico aderentes com cerca de 1 mg/mL a 50 ug/mL de cada de cada péptido;
- h. combinar as referidas células $CD8^{+}$ com os referidos monócitos do sangue periférico aderentes a uma proporção de cerca de dez células $CD8^{+}$ para um monócito do sangue periférico;
- i. estimulação opcional da referida suspensão combinada de células $CD8^{+}$ e monócitos do sangue periférico durante cerca de seis a sete dias;
- j. estimulação opcional da referida suspensão de células $CD8^{+}$ e monócitos do sangue periférico com IL-2 e IL-7 no meio; e
- k. ensaio opcional da suspensão de $CD8^{+}$ para a actividade de CTL e ensaio opcional para CTL pureza, esterilidade e conteúdo em endotoxina adequados.

Outra forma de realização da presente invenção proporciona um método para preparar a suspensão de $CD8^{+}$ como definido na reivindicação 8, compreendendo:

- a. preparação de uma linha celular apresentadoras de antigénio que não ocorre naturalmente (nnAPC), em que a referida nnAPC apresenta, simultaneamente, de 4 a 10 diferentes moléculas de péptido associadas com cancro;

- b. estimulação das referidas células CD8⁺ recolhidas do referido indivíduo com a referida linha celular nnAPC durante cerca de seis a sete dias;
- c. estimulação das referidas células CD8⁺ com IL-2 e IL-7 no meio;
- d. misturar monócitos do sangue periférico não ressuspensos ou monócitos do sangue periférico sem CD8⁺ colhidos do referido indivíduo com cerca de 20 ug/mL de cada péptido;
- e. irradiar os referidos monócitos do sangue periférico com cerca de 5000 rads de radiação γ ;
- f. isolar monócitos do sangue periférico aderentes;
- g. aplicação dos referidos monócitos do sangue periférico aderentes com cerca de 1 a 50 ug/mL de cada um dos referidos péptidos;
- h. combinar as referidas células CD8⁺ com os referidos monócitos do sangue periférico aderentes a uma proporção de cerca de dez células CD8⁺ para um monócito do sangue periférico;
- i. estimulação da referida suspensão combinada de células CD8⁺ e monócitos do sangue periférico durante cerca de seis a sete dias;
- j. estimulação da referida suspensão de células CD8⁺ e monócitos do sangue periférico com IL-2 e IL-7 no meio; e

k. ensaiar a suspensão de CD8⁺ para a actividade de CTL, pureza, esterilidade e conteúdo de endotoxina;

Outra forma de realização da presente invenção proporciona um método para proporcionar uma suspensão de CD8⁺ como definido na reivindicação 10, compreendendo:

a. preparação de uma linha celular apresentadoras de antigénios que não ocorre naturalmente (nnAPC), em que a referida nnAPC apresenta, simultaneamente, de 4 a 10 diferentes moléculas de péptido associadas com melanoma em que cada péptido é oito a dez aminoácidos de comprimento;

b. estimulação de células CD8⁺ recolhidas do referido indivíduo com a referida linha celular nnAPC durante cerca de seis a sete dias;

c. estimulação das referidas células CD8⁺ com IL-2 e IL-7 no meio;

d. misturar monócitos do sangue periférico não ressuspensos ou monócitos do sangue periférico sem CD8⁺ colhidos do referido indivíduo com cerca de 20 ug/mL de cada péptido que a referida nnAPC apresenta;

e. irradiar a referida suspensão de monócitos do sangue periférico sem CD8 com cerca de 5000 rads de radiação γ ;

f. isolar monócitos do sangue periférico aderentes;

g. aplicação dos referidos monócitos do sangue periférico aderentes com cada dos referidos péptidos;

h. combinar as referidas células $CD8^+$ com os referidos monócitos do sangue periférico aderentes a uma proporção de cerca de dez células $CD8^+$ para um monócito do sangue periférico;

i. estimulação da referida suspensão combinada de células $CD8^+$ e monócitos do sangue periférico durante cerca de seis a sete dias;

j. estimulação da referida suspensão de células $CD8^+$ e monócitos do sangue periférico com IL-2 e IL-7 no meio; e

k. ensaiar a suspensão de $CD8^+$ para a actividade de CTL, pureza, esterilidade e conteúdo em endotoxina adequados;

Outra forma de realização da presente invenção é uma nnAPC como definido na reivindicação 12, que apresenta os seguintes péptidos, Tirosinase₃₆₉₋₃₇₇, Tirosinase₂₀₇₋₂₁₆, gp100₂₀₉₋₂₁₇, gp100₁₅₄₋₁₆₇, MART-1₁₂₇₋₃₅, HER-2/neu₇₆₉₋₇₉₇, HER-2/neu₃₆₉₋₃₇₇, C-lectina₈₋₁₆, Pec60₂₀₋₂₉, e Pec60₂₅₋₃₃.

Outra forma de realização da presente invenção proporciona um método para a preparação de células apresentadoras de antígenos que não ocorrem naturalmente (nnAPC) capazes de apresentar simultaneamente até dez diferentes moléculas de péptido, compreendendo o referido método do passo:

a. preparação de uma linha celular de insecto a partir de ovos de *Drosophila melanogaster*; alternativamente, preparação de uma linha celular de insecto que expressam moléculas MHC humanas de Classe I e moléculas de adesão co-estimuladoras;

b. cultura das referidas células de insecto num meio que é adequado para a cultura de células de insecto, de um modo preferido, Meio Schneider™ de *Drosophila*;

c. preparação de um plasmídeo pRmHa-3 a partir de um pRmHa-1 expressão vector, em que o referido plasmídeo pRmHa-3, inclui um promotor de metalotioneína, sequências consenso de resposta a metal e um gene de álcool desidrogenase portador de um sinal de poliadenilação isolado a partir de *Drosophila melanogaster*;

d. inserção no referido plasmídeo pRmHa-3 de ADN complementar para HLA de classe I A21, B7.1, B7.2, ICAM-1, microglobulina β -2 e LFA-3, em que A2.1 pode ser substituída por qualquer sequência de ADN humana de classe I;

e. transfectação das referidas células de insecto com um plasmídeo phshneo e o referido plasmídeo pRmHa-3 contendo ADN complementar; e,

f. produção de nnAPC pelo contacto das referidas células de insecto com CuSO_4 para induzir a expressão dos genes transfectados nas referidas células de insecto.

As células de insecto da presente invenção são cultivadas num meio adequado para cultivar células de insecto, daqui em diante referido como "meio de crescimento de insecto". Os meios de crescimento de insecto estão comercialmente disponíveis num grande número de vendedores, tais como Meio Schneider™ de *Drosophila*, Meio Grace de Insecto e Meio de Insecto TC-100.

Alternativamente, o meio de crescimento de insecto pode ser preparado por um especialista na técnica. Tipicamente, os meios incluirão componentes necessários para promover e sustentar o crescimento das células de insectos, tais como sais inorgânicos (por exemplo, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, cloreto de potássio, fosfato de potássio, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio e fosfato de sódio), vários aminoácidos carbo-hidratos e espécies químicas (Imogene Schneider, *Exp. Zool.* (1964) 156(1): pg. 91). Alternativamente, os meios podem também incluir vitaminas, minerais, e outros componentes que auxiliam no crescimento das células de insecto.

Segue-se uma lista de abreviaturas e definições utilizadas na presente descrição.

Abreviaturas

APC	Células apresentadoras de antígenos
CD8 ⁺	Células T CD8 ⁺
CTL	Linfócitos T Citotóxicos
E	Efeitor
Fas	Também conhecido como CD95, epitopo nas células T
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IL	Interleucina
LAK	Células assassinas activadas por linfocina
LFA	Antígenos com função de linfócitos
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
nnAPC	célula apresentadora de antígenos que não ocorrem naturalmente

NP	Proteína nuclear
PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico
PBS	Salino tamponado com fosfato
PCR	Reacção de polimerase em cadeia
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RWJPRI	The R.W. Johnson Pharmaceutical Research Institute
T	Alvo
TCR	Receptor de antigénio em células T
TIL	Linfócitos infiltrados em tumor

Segue-se uma lista de abreviaturas utilizadas na presente especificação para vários epitopos de péptido. Os resíduos de aminoácidos individuais são identificados de acordo com um código de letra única que é rapidamente conhecida e utilizada pelos especialistas na técnica.

Aminoácidos	Abreviaturas	
	<i>3 Letras</i>	<i>1 Letra</i>
alanina	ala	A
valina	val	V
leucina	leu	L
isoleucina	ile	I
prolina	pro	P
fenilalanina	phe	F
triptofano	tyr	W
metionina	met	M
glicina	gly	G
serina	ser	S
treonina	thr	T

Aminoácidos	Abreviaturas	
cisteína	cys	C
tirosina	tyr	Y
asparagina	asn	N
glutamina	gln	Q
ácido aspártico	asp	D
ácido glutâmico	glu	E
lisina	lys	K
arginina	arg	R
histidina	his	H

Abreviaturas de Epitopos de Péptidos

Como aqui utilizado o termo “*tirosinase 369-377*” ou “*tirosinase₃₆₉₋₃₇₇*” refere-se à sequência de aminoácidos YMNGTM5QV (SEQ ID N°: 1). Também está incluído nesta definição o péptido da sequência YMDGTMSQV (SEQ ID N°: 2) que resulta de um evento pós-tradução que modifica o resíduo de aminoácido “N” da sequência YMNGTMSQV (SEQ ID N°: 1) para “D” resultando na sequência de aminoácidos de YMDGTMSQV (SEQ ID N°: 2) (Skipper et al., *J. Exp. Med.* (1996) 183:527-534).

Como aqui utilizado o termo “*tirosinase 207-216*” ou “*tirosinase₂₀₇₋₂₁₆*” refere-se à sequência de aminoácidos FLPWHRLFLL (SEQ ID N°: 3).

Como aqui utilizado o termo “*gp100 209-217*” ou “*gp100₂₀₉₋₂₁₇*” refere-se à sequência de aminoácidos ITDQVPFSV (SEQ ID N°: 4).

Como aqui utilizado o termo “gp100 154-162” ou “gp100₁₅₄₋₁₆₂” refere-se à sequência de aminoácidos KTWGQYWQV (SEQ ID N°: 5).

Como aqui utilizado o termo “MART-1 27-35” ou “MART-1₂₇₋₃₅” refere-se à sequência de aminoácidos AAGIGILTV (SEQ ID N°: 6).

Como aqui utilizado o termo “HER-2/neu 789-797” ou “HER-2/neu₇₈₉₋₇₉₇” refere-se à sequência de aminoácidos CLTSTVQLV (SEQ ID N°: 7).

Como aqui utilizado o termo “HER-2/neu 369-377” ou “HER-2/neu₃₆₉₋₃₇₇” refere-se à sequência de aminoácidos KIFGSLAFL (SEQ ID N°: 8).

Como aqui utilizado o termo “C-lectina 8-16” ou “C-lectina₈₋₁₆” refere-se à sequência de aminoácidos KMASRSMRL (SEQ ID N°: 9).

Como aqui utilizado o termo “Pec60 20-29” ou “Pec60₂₀₋₂₉” refere-se à sequência de aminoácidos ALALAALLW (SEQ ID N°: 10).

Como aqui utilizado o termo “Pec60 25-33” ou “Pec60₂₅₋₃₃” refere-se à sequência de aminoácidos ALLVVDREV (SEQ ID N°: 11).

Como aqui utilizado, o termo “CD8 péptido 59-702 ou “CD8 péptido₅₉₋₇₀” refere-se à sequência de aminoácidos de AAEGLDTQRFSG (SEQ ID N°: 12).

Termos e Definições

Como aqui utilizado, o termo “imunoterapia adoptiva” refere-se à administração de linfócitos T dadores ou autólogos para o tratamento de uma doença ou estado de doença, em que a doença ou estado de doença resulta numa resposta imunitária insuficiente ou inadequada que é normalmente associada com moléculas HLA de Classe I. A imunoterapia adoptiva é um tratamento apropriado para qualquer doença ou estado de doença em que foi demonstrado a eliminação de células infectadas ou transformadas foi conseguida por CTL. Por exemplo, doença ou estado de doença inclui mas não está limitado a cancro e/ou tumores, tais como melanoma, próstata, mama, colorrectal, estômago, garganta e pescoço, pancreático, cervical, ovariano, osso, leucemia e cancro do pulmão; infecções virais, tais como hepatite B, hepatite C, vírus da imunodeficiência adquirida; infecções bacterianas, tais como tuberculose, lepra e listeriose, e infecções parasitárias, tal como malária. Como aqui utilizado, o termo “B7.1” refere-se a uma molécula co-estimuladora associada com células apresentadoras de antigénios.

Como aqui utilizado, o termo “BCNU” refere-se a carmustina, também conhecida como, 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea.

Como aqui utilizado, o termo “BSE” refere-se a encefalite espongiforme bovina.

Como aqui utilizado, o termo “CD” refere-se a grupos de diferenciação, Linfócitos T (originalmente), linfócitos B, monócitos, macrófagos, e granulócitos agrupados por epitopos e função do antigénio.

Como aqui utilizado, o termo "DTIC" refere-se a dacarbazina, 5-(3,3-dimetil-triazeno)-imidazole-4-carboxamida.

Como aqui utilizado, o termo "ex vivo" ou "terapia ex vivo" refere-se a uma terapia em que os materiais biológicos, tipicamente células, são obtidos a partir de um doente ou uma fonte alternativa adequada, tal como, um dador adequado, e são modificados de modo que as células modificadas podem ser utilizados para tratar um estado patológico que será melhorado pelo longo termo ou distribuição constante do benefício terapêutico produzido pelas células modificadas. O tratamento inclui a reintrodução dos materiais biológicos modificados, obtidos a partir do doente ou a partir da fonte alternativa, no doente. Um benefício da terapia ex vivo é a capacidade de proporcionar ao doente o benefício do tratamento, sem expor o doente a efeitos colaterais não desejados a partir do tratamento. Por exemplo, as citocinas são frequentemente administradas a doentes com cancro ou infecções virais para estimular a expansão dos CTL do doente. Contudo, as citocinas provocam frequentemente o início de sintomas do tipo gripe nos doentes. Num processo ex vivo, as citocinas são utilizadas para estimular a expansão dos CTL fora do corpo do doente, e o doente é poupado à exposição e dos consequentes efeitos colaterais das citocinas. Alternativamente, em condições adequadas ou estados, quando apropriado e em que o indivíduo pode obter benefícios, o indivíduo pode ser tratado, em simultâneo, com dosagens de níveis baixos de γ interferão, α interferão e/ou IL-2. O efeito esperado dos interferões é possivelmente sensibilizar as células tumorais para a lise por antigénios específicos para CTL e o efeito da IL-2 é, possivelmente, estimular a persistência de CTL específica de antigénio.

Como aqui utilizado, o termo "HEPES" refere-se a tampão de ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'2-etanossulfônico.

Como aqui utilizado, o termo "HLA-A2.1" refere-se a uma molécula HLA de Classe I encontrada em, aproximadamente, 45% de Caucasianos.

Como aqui utilizado, o termo "MART-1" ou "(antigénio de melanoma reconhecido por Células T-1" refere-se a um antigénio associado a melanomas. As sequências de aminoácidos e de ácido nucleico, assim como várias características deste antigénio são reveladas na Patente U. S. N° 5994523, concedida em 30 de Novembro de 1999 intitulada "*Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods*"; Patente U.S. N° 5874560, concedido em 23 de Fevereiro de 1999 intitulada "*Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods*"; e Patente U.S. N° 5844075, concedida em 1 de Dezembro de 1998 intitulada "*Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods.*" Em particular, a Patente U.S. N° 5994523 revela sequências completas de ácido nucleico e de aminoácidos de MART-1 na Figura 1 como SEQ ID N°: 1, e SEQ ID N°: 2, respectivamente.

Como aqui utilizado, o termo "MAGE" refere-se a um antigénio associado a melanoma. As sequências de aminoácidos e de ácido nucleico, assim como várias características deste antigénio são reveladas na Patente U.S. N° 6140050, concedida em 31 de Outubro de 2000, intitulada "*Methods for Determining Breast Cancer and Melanoma by Assaying for a Plurality of Antigens Associated Therewith*"; Patente U S. N° 5 759 783, de 2 de Junho de 1998 intitulada "*Method of Screening for Cancer by Detecting Messenger RNA for a MAGE-XP Gene*"; e Patente U.S.

Nº 5662907, concedida em 2 de Setembro de 1997 intitulada *"Induction of Anti-Tumor Lymphocytes T Cytotoxic in Humans Using Synthetic Peptide Epitopes"*.

Como aqui utilizado, o termo "MPC-10" refere-se a um concentrador de partículas magnéticas.

Como aqui utilizado, o termo "células NK" refere-se a células assassinas naturais.

Como aqui utilizado, o termo "OKT3" refere-se a ORTHOCLONE OKT3, muromonab-CD3, anticorpo monoclonal anti-CD3.

Como aqui utilizado, o termo "TAP-1,2" refere-se a Transportador Associado com o Processamento de Antígeno 1,2.

Como aqui utilizado, o termo "células Th" refere-se a células Auxiliares T, CD4+.

Como aqui utilizado, o termo, "tirosinase" refere-se a uma proteína associada com melanoma (Brichard et al., *J. Exp. Med.* (1993) 178:489-495; Robbins et al., *Cancer Res.* (1994) 54: 3124_3126). A Patente U.S. Nº 5843648, concedida em 1 de Dezembro de 1998 intitulada *"P15 and Tirosinase Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods"* revela péptidos antigénicos e ácidos polinucleicos associados relacionados com tirosinase na Figura 7, Painéis A a D. A Patente U.S. Nº 5487974 concedida em 30 de Janeiro de 1996, intitulada *"Method for Detecting Complexes Containing Human Leukocyte Antigen A2 (HLA-A2) Molecules and a Tirosinase Derived Peptide on Abnormal Cells"* revela um péptido adicional que é associado com tirosinase e melanoma no Exemplo 9, na Tabela 3.

Como aqui utilizado, o termo "gp100" refere-se a um antígeno de melanoma reconhecido por linfócitos infiltrantes no tumor (TIL). Os TIL que reconhecem gp100 estão associados com rejeição do tumor *in vivo* (Bakker et al., *J. Exp. Med.* (1994) 179: 1005-1009; Kawakami et al., *J. Immunol.* (1995) 154:3961-3968). Os péptidos antigénicos relacionados com gp100 são revelados na Patente U.S. Nº 5994523, concedida em 30 de Novembro de 1999, intitulada "*Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods*"; Patente U.S. Nº 5874560, concedida em 23 de Fevereiro de 1999 intitulada "*Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods*"; e Patente U.S. Nº 5 844 075, de 1 de Dezembro de 1998 intitulada "*Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods*." Em particular, a Patente U.S. Nº 5994523 revela sequências de ácido nucleico e de aminoácidos relacionadas com GP100 nas Figuras 4 e 5, respectivamente. São também revelados péptidos antigénicos derivados das sequências de aminoácidos, incluindo as identificadas como SEQ ID Nº: 27, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 e 41.

Como aqui utilizado, o termo "melanoma" refere-se, mas não se limita a melanomas, melanomas metastáticos, melanomas derivados de melanócitos ou células nevus relacionadas com melanócitos, melanossarcomas, melanocarcinomas, melanoepiteliomas, melanoma de disseminação de melanoma superficial *in situ*, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma acral lentiginoso, melanoma invasivo ou síndrome de sinal familiar atípico e melanoma (FAM-M). Estes melanomas em mamíferos podem ser provocados por anormalidades cromossómicas, crescimento degenerativo e distúrbios do desenvolvimento, agentes mitogénicos, radiação ultravioleta (UV), infecções

virais, expressão inapropriada de um gene num tecido, alterações na expressão de um gene, e apresentação numa célula, ou agentes carcinogénicos. Os melanomas acima mencionados podem ser diagnosticados, avaliados ou tratados por métodos descritos no presente pedido.

Como aqui utilizado, o termo "C-lectina" refere-se a um péptido da sequência que se verificou estar associada com cancro ovariano.

Como aqui utilizado, o termo "complexo principal de histocompatibilidade" ou "MHC" é uma designação genérica que pretende incluir os sistemas de antígeno de histocompatibilidade descritos em diferentes espécies incluindo os antígenos de leucócitos humanos (HLA).

Como aqui utilizados, os termos "epitopo," "péptido epitopo," "péptido antigénico" e "péptido imunogénico" refere-se a um péptido derivado a partir de um antígeno capaz de causar uma resposta imunitária celular num mamífero. Estes péptidos podem também ser reactivos com anticorpos de um animal imunizado com os péptidos. Estes péptidos podem ter cerca de cinco a vinte aminoácidos de comprimento, de um modo preferido, cerca de oito a quinze aminoácidos de comprimento e, de um modo muito preferido, cerca de nove a dez aminoácidos de comprimento.

Como aqui utilizado, o termo "Pec60" refere-se a um péptido da sequência que se verificou estar associada com cancro ovariano e da mama.

Como aqui utilizado, o termo "análogo" inclui qualquer polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos

substancialmente idêntica às sequências da presente invenção, especificamente aqui apresentadas, em que um ou mais resíduos foi conservadoramente substituído por um resíduo funcionalmente semelhante e que apresenta os aspectos funcionais da presente invenção como aqui descrito. Exemplos de substituições conservadoras incluem a substituição de um resíduo não polar (hidrofóbico), tais como isoleucina, valina, leucina ou metionina por outro, a substituição de um resíduo polar (hidrofílico) por outro, tais como entre arginina e lisina, entre glutamina e asparagina, entre glicina e serina, a substituição de um resíduo básico, tais como lisina, arginina ou histidina, por outro, ou a substituição de um resíduo ácido, tais como ácido aspártico ou ácido glutâmico ou outro.

Como aqui utilizado, o termo "substituição conservadora" também inclui a utilização de um resíduo quimicamente derivado em vez de um resíduo não derivado.

Como aqui utilizado, o termo "derivado químico" refere-se a um dado polipéptido possuindo um ou mais resíduos derivado quimicamente por reacção de um grupo lateral funcional. Exemplos de tais moléculas derivadas incluem, por exemplo, as moléculas em que os grupos amino livres foram derivados para formar cloridratos de amina, grupos p-toluenossulfonilo, grupos carbobenzoxilo, grupos t-butiloxycarbonilo, grupos cloroacetilo ou grupos formilo. Os grupos carboxilo livres podem ser derivados para formar sais, ésteres de metilo e etilo ou outros tipos de ésteres ou hidrazidas. Os grupos hidroxilo livres podem ser derivados para formar derivados O-acilo ou O-alquilo. O azoto da histidina do imidazole pode ser derivado para formar N-im-benzil-histidina. São também incluídos como derivados químicos as proteínas ou péptidos que contêm um ou mais

derivados de aminoácidos que ocorrem naturalmente dos vinte aminoácidos convencionais. Por exemplo: 4-hidroxiprolina pode ser substituída por prolina; 5-hidroxilisina pode ser substituída por lisina; 3-metil-histidina pode ser substituída por histidina; homoserina pode ser substituída por serina; e ornitina pode ser substituída por lisina. As proteínas ou polipéptidos da presente invenção também incluem qualquer polipéptido possuindo uma ou mais adições e/ou deleções ou resíduos relativos à sequência de um polipéptido cuja sequência é codificada é a correspondente sequência nucleica da presente invenção, desde que a actividade requerida seja mantida.

Como aqui utilizado, o termo "HER-2/neu" refere-se a um oncogene que expressa ou sobre-expressa, uma ou mais proteínas de oncogene associadas a membrana, do tipo receptor. Entre os cancros que se verificou estarem associados com expressão ou sobre-expressão de HER-2/neu são determinadas cancros da mama, estômago, ovariano, cólon e da glândula salivar. O oncogene HER-2/neu é um membro da família de oncogenes de cinases de tirosina de proteína e partilha um elevado grau de homologia com o receptor epidérmico do factor de crescimento (EGFR). Foi demonstrado que HER-2/neu desempenha um papel no crescimento e/ou diferenciação celular. HER 2/neu parece induzir malignidades através de mecanismos quantitativos que resultam da expressão aumentada ou desregulada de um produto de um gene essencialmente normal. A Patente U.S. N° 6075122, concedida em 13 de Junho de 2000, intitulada *"Immune Reactivity to HER-2/neu Protein for Diagnosis and Treatment of Malignancies in Which the HER-2/neu Oncogene is Associated"* revela péptidos que estimulam as respostas das células T CD8⁺ na coluna 12, linha 31 a coluna 13, linha 7.

HER-2/neu (p185) é a proteína produto do oncogene HER-2/neu. O gene HER-2/neu é amplificado e a proteína HER-2/neu é sobre-expressa numa variedade de cancros incluindo cancro da mama, ovariano, cólon, pulmão e próstata. O HER-2/neu está relacionado com transformação maligna. Encontra-se em 50-96 a 60% de carcinoma ductal *in situ* e 20% a 40% de todos os cancros da mama, assim como numa fracção substancial de adenocarcinomas com origem nos ovários, próstata, cólon e pulmão. O HER-2/neu está intimamente associado não apenas com o fenótipo maligno, mas também com a agressividade da malignidade, sendo encontrado em um quarto de todos os cancros da mama invasivos. A sobre-expressão de HER-2/neu está correlacionada com um prognóstico fraco no cancro da mama e ovariano. O HER-2/neu é uma proteína transmembranar com uma massa molecular relativa de 185 kd que tem aproximadamente 1255 aminoácidos (aa) de comprimento. Tem um domínio de ligação extracelular (ECD) de, aproximadamente, 645 aa, com 40% de homologia com o receptor do facto de crescimento epidérmico (EGFR), um domínio de âncora de transmembrana altamente hidrofóbico (TMD) e um domínio citoplásmico do terminal carboxilo (CD) de aproximadamente 580 aminoácidos com 80% de homologia com EGFR.

A investigação em curso envolvendo oncogenes identificou pelo menos quarenta oncogenes operativos em células malignas e responsáveis por, ou associadas com transformação. Os oncogenes foram classificados em diferentes grupos com base na função putativa ou localização dos seus produtos génicos (tal como a proteína expressa pelo oncogene). Crê-se que os oncogenes sejam essenciais para determinados aspectos da fisiologia celular normal.

O cancro continua a ser o principal problema de saúde, apesar do progresso significativo realizado na área do tratamento. Os regimes de tratamento convencionais de quimioterapia, radioterapia, intervenção cirúrgica e combinações dos três, falham frequentemente em produzir uma cura de longa duração. Em muitos casos, o doente de cancro submetido a tratamento tem frequentemente uma recaída para o estado de doença após um determinado período de tempo, exacerbando ainda o problema. No caso de melanoma, a cura para melanoma metastático não foi alcançada utilizando quimioterapia convencional. As taxas de resposta de 35% a 50% foram relatadas com o regime de Dartmouth de combinação de quimioterapia (DTIC, cis-platina, BCNU e tamoxifeno), mas a duração da sobrevivência permaneceu em seis a dez meses. Foram relatadas taxas de remissão elevadas para quimioterapia agressiva “de elevada intensidade de dose” e repleção de hematopoiese com transplantes autólogos de medula óssea. Todavia, a duração mediana de sobrevivência foi curto, aproximadamente, quatro meses.

Rosenberg e colaboradores tentaram a utilização de infusão de linfócitos activados como a tratamento para vários cancros. Inicialmente, as células assassinas activadas por linfocina (LAK) e mais tarde foram utilizados linfócitos de infiltração tumoral (TIL) activados *ex vivo* com IL-2, mas a evidência da eficácia é equívoca. De facto, ensaios clínicos controlados não conseguiram demonstrar uma vantagem para a utilização de células activadas *ex vivo* em relação à administração directa de IL-2 a doentes. Assim, os benefícios da terapia com LAK e TIL são marginais, e os efeitos colaterais são tipicamente tão severos que muitos ensaios foram descontinuados prematuramente.

Estudos em modelos tumorais em murganho demonstraram que a imunoterapia adoptiva, imunização *in vivo* de células T específica para um antígeno(s) tumoral, é muito eficiente com toxicidade mínima. Um obstáculo principal para aplicar esta estratégia ao tratamento de tumores humanos é a identificação de antígenos imunogénicos que tornam as células tumorais sensíveis à destruição mediada por linfócitos T citotóxicos (CTL). O isolamento de células T reactivas ao tumor de doentes de melanoma conduziu à identificação de alguns dos antígenos tumorais (epitopos) contra os quais os CTL são dirigidos. Estes incluem tirosinase (Brichard *et al.*, *J. Exp. Med.* (1993) 178:489-495; Robbins *et al.*, *Cancer Res.* (1994) 54:3124-3126), MART 1/Melan A (Kawakami *et al.*, *J. Exp. Med.* (1994) 180:347-352), gp 100 (Bakker *et al.*, *J. Exp. Med.* (1994) 179:1005-1009; e Kawakami *et al.*, *J. Immunol.* (1995) 154:3961-3968) e MAGE (Gaugler *et al.*, *J. Exp. Med.* (1994) 179:921-930). Destes, a tirosinase e MART-1 são quase universalmente expressos em melanomas e, por isso, são a escolha lógica para imunoterapia adoptiva.

Em anos recentes, melhoramentos significativos na sobrevivência na ordem de vários anos foram observados numa pequena percentagem de doentes de melanoma submetidos a terapia imunológica. Isto inclui imunoterapia específica activa com "vacinas de cancro", assim como a utilização de reforços não específicos do sistema imunitário, tais como citocinas, como IL-2, interferão α e interferão γ . Contudo, o benefício das citocinas é diminuído pelos efeitos colaterais que frequentemente acompanham a sua utilização, tais como náusea e febre.

As células T citolíticas ($CD8^+$) são a principal linha de defesa contra infecções virais. Os linfócitos $CD8^+$ reconhecem especificamente e matam células hospedeiras que são infectadas por um vírus. Teoricamente, deve ser possível preparar o sistema imunitário para combater outros tipos de doenças incluindo o cancro. Contudo, têm estado disponíveis poucos processos *in vitro/ex vivo* para activar especificamente CTL. A identificação de antígenos chave de melanoma referidos acima e um método para activação específica de CTL *in vitro* descritos abaixo permitem agora testar o conceito de imunoterapia adoptiva de melanoma metastático.

Todas as células T “naíves” requerem dois sinais para activação para originar uma resposta imunitária. Para linfócitos $CD8^+$ (CTL), o primeiro sinal que induz especificidade, consiste na apresentação de células $CD8^+$ de um fragmento imunogénico peptídico (epitopo) do antígeno ligado ao complexo de MHC de Classe I (HLA) presente na superfície das células que apresentam antígeno (APC). Este complexo é reconhecido especificamente por um receptor de antígeno de células T (TCR) que comunica o sinal intracelularmente.

A ligação ao receptor de células T é necessária, mas não suficiente para induzir a activação de células T e, normalmente, não conduzirá à proliferação celular ou secreção de citocina. A activação completa requer um segundo sinal(ais) co-estimulador(es), estes sinais servem para aumentar, ainda mais, a cascata de activação. Entre as moléculas co-estimuladoras nas células apresentadoras de antígenos, B7 e moléculas de adesão celular (integrinas) tais como ICAM-1, auxiliam neste processo através de ligação a CD28 e LFA-1, respectivamente, na célula T. Quando uma célula $CD8^+$ interage com

uma célula apresentadora de antígeno contendo um péptido imunogénico (epitopo) ligado por uma molécula de MHC de Classe I na presença de interações de molécula co-estimuladora apropriada, a célula $CD8^+$ torna-se uma célula T citolítica completamente activada.

A morte de células mediada por linfócitos envolve uma sequência de eventos biológicos começando com a ligação do CTL $CD8^+$ a uma célula alvo contendo antígeno (tumoral) por meio do processo de reconhecimento descrito acima para a activação de células T.

A interacção entre células $CD8^+$ e células apresentadoras de antígenos ou células alvo (tumerais), como descrito acima é apresentado na Figura 1. A interacção começa com a ligação do antígeno em associação com uma molécula de MHC Classe I na APC ou célula alvo com o receptor de antígeno de células T (TCR). Moléculas acessórias, tais como antígenos com função de linfócito (LFA-1, LFA-2 e LFA-3), molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1), factores co-estimuladores de células T (CD2, CD28, B7) aumentam a adesão célula-célula ou transduzem sinais de activação celular adicional.

Após a interacção célula-célula, CTL mata a célula alvo através da acção de mediadores citolíticos solúveis (perforina e granzimas armazenadas em grânulos citoplásmicos na célula T) e uma molécula de superfície de CTL (ligando Fas). Após o ataque citolítico, as células alvo morrem por necrose (perfuração de membrana e destruição de organelos) ou apoptose (condensação de cromatina, fragmentação de ADN e formação de protuberâncias na membrana).

Os mecanismos de citólise mediada por linfócitos são apresentados graficamente na Figura 2. No Painei A da Figura 2, após ligação à célula alvo, os grânulos citoplásmicos na CTL são rapidamente reorientados em direcção à célula alvo para a libertação de grânulos contendo perforina e granzimas no espaço intercelular. Estas enzimas proteolíticas formam poros na membrana plasmática da célula alvo conduzindo eventualmente à necrose celular. No Painei B, após ligação à célula alvo, o nível de expressão do ligando Fas nas CTL aumenta. A interacção do ligando Fas lig e do receptor Fas na célula alvo conduz a apoptose. Proteases, tais como CPP32 e outras relacionadas com enzima convertendo IL-1b (ICE) foram implicadas na indução de apoptose. É possível utilizar células apresentadoras de antígeno que ocorrem naturalmente, por exemplo, células dendríticas, macrófagos, células autólogas tumorais para activação de CD8⁺ *in vitro*. Contudo, a eficiência de activação seguindo esta abordagem é baixa. Isto é porque as moléculas de Classe I de APC nativas contêm muitos outros tipos de epitopos péptido, além de epitopos tumorais. A maioria dos péptidos são derivados a partir de proteínas celulares normais inócuas, resultando numa diluição do número de APC nativas activas que seriam na verdade eficazes contra um tumor (Allison et al., *Curr. Op. Immunol.* (1995) 7:682-686).

Uma abordagem mais directa e eficiente para este problema é activar especificamente células CD8⁺ apenas com os epitopos relevantes para combater uma doença específica, (tal como cancro) ou antígenos específicos para o tumor (tal como antígenos específicos do melanoma). Para este fim, é criada uma célula que apresenta antígeno artificial expressando moléculas de MHC Classe I em células de *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta). Uma vez que a *Drosophila* não possui um sistema

imunitário, os transportadores do péptido TAP-1,2 envolvidos na carga de epitopos de péptido em moléculas de classe I estão ausentes. Como resultado, as moléculas de classe I surgem na superfície das células de *Drosophila* como vasos vazios. Incubando estas células transfectadas de *Drosophila* com péptidos exógenos que se ligam a moléculas de classe I, tal como, epitopos específicos para o cancro ou tumor, incluindo mas limitado a epitopos específicos para o melanoma, é possível ocupar todas as moléculas de classe I com o mesmo péptido. A expressão de elevada densidade de moléculas de classe I contendo um único péptido nestas APC de *Drosophila* permitem a criação de células CD8⁺ T citotóxicas *in vitro* que são completamente específicas para o péptido antigénio. Métodos e processos para preparar células de *Drosophila* são ensinados na Patente U.S. N° 5529921, concedida em 25 de Junho de 1996 intitulada "*In Vitro Activation of Cytotoxic T-Cells Using Insect Cells Expressing Human Class I MHC and β_2 -Microglobulin*", e Patente U.S. N° 5314813, concedida em 24 de Maio de 1994 intitulada "*Drosophila Cell Lines Expressing Genes Encoding MHC Class I Antigens and β_2 -Microglobulin and Capable of Assembling Empty Complexes and Methods of Making Said Cell Lines*". Em particular, a Patente U. S. N° 5529921 revela na coluna 26, linha 56 até à coluna 28, linha 22 vários métodos de eliminar por separação e/ou enriquecer culturas de células precursoras.

Adicionalmente, esta característica elimina a necessidade para estimulação *in vivo* do sistema imunitário com doses elevadas de várias citocinas, resultando assim num tratamento que evita os efeitos colaterais provocados pelas citocinas. Alternativamente, em situações ou estados adequados, quando apropriado e em que o indivíduo pode tirar benefício, o

indivíduo pode ser tratado concorrentemente com níveis de dosagem baixos de um interferão, interferão γ e/ou IL-2.

Eliminar a necessidade para estimulação *in vivo* com citocinas proporciona um melhoramento da qualidade dos cuidados do doente. Os regimes de tratamento que incluem a administração de citocinas a doentes resultam frequentemente no doente que desenvolve os sintomas do tipo gripe, tais como náusea, vômito e febre. Estas reacções colaterais não colocam geralmente risco de vida, embora uma reacção particularmente severa ocorrendo num doente que já está num estado enfraquecido pode resultar numa situação que coloca a vida em perigo. Outra consideração é o impacto adverso que essas reacções colaterais têm na aceitação do e no cumprimento pelo doente de um regime de tratamento de outra forma benéfico. Remover a necessidade da estimulação *in vivo* com citocinas resulta num regime de tratamento que melhora o conforto do doente e proporciona ao médico um método de tratamento eficaz que o seu ou a sua doente tem maiores probabilidades de cumprir.

A utilidade deste método para imunoterapia adoptiva de tumores foi demonstrado em murganhos utilizando células de *Drosophila* transfectadas como APC e células CD8⁺ da linha 2C do receptor de células T (TCR) de murganhos transgénicos. Neste sistema, as células CD8⁺ 2C purificadas têm elevada capacidade de resposta a péptidos *in vitro* apresentados por células transfectadas de MHC Classe I (Ld) de *Drosophila*, também, contendo as moléculas co-estimuladoras B7-1 e ICAM-1. As células de *Drosophila* transfectadas como uma sonda para definir as necessidades mínimas para estimular células CD8⁺ T não iniciadas (Cai et al., P.N.A.S. USA (1996) 93:14736-14741).

Alternativamente, quando células do baço não separadas são utilizadas como agentes de resposta em vez de células 2C purificadas, a necessidade de moléculas co-estimuladoras não se aplicam. Neste caso, as células CD8⁺ na população do baço recebem co-estimulação “testemunha” a partir de células B activadas. A utilização desta descoberta, tornou possível demonstrar que células de *Drosophila* transfectadas com (L^d) de MHC Classe I são capazes de induzir células do baço de murganho DBA/2 normais para responder a péptidos específicos para o tumor mastocitoma singeneico P815 *in vitro* na ausência de linfocinas adicionadas. A injeção destas CTL em murganhos DBA/2 contendo mastocitoma P815 conduziu à progressão rápida do tumor (Sun et al., *Immunity* (1996) 4:555-564).

Em termos de processo, as células de baço de murganho DBA/2 normais foram cultivadas *in vitro* com células de *Drosophila* transfectada com (L^d) MHC Classe I carregadas com péptido P1A.35-43, um epitopo específico de tumor da linha celular de mastocitoma P815 derivado de DBA/2. Os linfócitos recolhidas das culturas após cinco dias apresentaram forte actividade de linfócito T citotóxico (CTL) para células tumorais P815 *in vitro*, mas não conseguiram lisar P1024, uma linha celular mutante de P815 que não expressa P1A.35-43, como apresentado na Figura 3, Painel A. Quando estas CTL foram injectadas em murganhos DBA/2 previamente inoculadas com células P815 três dias mais cedo, os tumores cresceram sem impedimento durante a primeira semana, mas foram subsequentemente eliminados na semana seguinte, como apresentado na Figura 3, Painel B. A especificidade foi demonstrada pela ausência de qualquer efeito no crescimento de P815 quando as CTL foram imunizadas *in vitro* contra um antígeno irrelevante, tal como, péptido nucleoproteína viral, como apresentado na Figura 3, Painel B. Em resumo, as células de

Drosophila transfectadas com L^d do complexo de histocompatibilidade principal de Classe I induziram as células do baço de murganho DBA/2 normais a responder a péptidos específicos de tumor de mastocitoma P815singeneico *in vitro* na ausência de linfocinas adicionadas. A injeção destas CTL em murganhos DBA/2 contendo mastocitoma P815 conduziu à regressão rápida do tumor (Wolfel et al., *J. Exp. Med.* (1993) 178:489-495).

Estudos em Humanos *In Vitro*

CTL humanas de indivíduos saudáveis foram imunizadas *in vitro* contra a tirosinase. Após a estimulação primária apenas com células de *Drosophila*, a lise específica de células JY contendo tirosinase foi evidente em todas as proporções de CTL efectoras para JY alvo testadas. As CTL específicas para tirosinase de indivíduos saudáveis foram induzidas utilizando o protocolo de estimulação total/re-estimulação e testadas quanto à sua capacidade para matar a linha celular de melanoma Malme 3M. Com uma ou duas possíveis exceções, a actividade específica de CTL contra Malme 3M foi induzida em todos os dadores até uma extensão variável. Para a maior parte, a reactividade para células tumorais de Malme 3 de controlo, foi mínima. As células de doentes com melanoma foram também imunizadas *in vitro* contra o epitopo da tirosinase para criar CTL de actividade e especificidade semelhantes às das derivadas de voluntários saudáveis.

A utilização de qualquer sistema de células de apresentação de antígeno natural, ou artificial, (APC) para criar linfócitos

T citotóxicos *in vitro* está limitada pelas especificidades do antígeno que estes sistemas são capazes de criar.

Os seguintes sistemas de APC têm sido utilizados para criar CTL específicas para o antígeno para epitopos únicos: 1) células dendríticas humanas (DC) pulsadas com péptidos definidos; 2) células mononucleares de sangue periférico (PBMC) que foram convertidas em linfoblastos e pulsadas com péptidos; 3) linhas de celulares linfoblastóides (LCL) em que os péptidos naturais são removidos do ácido e carregados com os péptidos de interesse; 4) células de *Drosophila* modificadas para expressar moléculas de classe I vazias; e células de murganho 3T3 transfectadas com moléculas de classe I humanas e co-estimuladoras (J. B. Latouche e M. Sadelain, *Nature Biotech* (2000) 18:405-409).

As células dendríticas (DC) são consideradas o sistema de células de apresentação de antígeno primário em humanos devido à sua vasta aplicação na apresentação de células de antígeno primárias. As proteínas próprias ou estranhas são processadas num DC. Os epitopos de péptido resultantes são apresentados por moléculas HLA, e são transportados para a superfície de DC. Contudo, foi observado que DC não criam consistentemente *in vitro*, CTL dirigidas contra quatro péptidos diferentes. Isto teria proporcionado CTL possuindo actividade correspondente a cada um dos quatro péptidos. Adicionalmente, também se observou que o fenótipo de DC no momento do pulsar do péptido, maduro ou imaturo, não afectou o resultado.

Alternativamente, a estimulação de células de *Drosophila* resultou normalmente em CTL dirigidos contra até dez tipos

diferentes de péptidos. Isto proporciona CTL que são activos para cada um dos dez péptidos.

A capacidade de células de *Drosophila* e DC para originar repostas de CTL foi avaliada, inicialmente para um único epitopo de péptido, seguindo os protocolos de estimulação convencionais para cada, de modo a comparar DC e células transfectadas de *Drosophila*. Foram produzidas DC imaturas cultivando durante uma semana monócitos autólogos na presença de IL-4 e GM-CSF. As DC maduras foram obtidas a partir de DC imaturas através da adição de TNF α ao meio de cultura vinte e quatro horas antes da recolha. As DC (imatura e madura) foram recolhidas, pulsadas com péptidos e misturadas com células CD8 purificadas seguindo o processo utilizado para a estimulação de células CD8 e células pulsadas com péptido de *Drosophila* - verificou-se que as células de *Drosophila* eram geralmente melhores estimuladores do que DC quando avaliadas para o epitopo 689 do péptido tirosinase, como apresentado na Figura 7. Além disso, as DC apresentando ou o fenótipo imaturo ou maduro (Figura 8) não foram tão eficientes como as células de *Drosophila* na indução de respostas específicas de CTL quando os péptidos definidos foram utilizados para pulsar as APC. Isto é particularmente surpreendente, devido ao papel dominante desempenhado pelas DC no sistema imunitário. Um estudo de comparação com um dador foi realizado, como apresentado na Figura 9. A morte específica foi produzida contra quatro péptidos diferentes quando se utilizam células de mosca como estimuladores, enquanto que as DC imaturas resultaram na morte específica marginal e as DC maduras resultaram na morte específica contra apenas um dos quatro péptidos utilizados para a estimulação.

Preparação de Linfócitos Citotóxicos

Células CD8⁺ isoladas a partir de amostras de leucaferese por selecção positiva com anticorpo anti-CD8 são estimuladas contra quatro péptidos diferentes associadas a melanoma apresentados por células de *Drosophila* que expressam moléculas de Classe I humanas (HLA-A2.1), B7.1, ICAM-1, LFA-3 e B7.2. As células CD8⁺ são re-estimuladas durante duas rondas com monócitos autólogos carregados com o péptido epitopo na presença de IL-2 e IL-7. As CTL não são especificamente expandidas com OKT3 e IL-2. A actividade de CTL é medida contra células Malme 3M e a pureza de células CD8⁺ T é avaliada por citometria de fluxo.

Os processos e protocolos de fabrico são realizados de acordo com as Boas Práticas de Laboratório e as Boas Práticas de Fabrico. As “Boas Práticas de Laboratório” e as “Boas Práticas de Fabrico” são normas de práticas de laboratório e de fabrico que são estabelecidas pela “Food and Drug Administration” dos Estados Unidos da América, e são facilmente conhecidas do especialista na técnica. As CTL são monitorizadas para identidade, viabilidade, actividade de CTL, esterilidade e conteúdo em endotoxina.

Uma listagem de epitopos de péptido adequados para utilização nos métodos da presente invenção para tratar cancros da mama e ovariano são apresentados na seguinte Tabela 1. É rapidamente aparente para o especialista na técnica que uma vasta variedade de epitopos de péptido adicionalmente aqueles listados na seguinte Tabela 1 também serão adequados para utilização nos métodos da presente invenção para tratar cancros da mama e ovariano, desde que tais péptidos sejam epitopos de células T.

TABELA 1

Epitopos Restritos a HLA-A2.1 Identificados para Antígenos Associados a Tumor como Alvos para cancros da Mama e do Ovário					
<u>Alvo</u> (resíduos)	<u>Nome</u>	<u>PRI N°</u>	<u>AKA</u>	<u>Sequência</u> (SEQ ID N°:)	<u>Previsão</u> da <u>Ligação</u> <u>HLA</u> <u>Péptido</u>
Her-2/neu					
789-797		826	E90	CLTSTVQLV (SEQ ID N°: 7)	160
48-56		827	D11 3	HLYQGCQW (SEQ ID N°: 13)	
369-377		835	E75	KIFGSLAFL (SEQ ID N°: 8)	481
654-662		837	GP2	IISAVVGIL (SEQ ID N°: 14)	
650-658		838	GP1	LTSILSAV (SEQ ID N°: 15)	
773-782		861		VMAGVGSPYV (SEQ ID N°: 16)	
851-859		862	E89	VLVKSPNHV (SEQ ID N°: 17)	118
971-979		863	C85	ELVSEFSRM (SEQ ID N°: 18)	
AES					
	intensificador amino de Chanfra separado				
G128-135		893	G76	GPLTPLPV (SEQ ID N°: 19)	
MUC-1					
	Mucina				
950-958		908	1.1	STAPVHNV	

(continuação)

Epitopos Restritos a HLA-A2.1 Identificados para Antígenos Associados a Tumor como Alvos para cancros da Mama e do Ovário					
<u>Alvo</u> (resíduos)	<u>Nome</u>	<u>PRI N°</u>	<u>AKA</u>	<u>Sequência</u> (SEQ ID N°:)	<u>Previsão</u> <u>da</u> <u>Ligação</u> <u>HLA</u> <u>Péptido</u>
				(SEQ ID N°: 20)	
Her-2/neu					
CEA	Ag Carcinoembrionico				
571-579		879	CAP -1	YLSGANLNL (SEQ ID N°: 21)	
FBP					
	proteína de ligação ao folato				
191-199		914	E39	EIWTHSYKV (SEQ ID N°: 22)	
C-Lectina					
	MESM, RLP		C8	.KMASRSMRL (SEQ ID N°: 9)	Actividade CTL
8-16			C77	SILSLKEAST (SEQ ID N°: 23)	Actividade CTL
77-86					
NY-ESO-1					
157165C		894		SLLMWLTQC (SEQ ID N°: 24)	nativa
157-165V		906		SLLMWITQV (SEQ ID N°: 25)	modificada
155-163		913		QLSLLMWIT (SEQ ID N°: 26)	

(continuação)

Epitopos Restritos a HLA-A2.1 Identificados para Antígenos Associados a Tumor como Alvos para cancros da Mama e do Ovário					
<u>Alvo</u> (resíduos)	<u>Nome</u>	<u>PRI N°</u>	<u>AKA</u>	<u>Sequência</u> (SEQ ID N°:)	<u>Previsão</u> <u>da</u> <u>Ligação</u> <u>HLA</u> <u>Péptido</u>
Pec60					
20			P20	ALALAALLVV (SEQ ID N°:10)	Actividade CTL
25			P25	ALLVVDREV (SEQ ID N°:11)	Actividade CTL
CA-125					
157165		900		YLETFSIZEQV (SEQ ID N°: 27)	38
255-263		902		VLLKLRRPV (SEQ ID N°: 28)	88
337-345		901		GLQSPKSPL (SEQ ID N°: 29)	21
546-554		903		ELYIPSVDL (SEQ ID N°: 30)	5
898-906		899		KALFAGPPV (SEQ ID N°: 31)	13
414-422		910		FMWGNLTLA (SEQ ID N°: 32)	315
CA-125					
MAGE-3					
271-279		909		FLWGPRALV (SEQ ID N°:33)	
Telomerase hTERT					
540-548		907		ILAKFLHWL (SEQ	

(continuação)

Epitopos Restritos a HLA-A2.1 Identificados para Antígenos Associados a Tumor como Alvos para cancros da Mama e do Ovário					
<u>Alvo</u> (resíduos)	<u>Nome</u>	<u>PRI Nº</u>	<u>AKA</u>	<u>Sequência</u> (SEQ ID Nº:)	<u>Previsão</u> <u>da</u> <u>Ligação</u> <u>HLA</u> <u>Péptido</u>
				ID Nº: 34)	
865-873		911		RLVDDFLLV (SEQ ID Nº: 35)	
<u>G250</u>					
245-262		912		HLSTAFARV (SEQ ID Nº: 36)	

Os exemplos seguintes são fornecidos com a finalidade de ilustrar a presente invenção, mas não limitam a presente invenção ao conteúdo dos exemplos.

EXEMPLO 1

Preparação de Células de *Drosophila* apresentadoras de antígenos

A linha celular Schneider S2 foi preparada de ovos de *Drosophila melanogaster* (Oregon-R) de acordo com processos publicados e foi depositada na American Type Culture Collection (CRL 10974). As células S2 são cultivadas em meio de *Drosophila* de Schneider comercial, suplementado com 10% de soro de bovino fetal.

O vector plasmídico pRmHa-3 para expressar proteínas de MHC Classe I e co-estimuladoras em células S2 foi derivado do vector

de expressão pRmHa-1 construído como descrito na literatura. Contém um promotor de metalotioneína, sequências de consenso de resposta a metal e um gene de álcool desidrogenase portador de um sinal de poliadenilação isolado a partir de *Drosophila melanogaster*.

Os ADN Complementares para transfecção foram preparados como se segue:

HLA-A2.1 e

β-2 microglobulina: Transcrição Reversa-PCR de células K562 utilizando iniciadores derivados a partir da sequência publicada

B7.1: Transcrição Reversa-PCR de células K562 utilizando iniciadores derivados a partir da sequência publicada

ICAM-1: Transcrição Reversa-PCR de células K562 utilizando iniciadores derivados a partir da sequência publicada

B7.2: Transcrição Reversa-PCR de células HL-60 (ATCC CCL-240) utilizando iniciadores derivados a partir da sequência publicada

LFA-3: Transcrição Reversa-PCR de células HL-60 (ATCC CCL-240) utilizando iniciadores derivados a partir da sequência publicada

Os ADN complementares foram individualmente inseridos no vector pRmHa-3. As células S2 foram transfectadas com uma mistura de ADN dos plasmídeos HLA-A2.1, B7.1 e ICAM-1 e do plasmídeo phshneo utilizando o método de precipitação com fosfato de cálcio. Células transfectadas de forma estável foram seleccionadas cultivando meio de Schneider contendo geneticina. Vinte e quatro horas antes da utilização, a expressão dos genes transfectados foi induzida pela adição de CuSO_4 . O nível de expressão foi avaliado por citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti-HLA-A2.1, anti-B7.1 e anti-ICAM-1. A expressão de HLA em mais de 30% das células é necessária para eficiência na activação *in vitro* de linfócitos CD8^+ .

Isolamento de Células CD8^+ Humanas

As células CD8^+ são isoladas a partir de amostras de leucaferese por selecção positiva utilizando o processo de isolamento de Dynabeads™ (Dyna). Um anticorpo monoclonal de murganho anti- CD8 humano (50 $\mu\text{g/mL}$ em globulina gama humana [Gammagard®]) é adicionado a células lavadas em PBS de Dulbecco suplementado com albumina de soro humano a 1% (Baxter-Hyland) e 0,2% de citrato de Na. Após incubação a 4 °C durante quarenta e cinco minutos com mistura cuidadosa, as células são lavadas e ressuspensas no mesmo tampão contendo esferas magnéticas Dynal (Dynabeads™) revestidas com IgG anti-murganho de ovelha numa proporção de esfera para célula de 1:1. As células e esferas são colocadas num tubo estéril e misturadas suavemente a 4 °C durante quarenta e cinco minutos. Ao fim deste tempo, as células ligadas ao anticorpo são removidas magneticamente utilizando o separador MPC-1®, de acordo com as instruções do fabricante

(Dynal). A dissociação do complexo célula CD8-esfera é alcançada por incubação a 37 °C durante quarenta e cinco minutos na presença dos péptidos de CD8 59-70(AAEGLDITQRFSG; SEQ ID N°: 12). As esferas são removidas magneticamente e as células CD8 são contadas e analisadas por citometria de fluxo para avaliar a pureza. A recuperação das células CD8⁺ é tipicamente superior a 80%. A Tabela 1 resume a composição da célula de catorze preparações separadas de CD8⁺ de preparações de PBMC humano normal por selecção positiva com anticorpo anti-CD8.

TABELA 2

Purificação de células CD8⁺ por Selecção Positiva Analisada por Citometria de Fluxo				
<u>TIPO DE CÉLULA</u>	<u>PBMC</u>		<u>PÓS-SELECÇÃO</u>	
	% Média	(gama)	% Média	(gama)
Células T CD8	15%	(7-24)	82%	(56-95)
Células T CD4	36%	(14-52)	2%	(0,1-10)
Monócitos CD 14	15%	(7-26)	0,8%	(0,2-2)
Neutrófilos CD15	12%	(8-21)	0,6%	(0,1-3)
Células B CD19	2%	(0,4-7)	3%	(0,5-9)
Células NK CD56	6%	(2-17)	6%	(0,1-20)

Imunização *In Vitro* de Células CD8⁺ Humanas Purificadas

Estimulação Primária

Células S2 de *Drosophila* transfectadas são incubadas em meio de Schneider (10⁶ células/mL) suplementadas com 10% de soro

de vitela fetal e CuSO_4 a 27 °C, durante vinte e quatro horas. As células são recolhidas, lavadas e ressuspensas em meio Insect Xpress (BioWhittaker) contendo 100 ug/mL de tirosinase₃₆₉₋₃₇₇ humana. Após incubação a 27 °C, durante três horas, as células S2 são misturadas com células CD8^+ a uma proporção de 1:10 em meio RPMI (Gibco) suplementado com soro autólogo a 10%. A mistura celular é incubada durante quatro dias a 37 °C durante as quais as células de *Drosophila* morrem. No Dia cinco, IL-2 (20 U/mL) e IL-7 (30 U/mL) são adicionados para expandir selectivamente a população de CTL específica para tirosinase.

Re-Estimulação

PBMCs, desprovidas de CD8 , congeladas, autólogas, obtidas no momento da leucaferese, são descongeladas, lavadas e ressuspensas em 10^6 células/mL em meio RPMI contendo 10% de soro autólogo (como uma fonte de microglobulina $\beta 2$) e 20 ug/mL tirosinase₃₆₉₋₃₇₇. Após irradiação com γ (5000 rads), as células são incubadas a 37 °C, durante duas horas. As células não aderentes são removidas, lavando com PBS de Dulbecco. Os monócitos aderentes são carregados com o epitopo da tirosinase por incubação durante 90 minutos em meio RPMI tamponado com Hepes, contendo 10% de soro autólogo e 10 ug/mL de tirosinase₃₆₉₋₃₇₇. O sobrenadante é removido e a suspensão de células CD8^+ activadas com *Drosophila* (3×10^6 células/mL em meio RPMI com 10% de soro autólogo) é adicionado a uma proporção de 10 células CD8^+ para 1 monócito aderente. Após três a quatro dias de cultura a 37 °C, IL-2 (20 U/mL) e IL-7 (30 U/mL) são adicionados com uma alteração de meio para expandir selectivamente a população de CTL específica para tirosinase.

Expansão Não específica

As células efectoras são expandidas não especificamente cultivando-as em meio RPMI suplementado com soro autólogo, anticorpo monoclonal anti-CD3 (OKT[®]3), IL-2 e PBMC irradiadas com γ .

Ensaio para Actividade e Pureza

Ensaio de CTL

As células Malme 3M são utilizadas como células alvo num ensaio de libertação de ^{51}Cr . São marcadas 5×10^6 células Malme 3M em meio RPMI contendo 4% de soro de vitela fetal, 1% de tampão HEPES e 0,25% de gentamicina a 37 °C durante uma hora, com 0,1 mCi de ^{51}Cr . As células são lavadas quatro vezes e diluídas para 10^5 células/mL em RPMI com 10% de soro de bovino fetal (ByGone). Numa placa de microtitulação de 96 poços, 100 uL de CrL efectoras e 100 uL de péptido carregado, células alvo Malme 3M marcados com ^{51}Cr são combinadas a proporções de 100:1, 20:1 e 4:1 (efectora:alvo). As células K562 são adicionados a uma proporção de 20:1 (K562:Malme 3M) para reduzir a lise de fundo de células assassinas naturais. A lise não específica é avaliada utilizando a linha celular de fibroblastos HLA-A2.1 não tumoral, Malme 3. Os controlos para medir a libertação espontânea e a libertação máxima de ^{51}Cr são incluídos em duplicado. Após incubação a 37 °C durante seis horas, as placas

são centrifugadas e os sobrenadantes contados para medir a libertação de ^{51}Cr .

A percentagem de lise específica é calculada utilizando a seguinte equação:

$$\frac{\text{cpm da amostra} - \text{cpm da libertação espontânea}}{\text{cpm de libertação máxima} - \text{cpm da libertação espontânea}} \times 100$$

Citometria de Fluxo.

As células CD8^+ , antes e após activação *in vitro*, foram analisadas para vários marcadores de superfície da célula utilizando anticorpos monoclonais fluorescentes e análise de FACS. Os resultados de um protocolo de activação típico utilizando células de um dador saudável é apresentado na Tabela 2.

TABELA 3

Análise por Citometria de Fluxo de células CD8^+		
Activadas <i>In Vitro</i>		
MARCADOR/TIPO DE CÉLULA	<u>PRÉ-ACTIVAÇÃO</u> % Média	<u>PÓS-ACTIVAÇÃO</u> % Média
Células T CD8	98	99
Receptor de células T $\text{TCR}\alpha\beta$	98	92
Receptor de domiciliação de nódulos linfáticos CD44	91	99
Células T da memória CD45RO	58	88
CD45RA	41	31
CD62L		

Receptor de domiciliação HEV	24	38
Células NK CD56	1	11
Célula T activada por CD25	0,1	29

Adicionalmente à actividade e pureza, as preparações de CTL serão ensaiadas para a esterilidade e conteúdo em endotoxina.

REAGENTES

<u>REAGENTE</u>	<u>FORNECEDOR</u>	<u>GRAU</u>	<u>NOTAS</u>
rh IL-2	Chiron	USP	Solução estéril
rh IL-7	Genzyme	Investigação	Solução estéril, liofilizada
tirosinase 369-377 humana		Investigação	
Dynabeads® M-450	Dynal	GMP	Esferas magnéticas de IgG anti-murganho de ovelha
Albumina de soro humano	Baxter	USP	Solução a 25% estéril, livre do vírus da hepatite não pirogénico
Soro de bovino fetal	Gemini	Investigação	Estéril, BSE-, endotoxina, sem micoplasma
Gammagard®	Baxter	USP	solução estéril para injeção de globulina imunitária humana
anticorpo anti-CD8		Investigação	anticorpo monoclonal anti-CD8 humano de murganho
Péptido de CD8 59-70		Investigação	Libertação de células CD8 ⁺ de esferas magnéticas
W6/32	ATCC	Investigação	anticorpo monoclonal anti-HLA-A, B, C humana de murganho

LINHAS CELULARES

<u>LINHA CELULAR</u>	<u>FORNECEDOR</u>	<u>NOTAS</u>
<i>Drosophila</i> S2	ATCC	CRL 10974
M3	UCSD	Melanoma humano não HLA-A21
Malme 3	ATCC	fibroblasto de pele normal de um doente com melanoma
Malme 3M	ATCC	Melanoma metastático do pulmão (mesmo doente que Malme 3)
<u>LINHA CELULAR</u>	<u>FORNECEDOR</u>	<u>NOTAS</u>
M14	UCSD	Melanoma humano HLA-A2.1
K562	ATCC	Linha celular eritroleucêmica humana; alvo para células NK
Células JY	ATCC	linha celular B humanas, transformadas com EBV, que expressam HLA-A2.1 e B7
P815 e P1024	ATCC	linhas celulares de mastocitoma de murganho DBA/2
Jurkat A2.1	ATCC	leucemia de células T aguda, transformada com HLA-A2.1 humana
ATCC: American Type Culture Collection		

EXEMPLO 2

Ensaio de Infusões de Células T Citotóxicas Contra Melanoma

Objectivo do Ensaio

Este exemplo ensina a eficiência de infusões de células T citotóxicas no tratamento de melanoma como avaliado de acordo com os seguintes factores:

1. segurança e tolerância de CTL autólogas re-infundidas após imunização *in vitro*;
2. cinética de CTL infundidas na produção na circulação sistémica em análise de diluição limitante;
3. disposição de CTL no corpo total por radiocintografia;
4. composição de células de nódulos indivíduos a biopsia por imuno-histologia (células CTL, TH, NK, B); e
5. regressão de lesões mensuráveis e duração da resposta ao longo de dois meses.

População de Doentes

A elegibilidade para o tratamento requer que os doentes possuam melanoma maligno histologicamente documentados, não indivíduos a ressecção, que foi medido ou avaliado, e o haplotipo HLA-A2. A avaliação do pré-tratamento incluiu a avaliação radiológica do cérebro por MRI ou rastreio de CT, rastreio de CT ao peito e abdómen, e exame físico, especialmente

da pele e nódulos linfáticos. O número total de doentes tratados foi quinze (nove homens e seis mulheres). As idades variaram desde os 33 aos 75 anos com uma média de 58 anos. A duração média da doença metastática foi de 1,5 anos. Foi realizado um teste de pré-tratamento à pele para determinar se existia um estado de falta de energia em 14/15 doentes com 5/14 testes negativos para todos os sete antigénios comuns avaliados. Os doentes foram rastreados para o haplotipo HLA-A2 por análise de FACS com um anticorpo monoclonal específico para HLA-A2 (BB7.2). A sub-tipagem foi realizada por análise de PCR. Todos menos um dos doentes foram HLA-A*0201; a excepção (doente 08) foi HLA-A*0205.

Tratamento com CTL Autólogas Criadas Ex Vivo

Quinze doentes foram tratados neste protocolo clínico. Todos os doentes receberam, pelo menos, uma infusão única de CTL autólogas. O número de ciclos e a dose de células administradas a cada doente são resumidas na Tabela 1. O número de células produzidas *in vitro* foi dependente de factores relacionados com o doente, tais como os números de PBMCs isoladas do processo de aferese e o número de células T CD8⁺ presentes em cada preparação de PBMC. Uma vez que todas as células produzidas *in vitro* foram re-infundidas no dador, as doses administradas a cada doente foram necessariamente variadas. Numa tentativa para normalizar as doses entre doentes, foi registado um valor de “potência” calculado para cada dose. O valor foi obtido multiplicando o número total de células pela actividade lítica obtida com células alvo carregadas com péptido. As doses de células T infundidas variaram desde um mínimo de 4×10^7 (doente 08) até um máximo de 32×10^9 (doente 13). Os doentes foram submetidos a um

segundo, terceiro ou quarto ciclo de tratamento com base no seu estatuto clínico no final de cada ciclo. O número de PBMC obtidas das amostras de aferese tende a ser mais baixo em doentes submetidos a ciclos adicionais, especialmente se o início do ciclo subsequente foi a dose para o final do anterior. Isto é atribuído a linfopenia persistente devido ao IFN α -2b administrado durante o ciclo anterior. O número total de células T CD8⁺ "naive" isoladas era dependente da sua percentagem em cada das preparações de PBMC. A percentagem de células T CD8⁺ variou entre 8% e 31% entre os doentes. O factor de expansão obtido também contribuiu para os números de células final e variou desde 0,1-6,0 vezes. O processo para criar CTL ex vivo é ensinado na Descrição e Exemplo 1, acima.

Regulação Positiva de Antígenios Associados a Classe I e Melanoma em Resposta a IFN α -2b

Numa tentativa para aumentar a capacidade das CTL específicas para o antígeno para lisar células de melanoma *in vivo*, foi administrada uma dose baixa de IFN α -2b durante cinco dias consecutivos, antes da infusão de CTL e três vezes por semana durante mais quatro semanas. Um modo de medir uma resposta *in vivo* à citocina é avaliar biopsias obtidas em vários pontos de tempo por análise imuno-histoquímica para coloração positiva com anticorpos específicos. Foram obtidas várias biopsias num doente com múltiplas lesões de pele (doente 04) para avaliação da expressão tanto de classe I como de antígeno. As biopsias indicaram que a expressão de Classe I e MART-1 foram fracamente positivas antes de qualquer tratamento (biopsia A). Após cinco dias de injeções subcutâneas de 10 MU/m², foi observado um aumento dramático nestes dois marcadores (biopsia

B). Para tirosinase e gp100, a coloração imuno-histoquímica foi negativa a fracamente positiva, respectivamente nas amostras de pré-tratamento (biopsia A). Após a dose inicial de cinco dias de IFN α e treze tratamentos adicionais, a expressão destes antígenos foi aumentada nas amostras de tecido corado (biopsia C).

Especificidade Antigénica de CTL Criadas Ex Vivo

As CTL produzidas de todos doentes foram avaliadas no dia de libertação contra alvos de T2 carregados com péptido, uma linha celular de melanoma HLA-A2 (Malme 3M) e uma linha de melanoma autóloga, se o material de biopsia estiver disponível para estabelecer uma linha. Cada dose preparada de células foi avaliada quanto à sua actividade citolítica. As células T2 carregadas com péptido, apresentar cada péptido isoladamente ou todos os quatro péptidos simultaneamente, foram utilizados para determinar a especificidade da resposta de CTL produzida para cada doente. A capacidade para lisar células contendo antígeno associadas a melanoma expressos endogenamente foi avaliada com uma linha HLA-A2 compatível ou uma linha tumoral autóloga. Adicionalmente à actividade citolítica, a especificidade do antígeno foi avaliada com um método estabelecido para detectar a produção de interferão gama intracelular, produzido em resposta a um estímulo de péptido específico. As CTL produzidas no final do protocolo ex vivo foram avaliadas por este método. A percentagem de células específicas para cada dos péptidos foi registada individualmente. O número total de células específicas em cada cultura de CD8 em bruto do doente 13 foi calculado adicionando cada uma das especificidades do péptido detectadas nessa população de células T. Podia ser detectado um aumento no

número total de células específicas com cada ciclo de tratamento sucessivo.

Detecção de Células CD8 e CD4 Infiltrantes em Biopsias de Tumor Pós-Terapia com CTL

Amostras de biopsia de todos os doentes antes de, durante e após tratamento teria sido ideal. Contudo, as condições experimentais permitiram amostras de biopsia de apenas um número limitado de doentes. O tecido tumoral foi obtido de cinco dos quinze doentes inscritos neste estudo. Nos dois doentes (doentes 08 e 13) as amostras de biopsia estavam disponíveis cinco e seis semanas após a terapia com células T, respectivamente. O exame das amostras de tecido revelaram a presença de ambas as células infiltrantes CD8 e CD4. Uma das amostras tumorais foi retirada de uma lesão na pele na região occipital do couro cabeludo, que aumentou em tamanho no momento do exame de acompanhamento, quatro semanas após uma segunda infusão das células T. A biopsia revelou a necrose do tecido que foi fortemente infiltrado com linfócitos. A outra biopsia foi a partir da cabeça do osso do fémur, removida durante cirurgia de substituição da anca. A lesão na pele do doente 08 foi fortemente positiva (4+) para ambos um marcador geral de classe I, e um marcador específico de HLA-A2. A tirosinase e gp100 foram fracamente positivos (1+ e 2+, respectivamente), embora a MART-1 tenha sido negativa nesta mesma amostra. As regiões da biopsia do doente 13 foram também necróticas, com coloração mais heterogénea; populações distintas de células tumorais sem expressão da molécula HLA-A2.1 e uma ou mais das MAA. Contudo, as regiões de tecido intactas revelaram forte classe I (4+) e todos os antigénios associados a melanoma. A infiltrações linfocíticas nesta amostra mais tardia pareceram

rodear os nódulos tumorais em vez de se infiltrar profundamente nesta. Contudo, a percentagem de células mais alta directamente associadas com o tumor foram as células CD8. A falta de amostras de biopsias pré-tratamento de ambos estes doentes preveniram uma confirmação de tipos semelhantes de células infiltrantes em amostras de tecido antes do tratamento com CT

Rastreios de CT Pós-Terapia com Células T Confirmam uma Resposta Objectiva

Os rastreios de CT foram parte do critério de rastreio de pré-tratamento e o exame de acompanhamento após tratamento. O doente 10 recebeu uma única infusão de 8×10^8 CTL (7/27/99) cinco semanas após o rastreio pré-tratamento (6/23/99). Quando um rastreio de CT do peito foi repetido um mês após a infusão (8/27/99), foi observado um aumento dramático no tamanho de uma lesão no pulmão. De um modo semelhante, o doente 14 submeteu-se a um rastreio de CT ao peito como parte do processo de inscrição (9/10/99), três semanas e meia antes de uma primeira infusão com $6,6 \times 10^8$ células (10/5/99). Um rastreio de CT de acompanhamento (1/7/99), um mês após uma segunda infusão com $11,5 \times 10^8$ células, revelou encolhimento dramático em três lesões separadas. O doente 13 também tinha uma resposta objectiva como medido pré e pós rastreios de CT. A adenopatia paratraqueal foi desde $7,8 \text{ cm}^2$ (pré-estudo) até $4,4 \text{ cm}^2$ após ciclo I e desapareceu a seguir ao ciclo II.

A presença de um Estado Anérgico Não Impede a Capacidade para CTL Prevenir uma Resposta Clínica

A maioria dos doentes tratados neste protocolo receberam intervenção médica anterior. Foi realizado um teste de pele de pré-tratamento para determinar se uma resposta anérgica a um painel de sete antigénios comuns correlacionados com ou uma incapacidade para criar CTL *ex vivo*, ou prevenir uma resposta clínica documentada. A capacidade para criar CTL *ex vivo* não está correlacionada com os resultados do teste da pele de pré-tratamento do doente. Deve ser observado que os doentes 03 e 04 (ambos de resposta mista) tinham testes de pele repetidos antes do início do segundo ciclo e permaneceram anérgicos.

EXEMPLO 3

Criação de CTL Específicas para HER-2/neu Capazes de Lisar Células de tumores da Mama e Ovários

O Requerente estava interessado em aplicar a sua tecnologia de criação de CTL a outros tipos de tumor para determinar se todas as formas de cancro podem ser direccionadas com esta abordagem. HER-2/neu é um proto-oncogene com homologia para EGFR que é amplificado e sobre-expresso em muitos cancros humanos, em grande medida adenocarcinomas da mama, ovários e cólon. É frequentemente associado com doença agressiva e pode ser um indicador de um fraco prognóstico. Foi estudado em vários ensaios clínicos como um alvo possível para estes tipos de cancro.

No início dos anos de 1990 foram identificados epitopos de péptido HER-2/neu HLA-A2.1 restritos por algoritmos de ligação de péptido assistido por computador ou por mapeamento de CTL isolados de ascites de doentes com cancro ovariano (Tabela 3).

TABELA 3

Péptidos HER-2/neu Restritos a HLA-A2.1					
Péptidos HER-2/neu	PRI Nº de	Outra ID Nº	Localização	Sequência (SEQ ID Nº)	Referência
48-56	827	D113	EC	HLYQGCQW (SEQ ID Nº:13)	Disis <i>et al.</i> , 1994
369-377	835	E75	EC	KIFGSLAFL (SEQ ID Nº:8)	Fisk <i>et al.</i> , 1995
650-658	838	GP1	TM	PLTSIISAV (SEQ ID Nº: 15)	Fisk <i>et al.</i> , 1995
654-662	837	GP2	TM	IISAVVGIL (SEQ ID Nº: 14)	Peoples <i>et al.</i> , 1995
773-782	861	N/A	IC	VMAGVGSPYV (SEQ ID Nº:16)	Lustgarten <i>et al.</i> , 1997
789-797	826	E90	IC	CLTSTVQLV (SEQ ID Nº: 7)	Disis <i>et al.</i> , 1994
851-859	862	E89	IC	VLVKSPNHV (SEQ ID Nº: 17)	Disis <i>et al.</i> , 1994
971-979	863	C85	IC	ELVSEFSRM (SEQ ID Nº: 18)	Fisk <i>et al.</i> , 1995

Todos os péptidos foram sintetizados, foi-lhes dado um número de identificação (Nº PRI) e avaliados quanto à capacidade para criar CTL *ex vivo* utilizando o mesmo método empregue para epitopos de péptido de células T associados a melanoma. As células CD8 foram isoladas de dadores normais para determinar a capacidade para criar CTL de rotina *ex vivo* com células de *Drosophila* carregados com epitopos de péptido de CTL conhecidos. Os péptidos 826, 835, 861 e 863 tinham a frequência mais elevada da criação de CTL (**Tabela 4**).

TABELA 4

Frequência da Criação de CTL HER-2/neu em Dadores Normais								
Dador	826	827	835	837	838	861	862	863
<u>193</u>	+		+					
<u>194</u>	+	-	+	-	-	+	-	+
<u>195</u>	+		+			+		+
<u>196</u>	+	-	+	-	-	+		
<u>197</u>	+	-	+	-	+	+	-	+
<u>198</u>	-	-	+	-	+	+	-	+
<u>207</u>	+		+			+		+
<u>212</u>	+		+			+		+
<u>218</u>	+		+			+		+
<u>232</u>	-		+			+		-
<u>233</u>	+		+			+		+
<u>241</u>		+				+		
<u>243</u>		+				+		

Embora as células transfectadas de *Drosophila* tenham a capacidade única para apresentar até dez epitopos de péptido diferentes (Figura 10), foram seleccionados os quatro péptidos HER-2 826, 835, 861 e 863 devido à frequência de concepção de CTL para estes péptidos *ex vivo*. Estes quatro péptidos diferentes HER-2 representam ligantes fracos a moderados para a molécula de HLA-A2.1 apresentada na superfície das células de *Drosophila* transfectadas. O Requerente tende a incluir ligantes de A2 que são fracos, uma vez que a experiência com péptidos associados a melanoma sugere que ligantes fracos de classe I criem geralmente CTL potentes que reconhecem células tumorais, se na verdade eles representam epitopos de células T nativas. A maioria das proteínas associadas que se direccionam são auto-

antigénios e como tal seria de esperar que possuíssem a afinidade elevada para a molécula de classe I que é observada com péptidos virais. Os ligantes baixos a moderados geralmente criam CTL que lisam as células tumorais muito eficientemente. Isto foi demonstrado com o péptido MART-1 que é um ligante de baixa afinidade nas células de *Drosophila* (Figura 3), contudo representa um epitopo que de rotina cria CTL potentes capazes de lisar células alvo carregadas com péptido (T2) ou, mais importante, células de melanoma (Maline 3M) (Figura 12).

O HER-2/neu é um membro da família EGF-R e funciona como um receptor do factor de crescimento. A proteína HER-2 é expressa durante o desenvolvimento fetal em humanos. Em adultos, a proteína é detectável fracamente em células epiteliais de muitos tecidos normais. Em células normais, o gene HER-2 está presente como uma única cópia. A amplificação do gene e/ou sobre-expressão da proteína associada foi identificada em muitos cancros humanos incluindo da mama, ovariano, uterino, do estômago e adenocarcinoma do pulmão. As diferenças de sequência entre HER-2 e EGF-R receptor são apresentadas na Tabela 5. Três dos quatro péptidos HER-2 que foram avaliados possuem três ou mais alterações de aminoácidos entre as duas proteínas. Uma única alteração de aminoácidos é suficiente para discriminar entre as duas proteínas.

TABELA 5

HER-2/neu Versus EGF-R			
<u>PROTEÍNA</u>	<u>PÉPTIDO Nº</u>	<u>SEQUÊNCIA (SEQ ID Nº)</u>	<u>Nº de ALTERAÇÕES</u>
HER-2/neu EGFR	835	KIFGSLAFL (SEQ ID Nº: 8) SISGDLHII (SEQ ID Nº: 37)	5
HER-2/neu EGFR	861	VMAGVGSPYV (SEQ ID Nº:16) VAASVDNPHV (SEQ ID Nº: 38)	5
HER-2/neu EGFR	863	ELVSEFSRM (SEQ ID NO 18) ELIIEFSKM (SEQ ID Nº: 39)	3
HER - 2/neu EGFR	826	CLTSTVQLV (SEQ ID Nº: 7) CLTSTVQLI (SEQ ID Nº: 40)	1
HER-2/neu EGFR	689-697	RLLQETELV (SEQ ID Nº: 41) RLLQERELV (SEQ ID Nº: 42)	1

Uma vez que as CTL foram produzidas após o protocolo de estimulação de quatro semanas *ex vivo*, foi avaliado se as células específicas para o péptido estavam presentes utilizando moléculas tetraméricas de HLA-A2.1 preparadas com os péptidos de imunização. Como demonstrado na Figura 13, a capacidade para criar CTL específicas para o péptido era dependente do dador. No Painel A (dador 261), o dador produziu uma resposta de CTL forte ao péptido 835 (37,55%). No Painel B (dador 262), as CTL específicas para o péptido podem ser detectadas com ambas as moléculas tetraméricas 835 e 861 (3,6% e 15,1%, respectivamente). Isto suporta a utilização de péptidos múltiplos para garantir CTL específicas para o péptido no final do protocolo de estimulação. Este protocolo *ex vivo* permite que se crie CTL específicas múltiplas, relativamente, facilmente.

Respostas Anti-Péptido e Anti-Tumor

Após o final do protocolo completo *ex vivo*, as CTL produzidas foram avaliadas para especificidade de antígeno. Para criar as CTL, no Dia 0 as células de *Drosophila* foram carregadas com uma combinação dos quatro péptidos HER-2. No final do protocolo de estimulação de quatro semanas *ex vivo*, a cultura de CD8 em grosso foi avaliada para especificidade a antígeno. As células T2 carregadas com cada dos péptidos imunizantes foram utilizadas como células alvo. Na Figura 14, é apresentada uma resposta típica. A cultura em grosso contém especificidade para cada dos quatro péptidos HER-2. A resposta anti-tumoral foi avaliada numa linha celular tumoraes ovariana (ATCC; HTB-77). Quando uma linha celular alvo não está restrita a HLA-A2.1, foi transfectada a linha celular para possuir um sistema de ensaio +/- . Quando HLA-A2.1 foi transfectada na linha HTB-77, foi observada uma morte aumentada por células efectoras CD8 (Figura 15, Painéis A a D). Efectores específicos para HER-2, representando os péptidos individuais foram avaliados para confirmar a apresentação de cada dos epitopos péptidos nesta linha celular tumoral.

Uma linha celular de adenocarcinoma da mama (ATCC; HTB-131), transfectada com HLA-A21 foi, também, avaliada para uma capacidade para demonstrar a lise tumoral com os efectores de péptido específicos para HER-2. As CTL específicas para péptido 861 podem lisar esta linha celular tumoral quando transfectada com HLA-A2.1 (Figura 16).

Tratamento com IFN γ Necessário para a Lise de Células de Tumor

A linha celular HTB-77/A2.1 necessita de um pré-tratamento com IFN γ para demonstrar a lise específica para o péptido. As células foram tratadas com 5000/mL de IFN γ (específica actividade of 25 ng/mL) durante vinte e quatro horas antes do início do ensaio de libertação de ^{51}Cr . Na Figura 17, a adição do IFN γ resultou na lise melhorada da linha celular transfectada com HLA-A2.1. Para determinar o efeito desta dose de IFN γ na expressão à superfície de HLA-A2.1 e HER-2, foi efectuada um análise FACS para determinar os níveis destas moléculas após vinte e quatro e quarenta e oito horas de indução. Na Figura 18, os Painéis A e B apresentam os resultados da análise FACS. No Painel A, não houve estimulação da molécula HER-2 à superfície das células HTB-77 a vinte e quatro e quarenta e oito horas após indução com IFN γ . Nas células transfectadas com HLA-A2.1, nem HER-2 nem HLA-A2.1 demonstraram um aumento no nível de expressão à superfície após um protocolo de tratamento semelhante, o que foi notado foi um aumento no nível da expressão de TAP-1, assim como HLA-DM e -DR, Catepsina S e D e Caspase 5, quando os níveis de ARNm foram avaliados por análise em micromatriz em chip de ADN (Figura 19). Isto pode explicar porque se verifica uma morte estimulada das células HTB-77/A2.1 na presença de IFN γ . Uma sob-regulação desta molécula particular pode resultar num processamento mais eficiente da molécula de HER-2, permitindo uma melhor apresentação dos péptidos de interesse.

Péptidos

Os péptidos sintéticos foram preparados através de química convencional Fmoc utilizando um sintetizador de péptidos (Gilson Company, Inc.). Todos os péptidos foram purificados até >95% pureza por HPLC de fase reversa numa coluna C-8. A pureza e a identidade foram estabelecidas utilizando um espectómetro de massa com ionização electrospray. Os péptidos associados a melanoma incluídos: péptido 819 foi específico para MART-1 (AAGIGILTV SEQ ID N°:6), 817 e 853 foram ambos péptidos de gp100 (TTDQVPFSV SEQ ID N°:4 e KTWGQYWQV SEQ ID N°:5, respectivamente), os péptidos específicos de tirosinase foram 689 e 792, com 792 representando a versão modificada pós-tradução (YMDGTMSQV SEQ ID N°:2) da sequência nativa (YMNGTMSQV SEQ ID N°:1) representada pelo péptido 689. Os péptidos 826 (CLTSTVQLV SEQ ID N°:7) e 835 (IQFGSLAFL SEQ ID N°:8) representavam sequências HER-2/neu dos domínios intracelular e extracelular, respectivamente da proteína p185. Pec6020 (ALALAALLW SEQ ID N°:10) e Pec6025 (ALLWDREV SEQ ID N°:11) foram sequências de sobreposição representando uma proteína mucinosa detectada nas linhas de tumor ovariano. A C-lectina também foi a proteína detectada nas linhas de celulares de tumor ovariano e um péptido da sua sequência (C-lectina8) é representado por KMASRSMRL SEQ ID N°:9.

Ensaio de Toxicidade In Vitro

Os ensaios convencionais de libertação de ^{51}Cr foram efectuados para determinar o reconhecimento pelas células do efector CTL dos epitopos de péptido associados a melanoma carregados em células T2. As 3×10^6 células T2 recolhidas foram

cultivadas em RPMI +10% FBS (meio). Foram adicionados 0,1 mCi de ^{51}Cr e incubados a 37 °C num banho de água. As células marcadas foram adicionadas a 10 mL de lavagem a 4% (RPMI + 4% FBS) e o precipitado, lavado por mais duas vezes, e ressuspensas no meio para uma final concentração de $0,2 \times 10^6/\text{mL}$ para registar a radioactividade das células lisadas de forma espontânea *versus* por detergente. As células foram pulsadas com o(s) péptido(s) apropriados a 20 ug/mL durante trinta minutos. Foram adicionados 50 uL a cada placa de 96 poços contendo células efectoras CD8 a $10,2,0.4$, e $0,08 \times 10^6/\text{mL}$, que foram incubados a 37 °C durante seis horas, centrifugadas e recolhidas para o sobrenadante

Citometria de Fluxo e Coloração com Tetrâmero

As células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados com FITC ou PE por incubação a 4 °C, durante 30 minutos, em tampão FACS (1% de BSA, 0,02% de NaN_3 em PBS), seguido por uma lavagem no mesmo tampão. As células foram fixas em 0,5% de formaldeído antes da aquisição de dados e análise num citómetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson) com o seu programa CellQuest. A coloração não específica foi medida com o mesmo anticorpo secundário utilizado para marcar os anticorpos primários purificados ou um controlo coincidente com o isotipo quando os anticorpos primários foram diferentemente marcados. A coloração tetramérica foi efectuada com moléculas tetraméricas HIVgag específicas para HLA-A2.1 (Beckman Coulter) portadoras da sequência SLYVTVATL SEQ ID N°:43 como um controlo negativo. Foram preparados tetrâmeros específicos para HER-2 com as sequências CLTSTVQLV (826 SEQ ID N°: 7), KIFGSLAFL (835 SEQ ID N°:8), ou péptido VMAGVGFSPYV (861 SEQ ID N°:16). Os complexos tetraméricos HLA-A2.1-péptido marcados com PE foram

utilizados em conjunto com anticorpos monoclonais anti-CD8a humano (BD PharMagen) marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) para corar células T CD8⁺ específicas para epitopo como descrito no folheto da embalagem. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo de duas cores Becton Dickinson FACScan e as células T CD8⁺ que passaram foram examinadas para coloração com complexos tetraméricos HLA-A2.1-péptido.

EXEMPLO 4

Produção de CTL Adicionais da Mama e Ovarianos Específicos com Este Protocolo de Estimulação *Ex Vivo*

Demonstrou-se a capacidade para produzir respostas de CTL para todos os epitopos restritos de péptido HLA-A2.1 para vários antigénios de tumor de diferentes origens de tumor. Os estudos iniciais do requerente focaram-se num melanoma, em que se era capaz de demonstrar respostas clínicas de objectivo em doentes tratados com CTL específicos para quatro diferentes epitopos de péptidos específicos para as proteínas MART-1, gp100 e tirosinase associadas ao melanoma [Richards *et al.*, *Amer. Soc. Clin. Oncol.*, São Francisco, Califórnia (2001, Maio)].

Para estender a capacidade de produzir CTL para outros antigénios de tumor presentes numa vasta variedade de outros cancros, seleccionaram-se sequências novas e publicadas para os antigénios de tumor comuns a vários tipos diferentes de tumor. Estes incluem AES, MUC-1, CEA, FBP, C-Lectina, NY-ESO-1, Pec60, CA-125, MAGE-3, telomerase e G250. A Tabela 7 descreve estes antigénios, a frequência da expressão e os cancros que os expressam. A frequência da resposta a estes péptidos com o

protocolo do requerente, de estimulação ex vivo, é listado na Tabela 6.

TABELA 6

Frequência da Resposta a Epitopos de Péptidos da Mama e Ovarianos em Dadores Normais																	
Dador	879	893	894	899	900	901	902	903	906	907	908	909	910	911	912	913	914
<u>248</u>	+	+	+														
<u>249</u>	+	+	+														
<u>250</u>	+	-	+														
<u>251</u>	-	-	+														
<u>252</u>	+	-	+														
<u>253</u>	-	-	+	+													
<u>254</u>	+	-	+	+													
<u>255</u>					-	+	+	-	+	+	+	+					
<u>256</u>					+	-	+	+	+	+	-	+					
<u>257</u>													+	+	+		
<u>259</u>													+	-	-		
<u>260</u>					-	-	-	-								+	
<u>261</u>									+	+	+	+					
<u>262</u>									+	+	-	+					-
<u>265</u>	+	+	+	+	-	-	-	-	+				+	+		-	

TABELA 6

Descrições de Antígeno de Tumor	
Antígeno	Descrição
CA-125	Antígeno 125 de cancro é um marcador de célula epitelial expresso por tumores ovarianos e algumas linhas de celulares ovarianas. Cerca de 85% dos doentes com cancro ovariano possuem um CA125 no soro aumentado e é assim normalmente utilizado como um marcador de tumor no soro (<i>Cancer Letters</i> (1999, Out.) 145(1-2) pág. 133-141)

Descrições de Antígeno de Tumor	
Antígeno	Descrição
MUC-1	Mucina é uma glicoproteína transmembranar expressa em epitélio normal e maligno. A forma subglicosilada de MUC-1 sobre-expressa na superfície celular de muitos adenocarcinomas humanos, tais como cancro da mama e ovariano, assim como malignidades hematológicas incluindo mieloma múltiplo e linfoma de células B. (<i>Blood</i> (1999, Junho) 93(12) pág. 4309-4317)
G250	Um antígeno associado a carcinoma de células renais expresso em 85% de RCC mas não em tecido normal de rim. É idêntico ao antígeno associado a tumor MN/CAIX que é expresso em cerca de 50% dos cancros de mama invasivos. (<i>Cancer Research</i> (1999, Nov.);59(21) pág. 5554-5559)
FBP	A proteína de ligação ao folato é um receptor envolvido no transporte de folato. É sobre-expresso em mais de 90% de tumores ovarianos e 20-50% dos cancros da mama. (<i>Anti cancer Research</i> (1999 Jul-Ago) 19(4B) pág. 2907-2916)
HER-2/neu	Um proto-oncogene (HER-2) que codifica uma proteína transmembranar semelhante em sequência e estrutura a EGF-R. HER-2/neu é sobre-expresso tanto como 200 vezes acima dos tecidos normais nos tumores da mama e ovarianos. Foi também identificado em carcinomas de células renais e pulmão. (<i>J. Exp. Med.</i> (1995, Junho) Vol. 181, pág. 2109-2117)
NY-ESO-1	Um antígeno de cancro dos testículos encontrado em cerca de 30% dos cancros da mama, próstata e

Descrições de Antígeno de Tumor	
Antígeno	Descrição
	ovarianos, cancro do pulmão, cancro da bexiga, cancro da cabeça e pescoço e melanoma. Os doentes que têm cancros com tumores que expressam este antígeno possuem também, normalmente, anticorpos circulantes contra estes. (<i>J. Immunology</i> (2000) vol. 165 pág. 948-955)
CEA	Antígeno carcinoembrionário é um antígeno associado a tumor frequentemente expresso em tumores epiteliais (cólon, mama, pulmão). Os níveis de CEA no soro podem estar correlacionados com o estágio de doença e são utilizados para monitorizar tratamento e reocorrência de doença. (<i>Human Immunology</i> (1998) vol. 59 pág. 1-14)
MAGE-3	Um antígeno de cancro dos testículos expresso em 70-80% de lesões de melanoma metastático e linhas de celulares. É um membro da família de proteínas associadas a melanoma ou MAGE. Adicionalmente, MAGE-3 foi encontrada em 20-60% de tumores epiteliais (carcinomas do cólon, mama, pulmão, gástrico). (<i>Human Immunology</i> (1998) vol. 59 pág, 1-14)
AES	O estimulador amino da proteína dividida é parte de um conjunto de repressores de transcrição codificados pelo estimulador da divisão dos genes. Este antígeno de tumor foi identificado em linfócitos associados a tumor de tumores do ovário e da mama. (<i>Molecular Immunology</i> (1998) 35(17) pág. 1121-1133)
HTR	A telomerase (hTR) é um tipo especializado de

Descrições de Antígeno de Tumor	
Antígeno	Descrição
	transcriptase reversa (hTERT ou hTERT1) que cataliza a síntese e extensão de ADN telomérico. A actividade desta enzima é elevada em cerca de 90% de todos os tumores humanos incluindo cancros da mama, tiróide, bexiga, nuca, próstata, cólon, pâncreas e estômago. (<i>Cancer Research</i> (2001, Dec) 61(23) pág. 8366-8370)

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Moriarty,
Ann Leturcq,
Didier Degraw,
Juli Heiskala,
Marja Peterson,
Per Jackson,
Michael

<120> MÉTODO DE TERAPIA DE CÉLULAS PARA O TRATAMENTO DE TUMORES

<130> ORT-1557

<160> 42

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Tyr Met Asn Gly Thr Met Ser Gln Val
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val
1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Phe Leu Pro Trp His Arg Leu Phe Leu Leu
1 5 10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Ile Asp Thr Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Ala Ala Gly Ile Gly Leu Thr Val
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Lys Met Ala Ser Arg Ser Met Arg Leu
1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Ala Leu Ala Leu Ala Ala Leu Leu Val Val
1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Ala Leu Leu Val Val Asp Arg Glu Val
1 5

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Ala Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly
1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val
1 5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val
1 5 10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met
1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Gly Pro Leu Thr Pro Leu Pro Val
1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Ser Thr Ala Pro Val His Asn Val
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

<212> PRT

213> *Homo sapiens*

<400> 26

Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 27

Tyr Leu Glu Thr Phe Arg Glu Gln Val
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 28

Val Leu Leu Lys Leu Arg Arg Pro Val
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

Gly Leu Gln Ser Pro Lys Ser Pro Leu
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

Glu Leu Tyr Ile Pro Ser Val Asp Leu
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

Lys Ala Leu Phe Ala Gly Pro Pro Val
1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

Phe Met Trp Gly Asn Leu Thr Leu Ala
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 33

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 34

Ile Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 35

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 36

His Leu Ser Thr Ala Phe Ala Arg Val
1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Ile
1 5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

Val Ala Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val
1 5 10

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 39

Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met
1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 40

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 41

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 42

Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu Val
1 5

Lisboa, 24 de Julho de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar uma suspensão de CD8⁺ para utilização no tratamento de um indivíduo com cancro compreendendo:

a. preparação de uma linha celular apresentadoras de antigénio que não ocorre naturalmente (nnAPC), em que a referida nnAPC apresenta, simultaneamente, de quatro a dez diferentes moléculas de péptido associadas com o referido cancro em que as referidas moléculas de péptido possuem cada cerca de seis a doze aminoácidos de comprimento,

b. estimulação de células CD8⁺ colhidas do referido indivíduo ou dador adequado com a referida linha celular nnAPC;

c. adicionar as referidas células CD8⁺ ao meio que contém uma citocina seleccionada do grupo consistido de IL-2, IL-7 ou meio de crescimento condicionado (CGM), em que as referidas citocinas podem ser utilizadas individualmente ou em combinação;

d. misturar monócitos do sangue periférico não ressuspensos ou monócitos do sangue periférico sem CD8, colhidos do referido indivíduo ou dador adequado com cerca de 1 a 50 ug/mL de um dos referidos péptidos que a referida nnAPC apresenta simultaneamente;

e. irradiar a referida suspensão de monócitos de sangue periférico com uma dose suficiente de radiação γ necessária para esterilizar todos os componentes na suspensão, excepto os monócitos do sangue periférico desejados;

f. isolar monócitos do sangue periférico aderentes;

g. aplicação dos referidos monócitos do sangue periférico aderentes com cerca de 1 ug/mL a 50 ug/mL de cada dos referidos péptidos; e

h. combinar as referidas células $CD8^+$ com os referidos monócitos do sangue periférico aderentes a uma proporção de cerca de dez células $CD8^+$ para um monócito do sangue periférico.

2. Método da reivindicação 1, em que as referidas moléculas de péptido possuem cerca de oito a dez aminoácidos de comprimento.
3. Método da reivindicação 1, em que as referidas moléculas de péptido estão num intervalo de concentração de 10 nM a 100 mM.
4. Método da reivindicação 1, em que o referido componente citocina é IL-2.
5. Método da reivindicação 1, em que o referido componente citocina é IL-2 e IL-7 em combinação.

6. Método da reivindicação 1 em que a dose de radiação γ é 3000 a 7000 rads.
7. Método da reivindicação 1, em que a dose de radiação γ é cerca de 5000 rads.
8. Método para preparar uma suspensão de $CD8^+$ para utilização no tratamento de um indivíduo com cancro compreendendo:
 - a. preparação de uma linha celular apresentadoras de antígeno que não ocorre naturalmente (nnAPC), em que a referida nnAPC apresenta, simultaneamente, de quatro a dez diferentes moléculas de péptido associadas com o referido cancro;
 - b. estimulação de células $CD8^+$ colhidas do referido indivíduo com a referida linha celular nnAPC durante cerca de seis a sete dias;
 - c. estimulação das referidas células $CD8^+$ com IL-2 e IL-7 no meio;
 - d. misturar monócitos do sangue periférico não ressuspensos ou monócitos do sangue periférico sem $CD8^+$ colhidos do referido indivíduo, com cerca de 20 ug/mL de cada péptido;
 - e. irradiar os referidos monócitos do sangue periférico com cerca de 5000 rads de radiação γ ;
 - f. isolar monócitos do sangue periférico aderentes;

- g. aplicação dos referidos monócitos do sangue periférico aderentes com cerca de 1 ug/mL a 50 ug/mL de cada um dos referidos péptidos;
 - h. combinar as referidas células $CD8^+$ com os referidos monócitos do sangue periférico aderentes a uma proporção de cerca de dez células $CD8^+$ para um monócito do sangue periférico;
 - i. estimular a referida suspensão combinada de células $CD8^+$ e monócitos do sangue periférico durante cerca de seis a sete dias;
 - j. estimular a referida suspensão de células $CD8^+$ e monócitos do sangue periférico com IL-2 e IL-7 no meio; e
 - i. ensaiar a suspensão de $CD8^+$ para actividade de CTL, pureza, esterilidade e conteúdo em endotoxina adequados.
9. Método da reivindicação 8, em que cada péptido possui cerca de oito a dez aminoácidos de comprimento.
10. Método para preparar uma suspensão de $CD8^+$ para utilização no tratamento de um indivíduo com melanoma compreendendo:
- a. preparação de uma linha celular apresentadoras de antigénio que não ocorre naturalmente (nnAPC), em que a referida nnAPC apresenta, simultaneamente, de quatro a dez diferentes moléculas de péptido associadas com o

referido melanoma em que cada péptido possui oito a dez aminoácidos de comprimento;

b. estimulação de células $CD8^+$ colhidas do referido indivíduo com a referida linha celular nnAPC durante cerca de seis a sete dias;

c. estimulação das referidas células $CD8^+$ com IL-2 e IL-7 no meio;

d. misturar monócitos do sangue periférico não ressuspensos ou monócitos do sangue periférico sem $CD8^+$ colhidos do referido indivíduo com cerca de 20 ug/mL de cada péptido apresentado pela referida nnAPC;

e. irradiar os referidos monócitos do sangue periférico com cerca de 5000 rads de radiação γ ;

f. isolar monócitos do sangue periférico aderentes;

g. aplicação dos referidos monócitos do sangue periférico aderentes com cerca de 1 ug/mL a 50 ug/mL de cada péptido referido;

h. combinar as referidas células $CD8^+$ com os referidos monócitos do sangue periférico aderentes a uma proporção de cerca de dez células $CD8^+$ para um monócito do sangue periférico;

i. estimulação da referida suspensão combinada de células $CD8^+$ e monócitos do sangue periférico durante cerca de seis a sete dias;

- j. estimular a referida suspensão de células CD8⁺ e monócitos do sangue periférico com IL-2 e IL-7 no meio; e
 - k. ensaiar a suspensão de CD8⁺ quanto à actividade de CTL, pureza, esterilidade e conteúdo em endotoxina adequados.
- 11. Método da reivindicação 10, em que a referida nnAPC apresenta os péptidos Tirosinase₃₆₉₋₃₇₇, Tirosinase₂₀₇₋₂₁₆, gp100₂₀₉₋₂₁₇, gp100₁₅₄₋₁₆₂, MART-1₂₇₋₃₅, HER-2/neu₇₈₉₋₇₉₇, HER-2/neu₃₆₉₋₃₇₇, C-lectina₈₋₁₆, Pec60₂₀₋₂₉, e Pec60₂₅₋₃₃.
- 12. Célula apresentadora de antígenos que não ocorrem naturalmente (nnAPC), derivada de células de *Drosophila melanogaster* transfectada com ácido nucleico que expressa moléculas humanas HLA de classe I, moléculas de ligação, e moléculas co-estimuladoras, em que a referida nnAPC apresenta as seguintes dez moléculas de péptido simultaneamente, Tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇, Tirosinase₂₀₇₋₂₁₆, gp100₂₀₉₋₂₁₇, gp100₁₅₄₋₁₆₂, MART-1₂₇₋₃₅, HER-2/neu₇₈₉₋₇₉₇, HER-2/neu₃₆₉₋₃₇₇, C-lectina₈₋₁₆, Pec60₂₀₋₂₉ e Pec60₂₅₋₃₃.
- 13. Método para preparação de células apresentadoras de antígeno que não ocorre naturalmente (nnAPC) capazes de apresentar, simultaneamente, até dez moléculas de péptido, compreendendo o referido método os passos de:
 - a. preparar uma linha celular de insecto a partir de ovos de *Drosophila melanogaster*;

b. cultivar as referidas células de insecto num meio que é adequado ao cultivo de células de insecto, de um modo preferido, meio Schneider™ *Drosophila* Medium;

c. preparar um plasmídeo pRmHa-3 a partir de um vector de expressão pRmHa-1, em que o referido plasmídeo pRmHa-3 inclui um promotor de metalotioneína, sequências de consenso de resposta a metal e um gene de álcool desidrogenase portador de um sinal de poliadenilação, isolado a partir de *Drosophila melanogaster*;

d. inserir no referido plasmídeo pRmHa-3 AND complementar para as HLA A2.1, B7.1, B7.2, ICAM-1, β -2 microglobulina e LFA-3 humanas de classe I, em que A2.1 pode ser substituída por qualquer sequência de ADN humana de classe I;

e. transfectar as referidas células de insecto com um plasmídeo phshneo e o referido plasmídeo pRmHa-3 contendo ADN complementar; e

f. criar nnAPC pelo contacto das referidas células de insecto com CuSO_4 para induzir a expressão dos genes transfectados nas referidas células de insecto.

14. Método da reivindicação 13, em que a referida linha celular de insecto é preparada pelo crescimento das células durante doze dias, seleccionando as células desejadas com péptidos que são capazes de identificar as referidas células desejadas e expandindo as referidas células desejadas com OKT3 e IL-2.

15. Método da reivindicação 14, em que os referidos péptidos capazes de identificar as referidas células desejadas são tetrâmeros.
16. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que as referidas moléculas de péptido do passo (a) são seleccionadas dos péptidos possuindo uma sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID N°: 1 a 42.

Lisboa, 24 de Julho de 2008

Figura 1

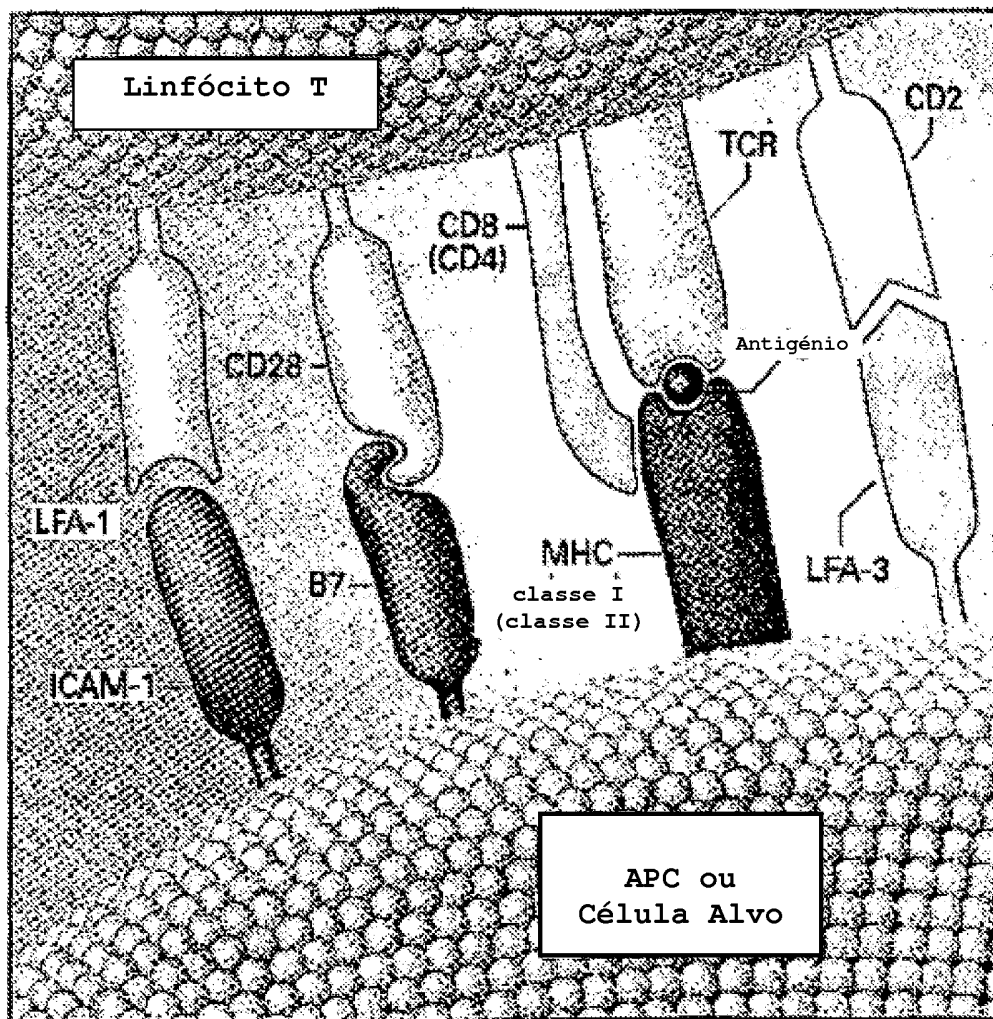
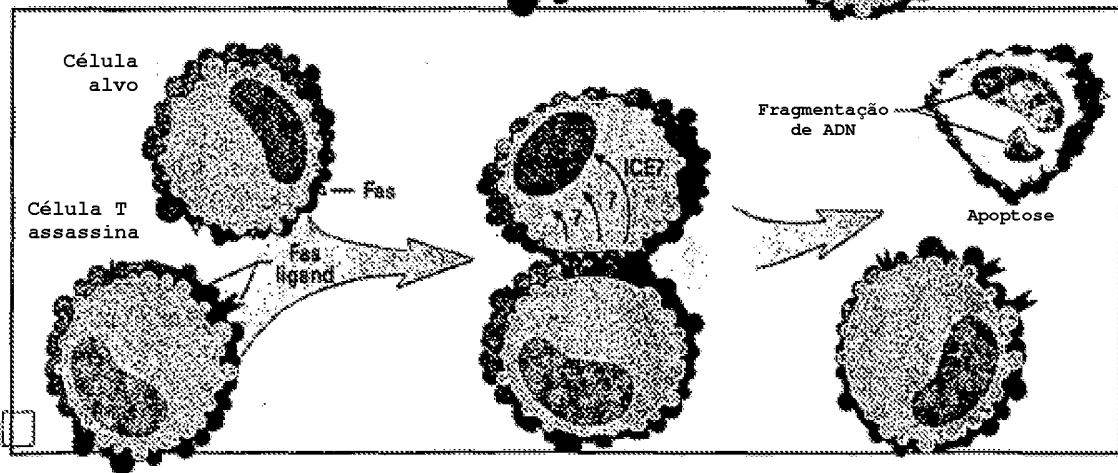
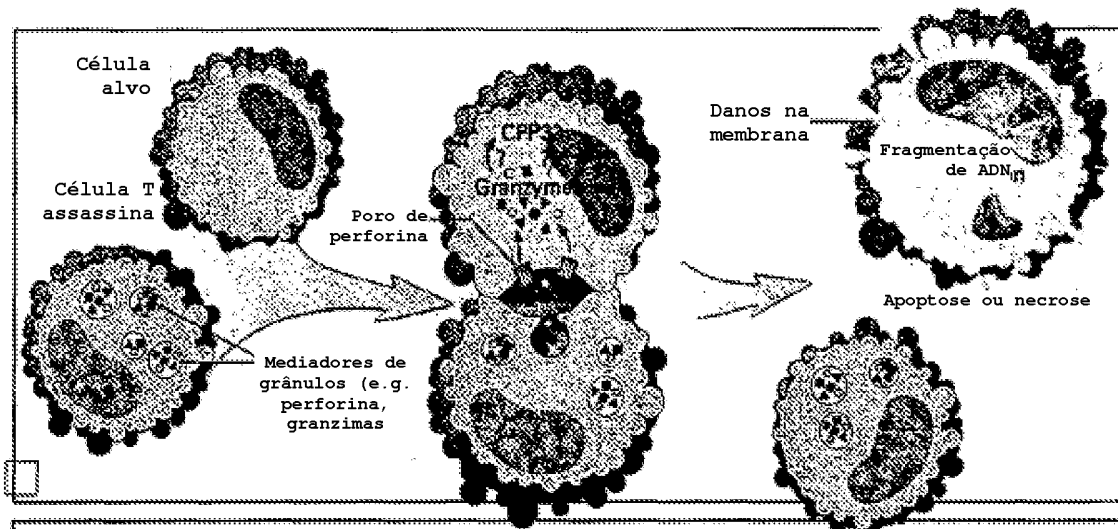


Figura 2

Painel A



Painel B

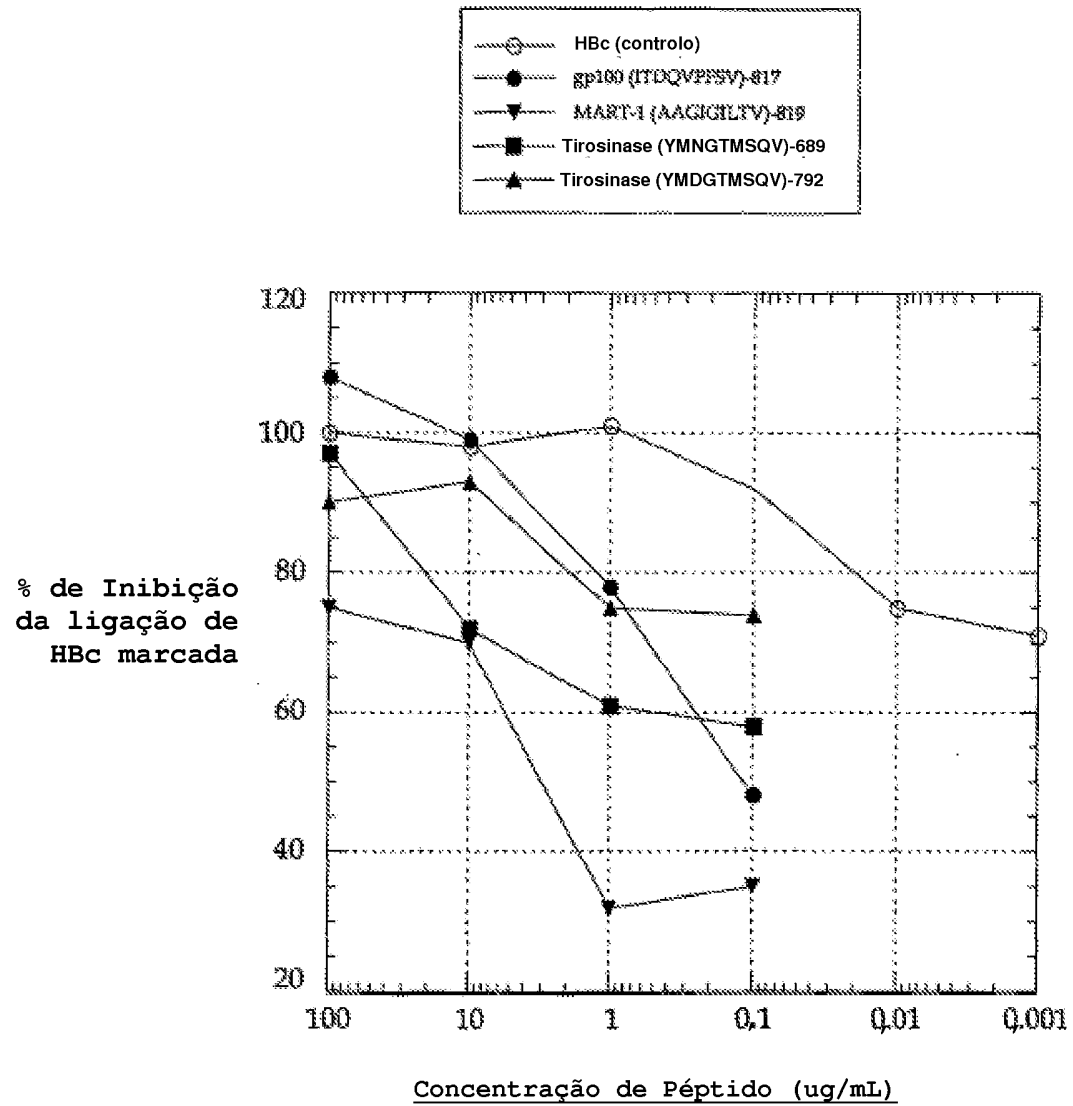
Figura 3

Figura 4
Painel A

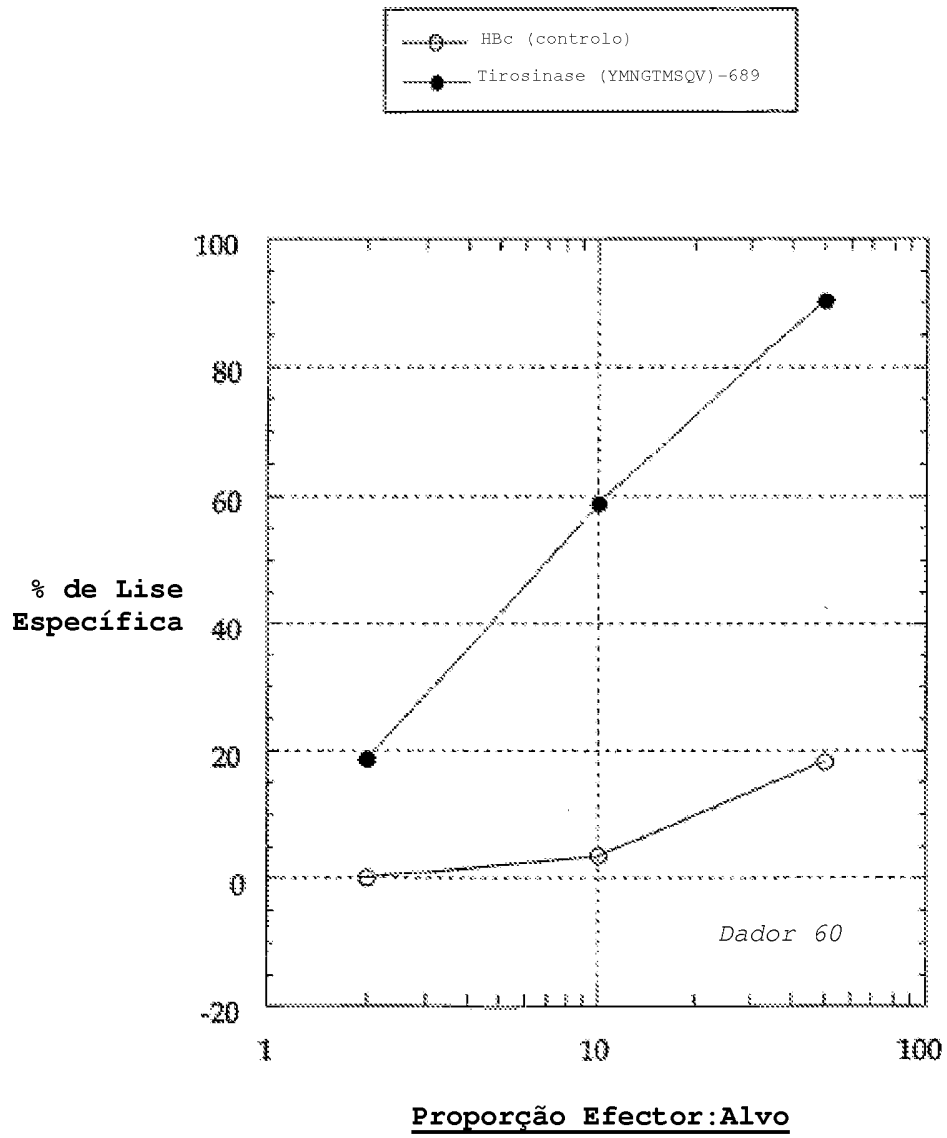


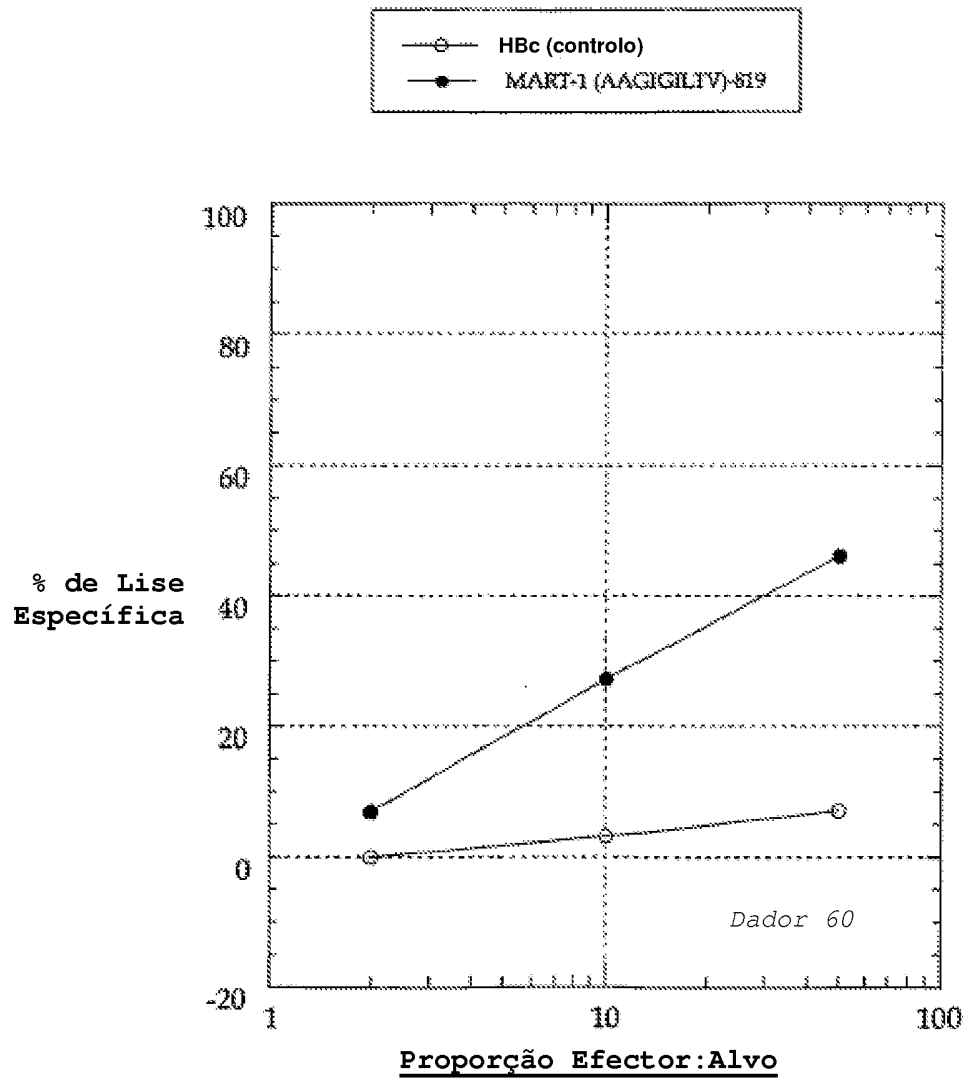
Figura 4Painel B

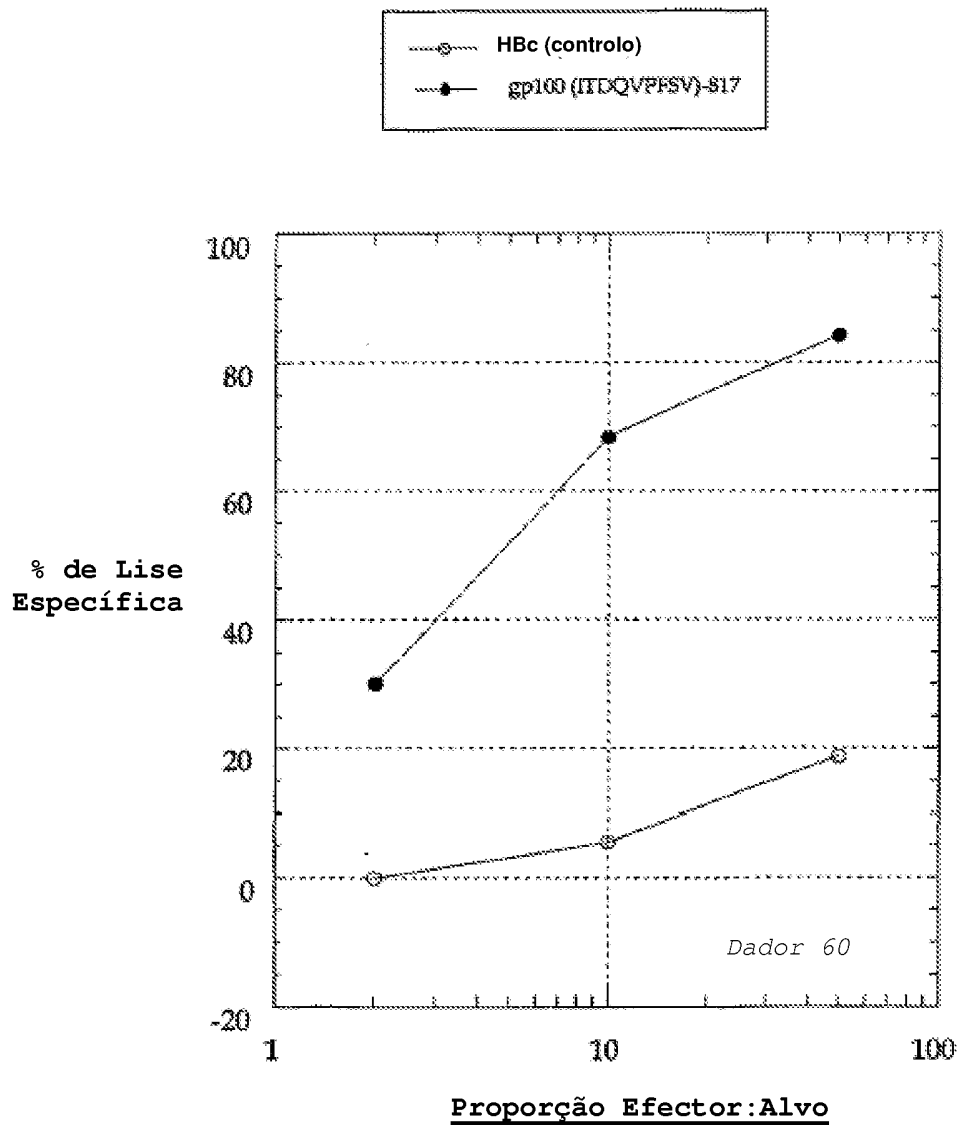
Figura 4**Painel C**

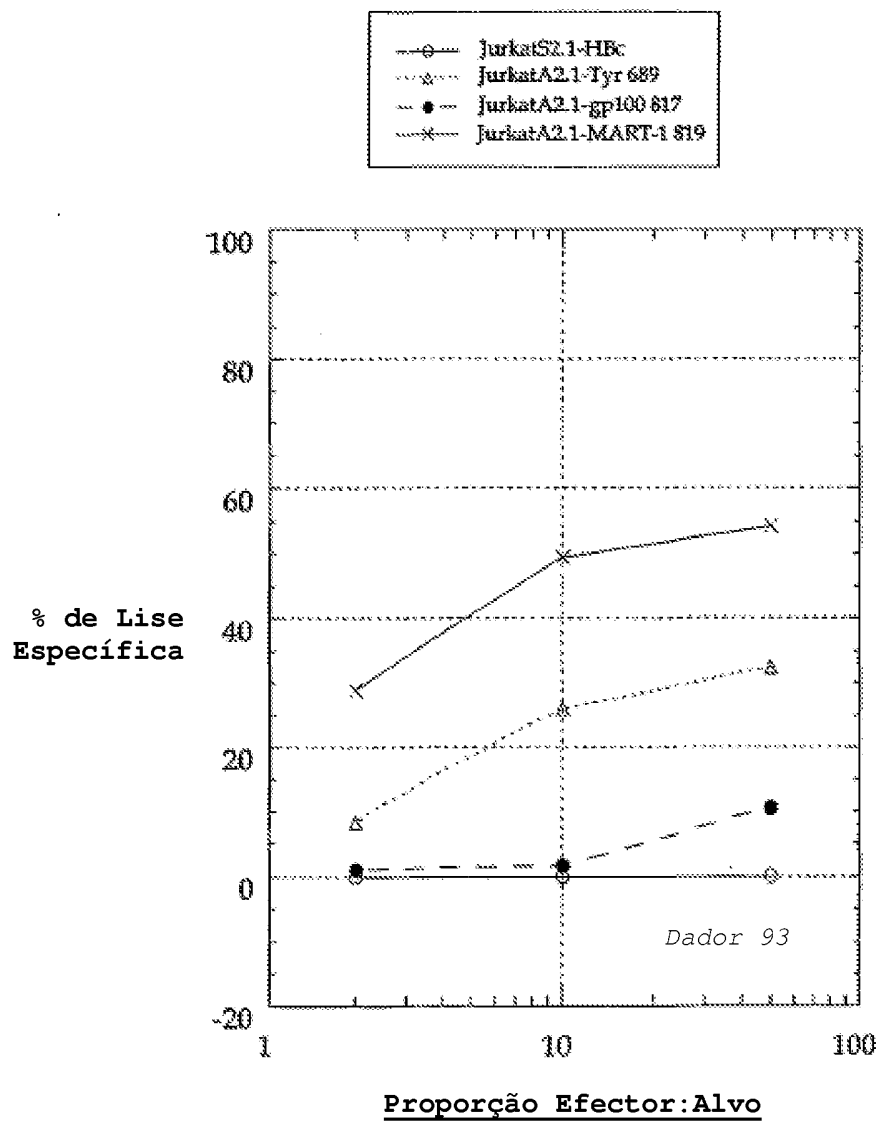
Figura 5**Painel A**

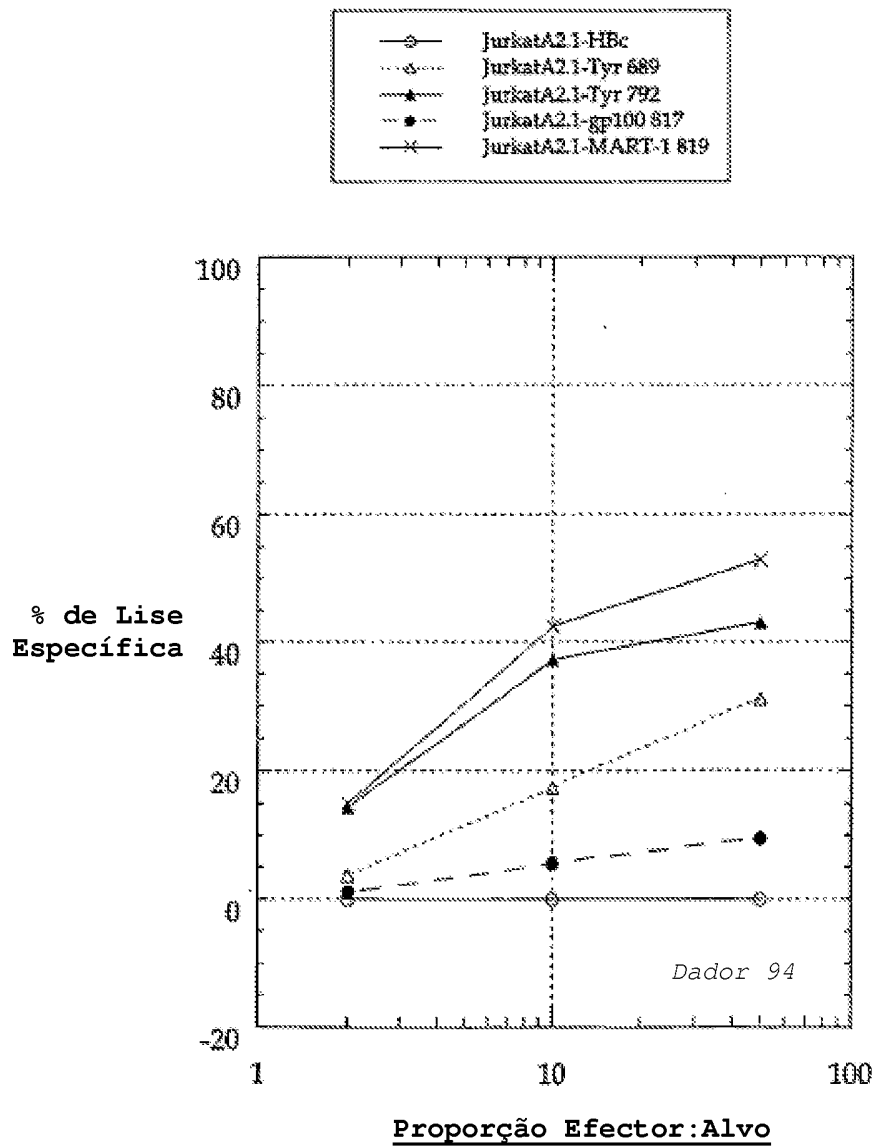
Figura 5**Painel B**

Figura 5
Painel C

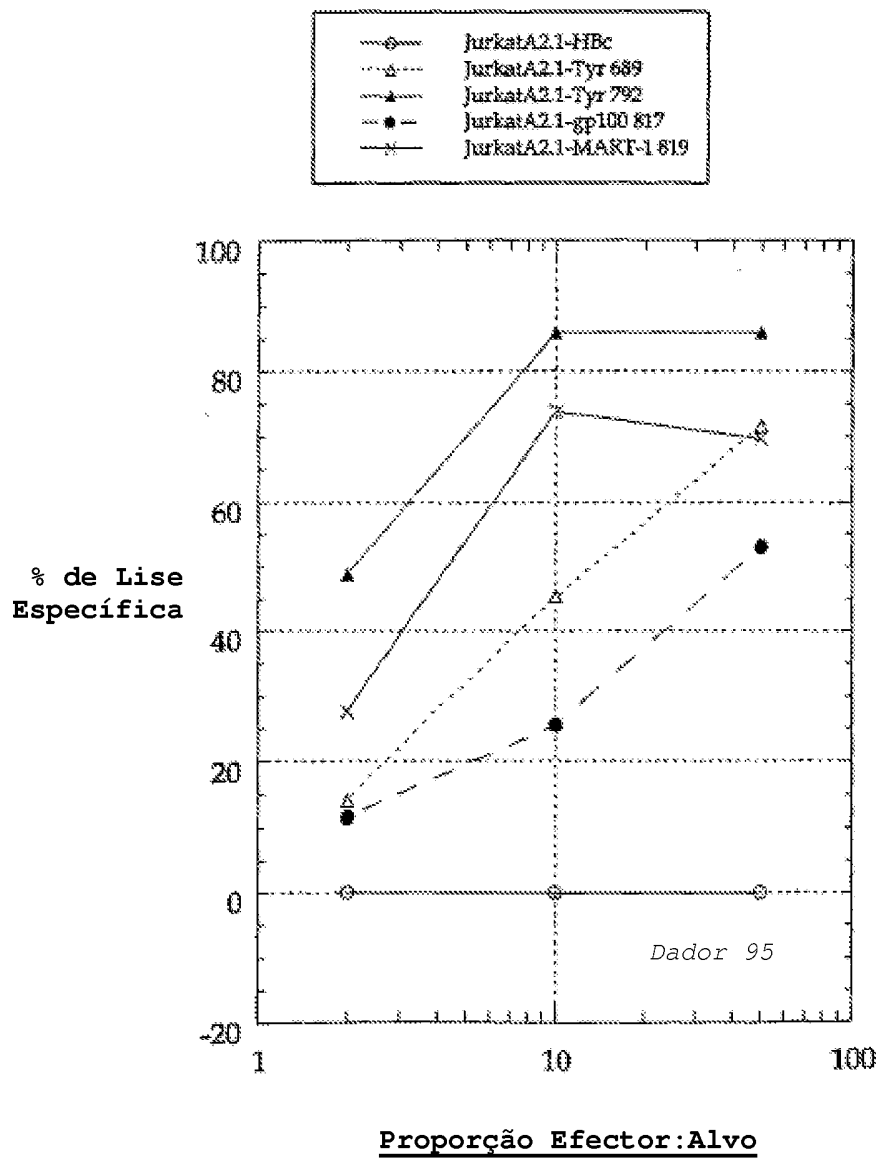


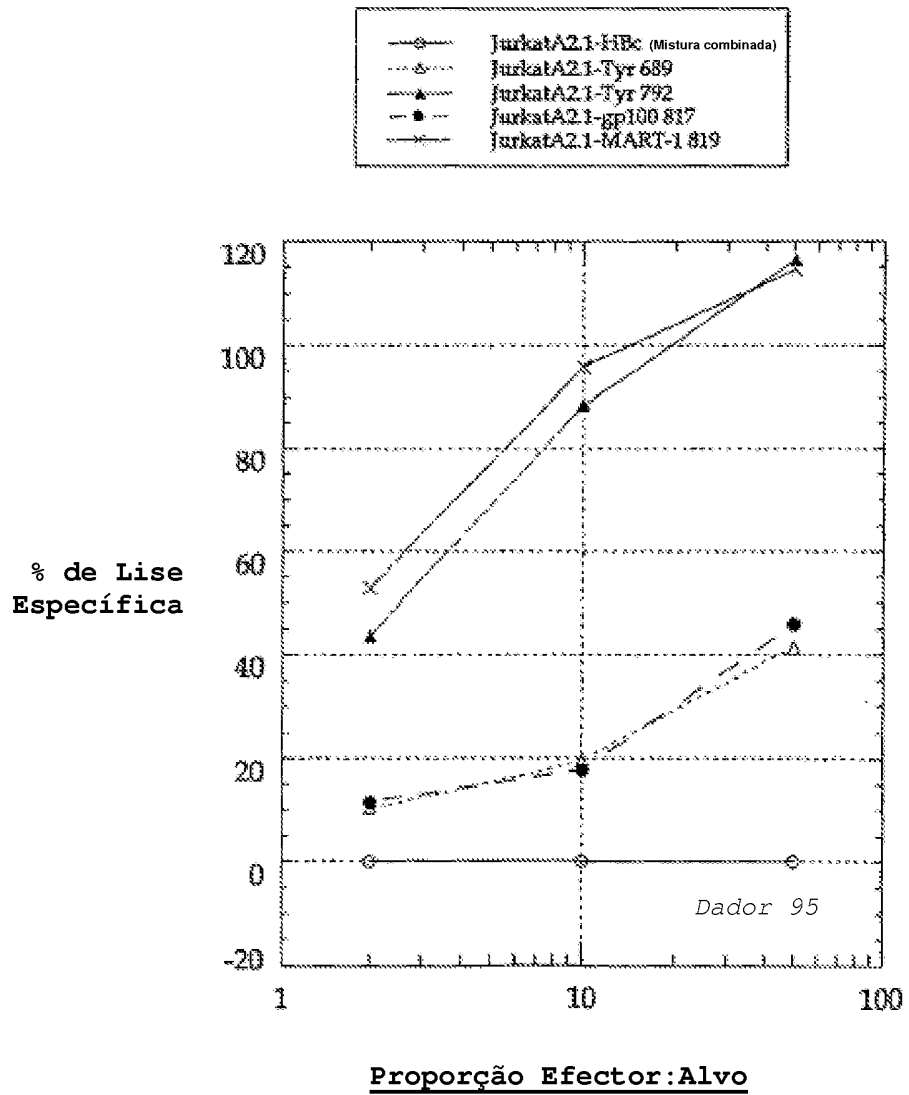
Figura 6**Painel A**

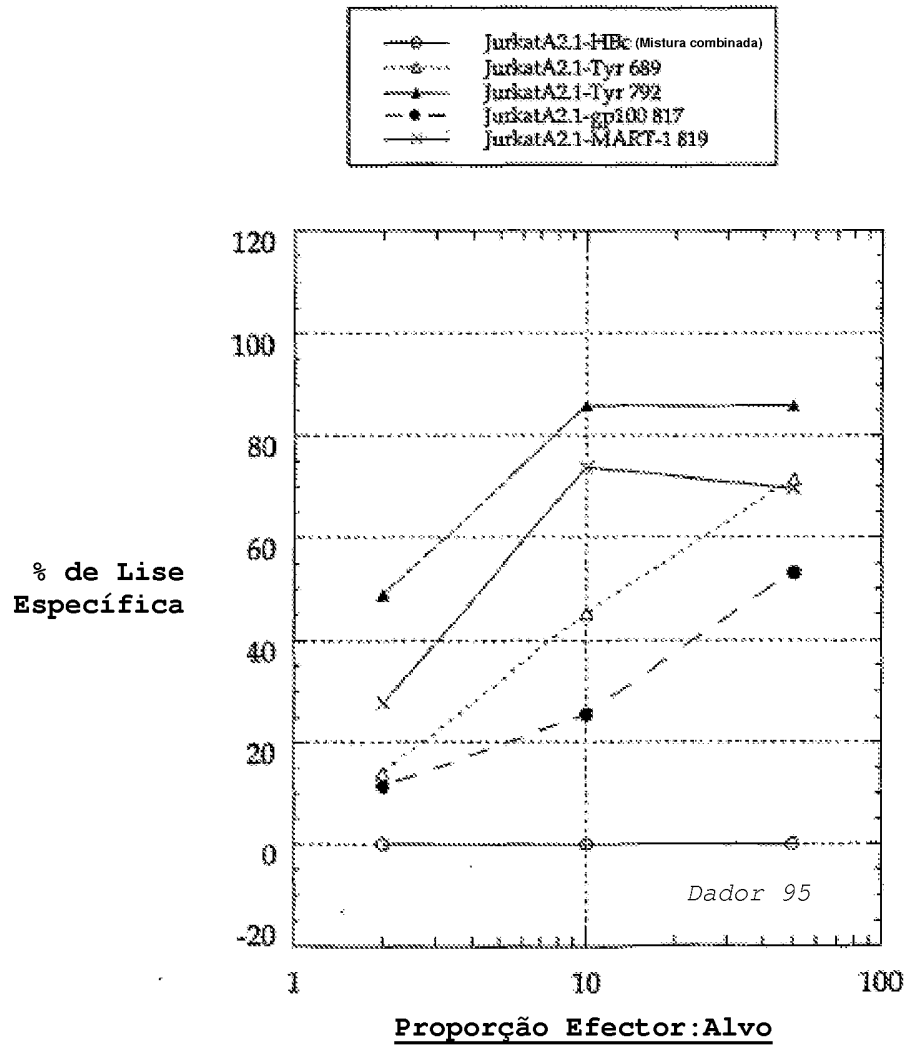
Figura 6**Painel B**

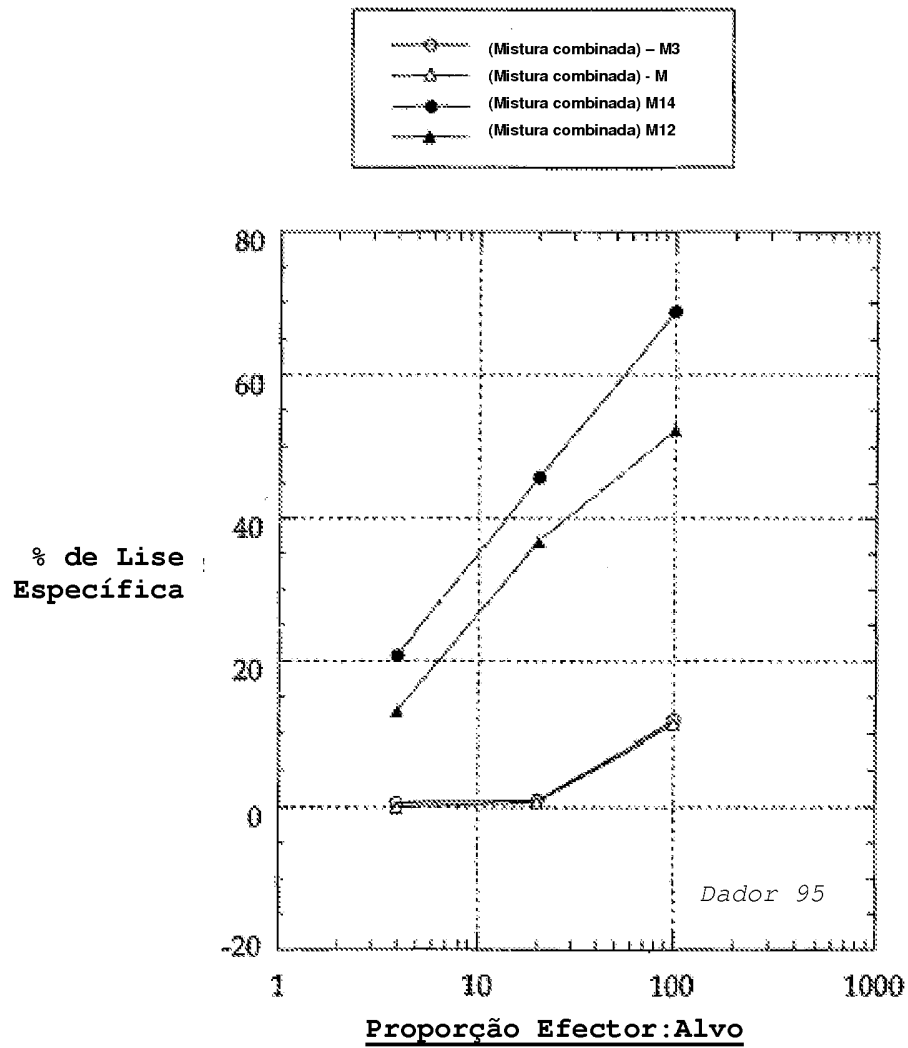
Figura 6**Painel C**

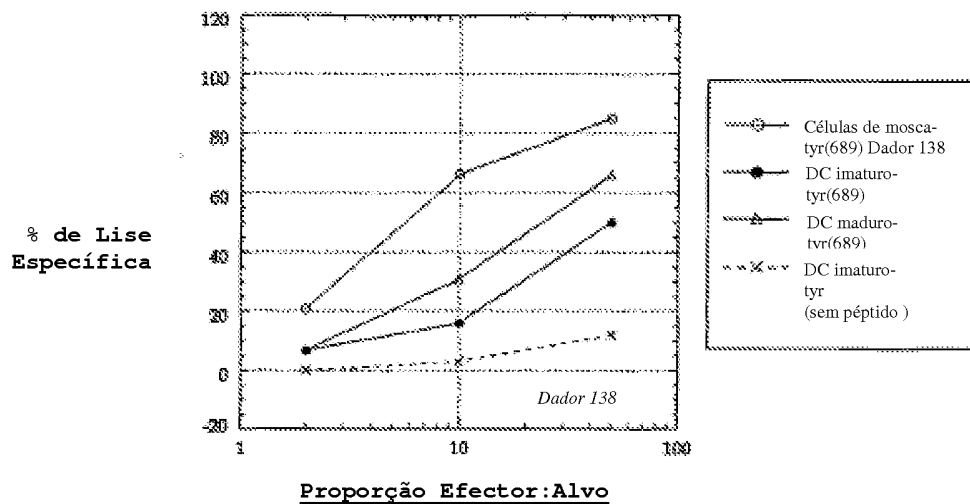
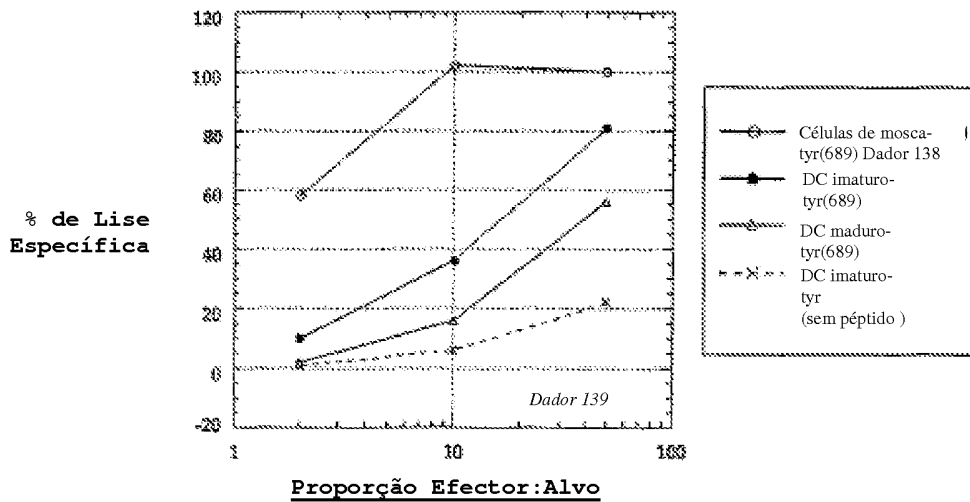
Figura 7**Painel A****Painel B**

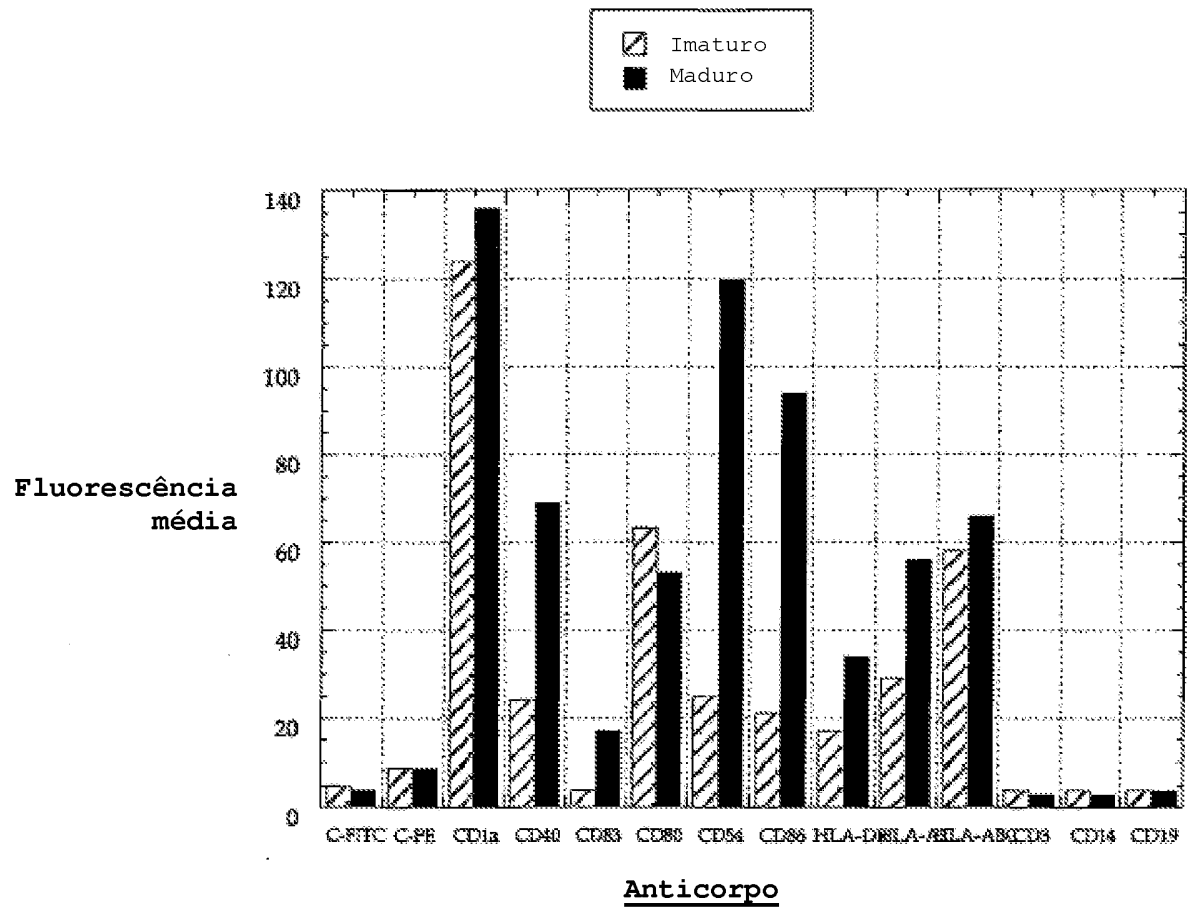
Figura 8

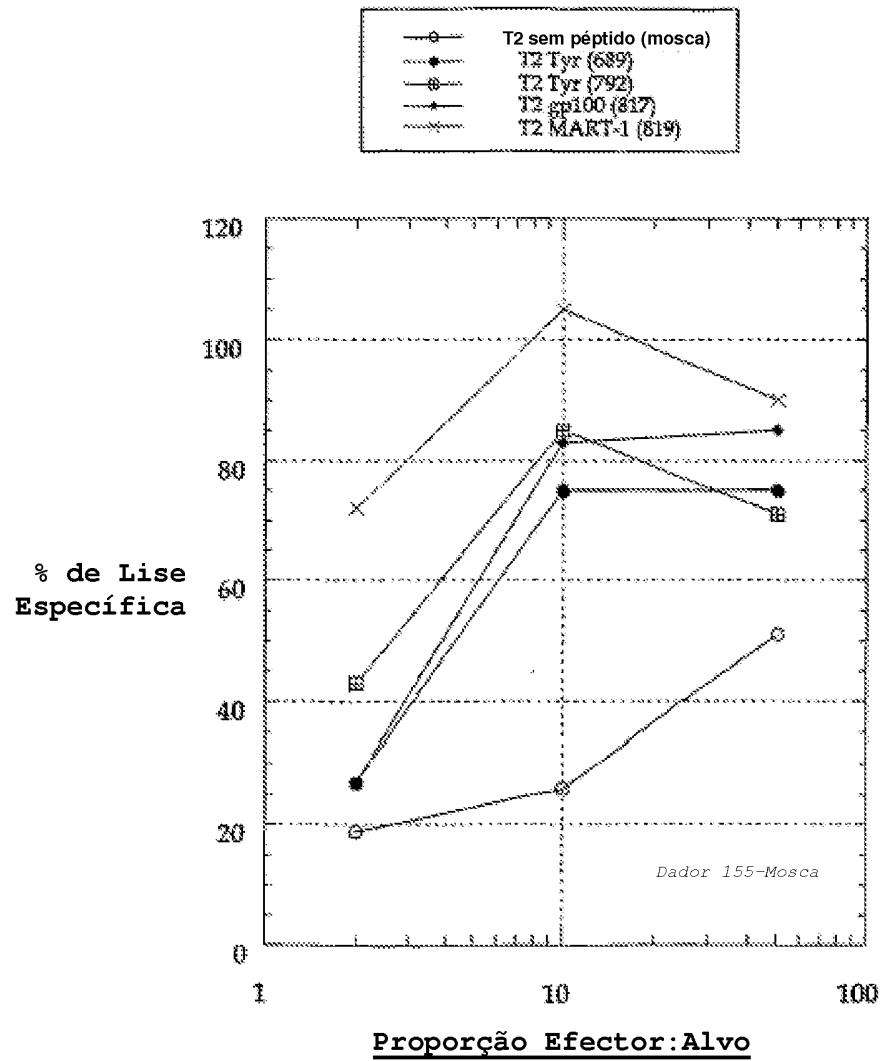
Figura 9**Painel A**

Figura 9
Painel B

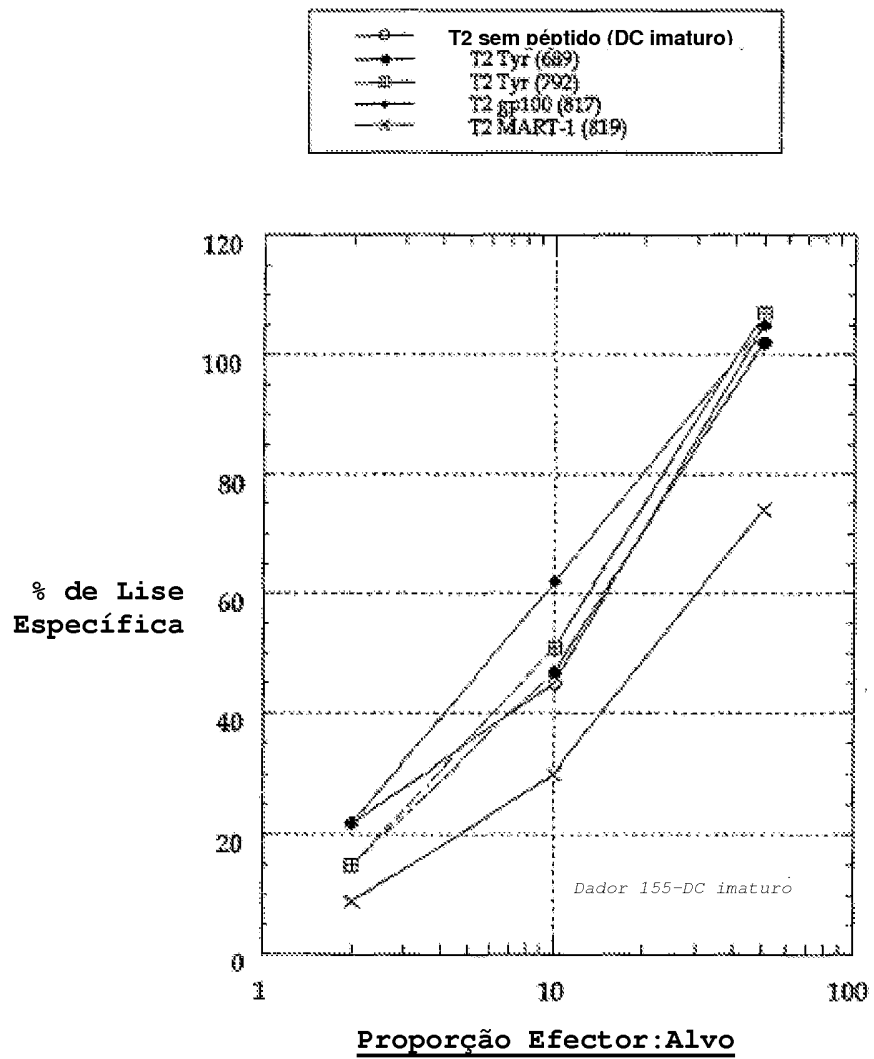


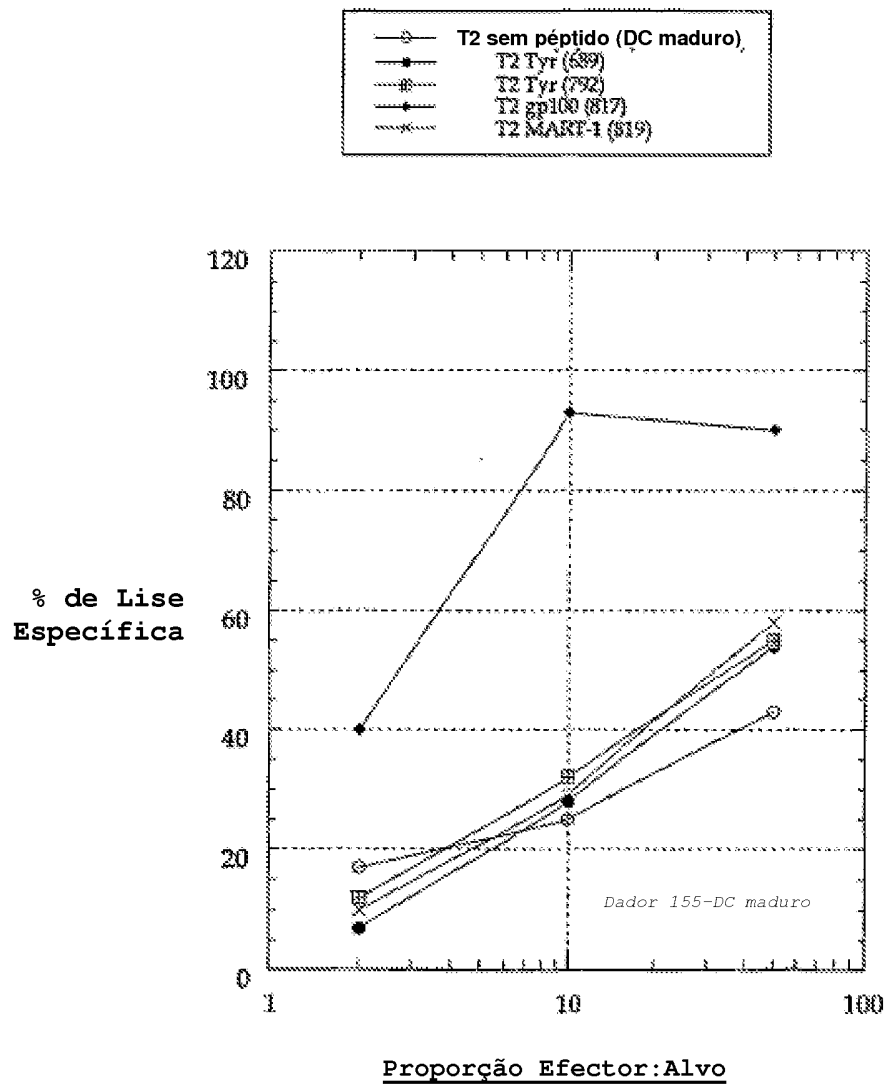
Figura 9**Painel C**

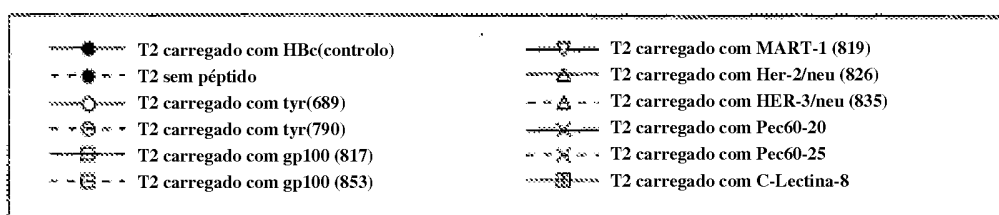
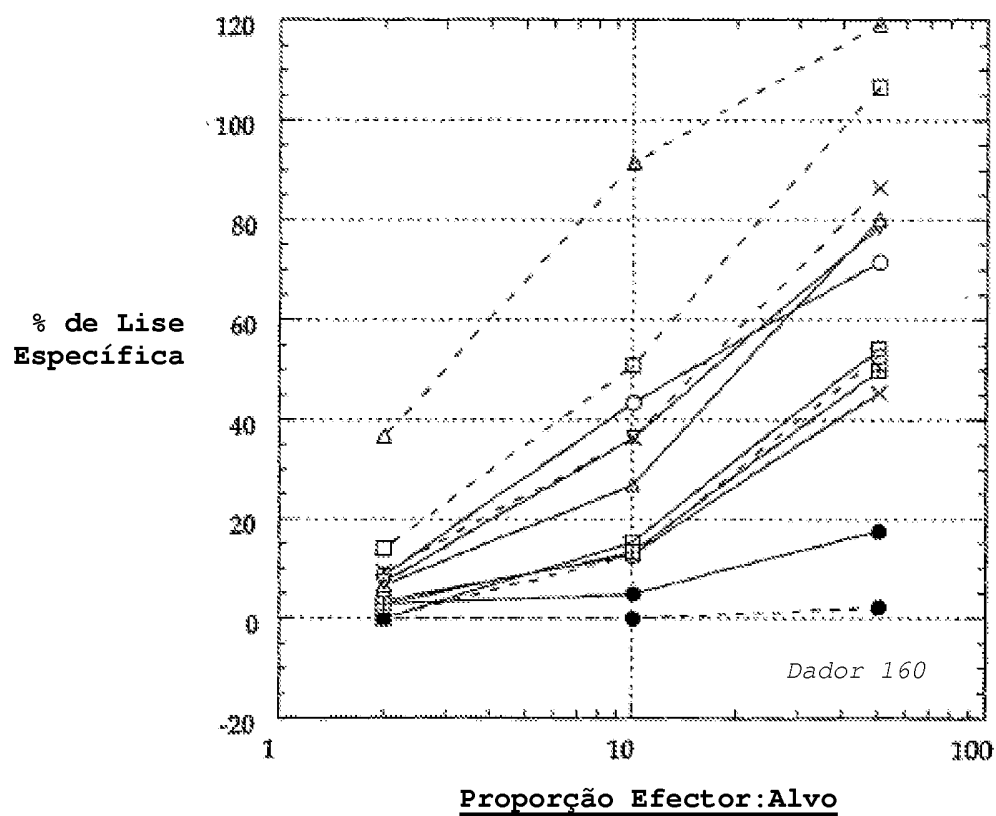
Figura 10

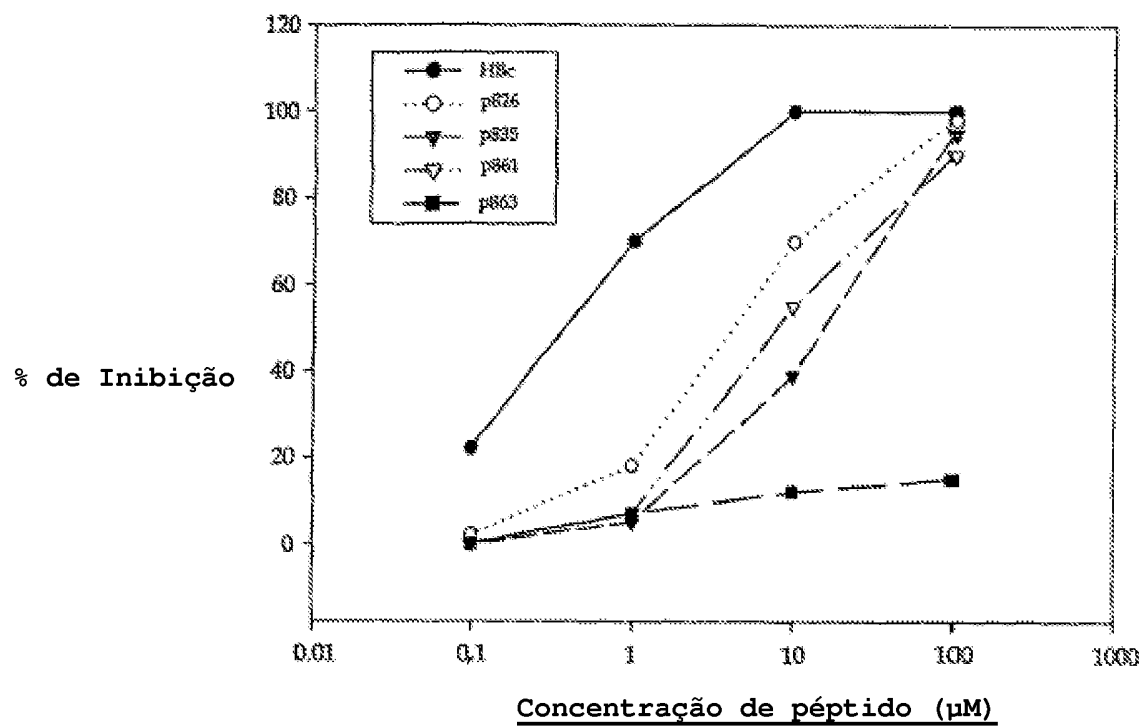
Figura 11

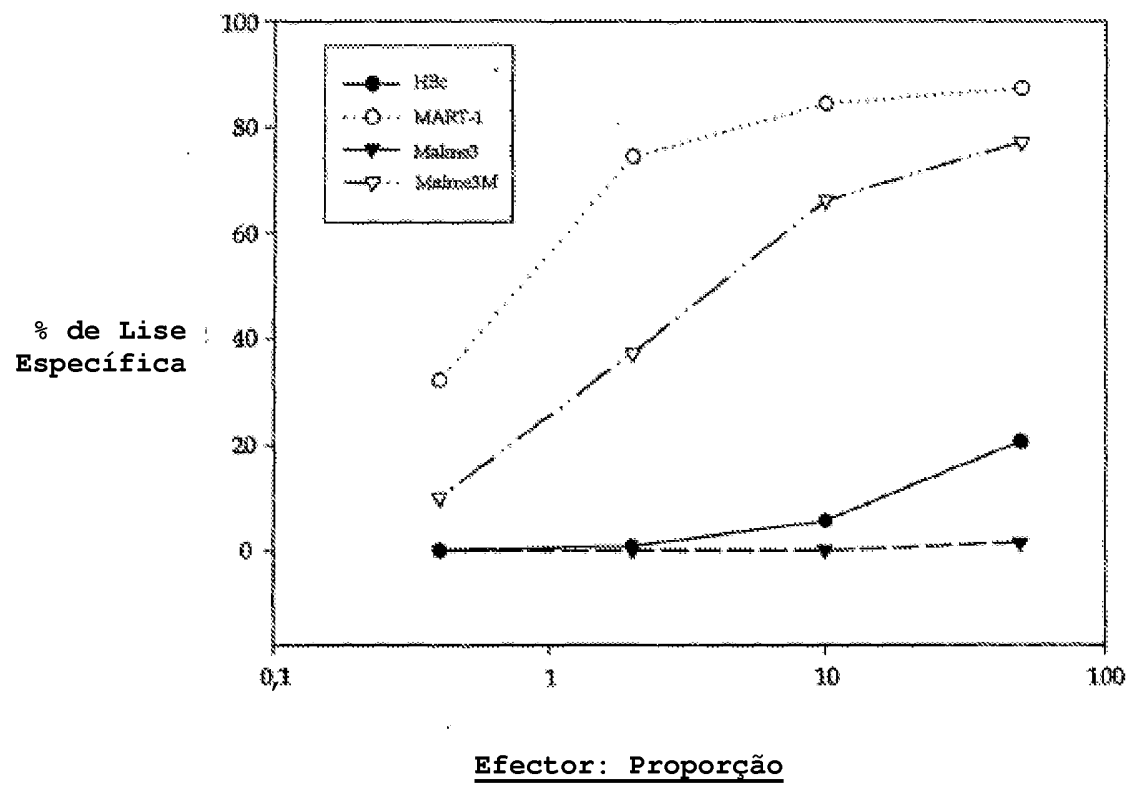
Figura 12

Figura 13

Painel A

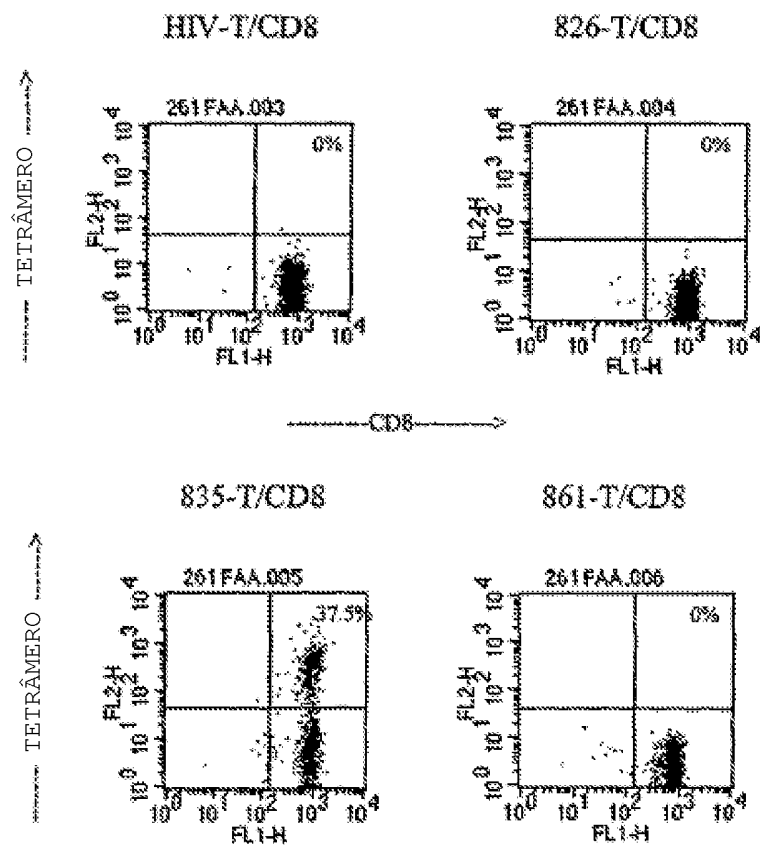


Figura 13

Painel B

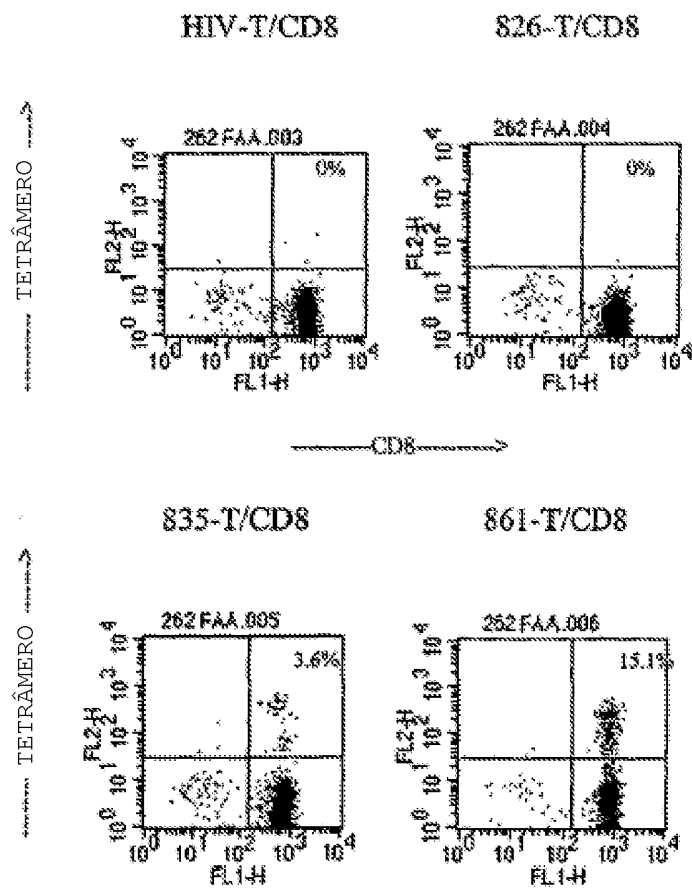


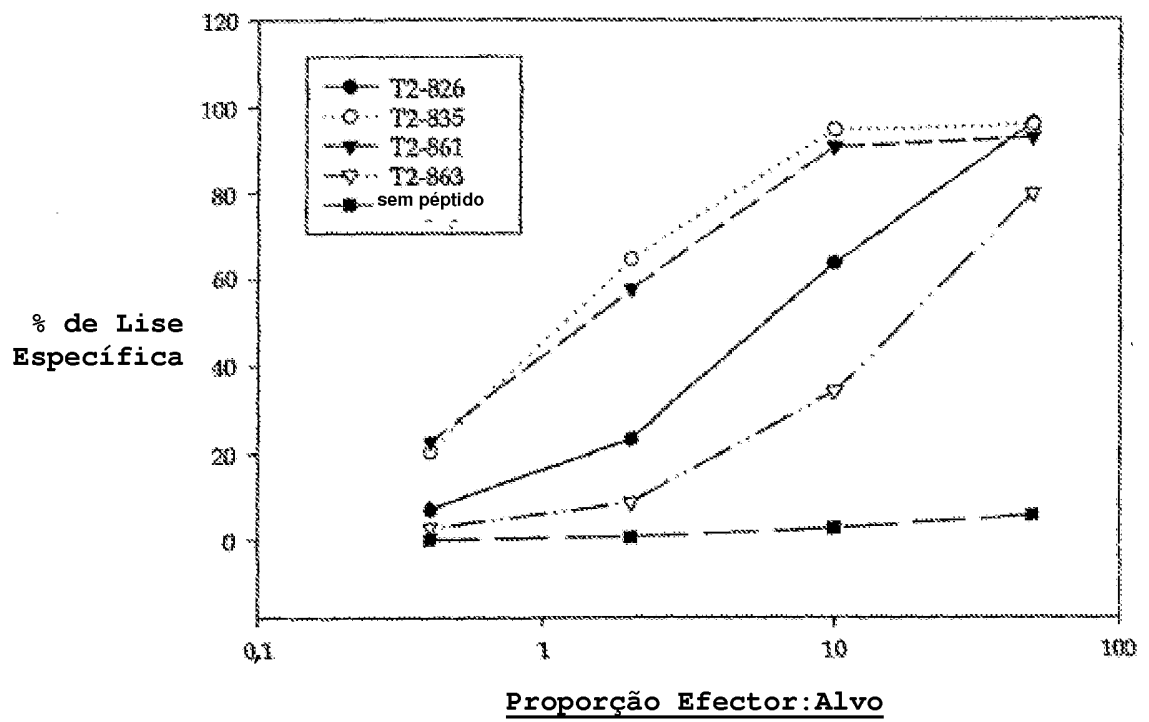
Figura 14

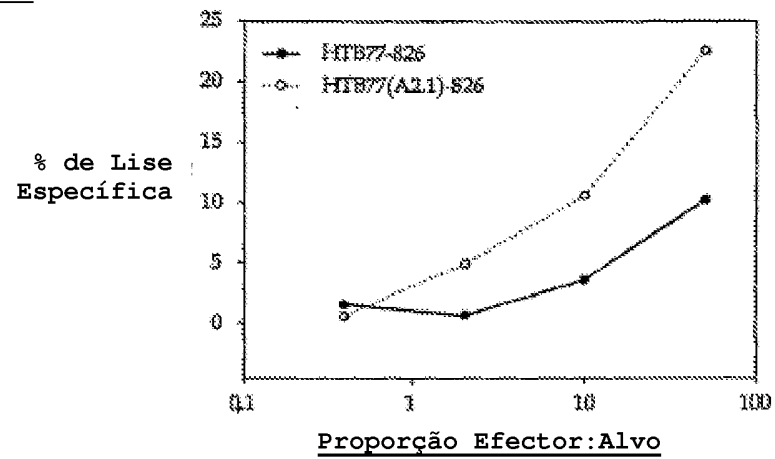
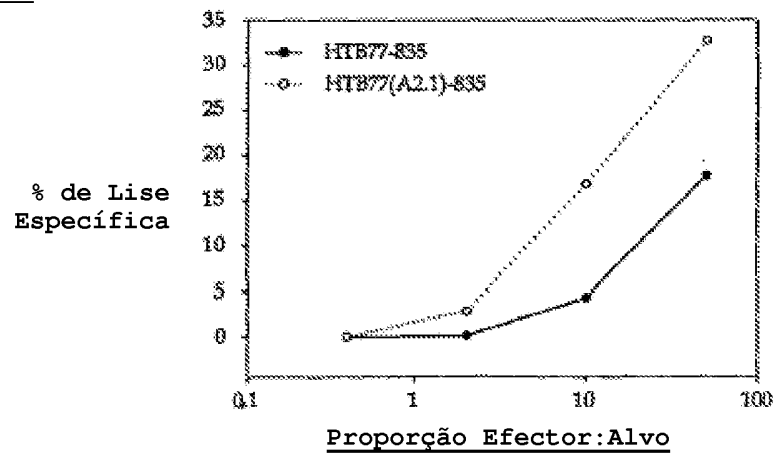
Figura 15**Painel A****Painel B**

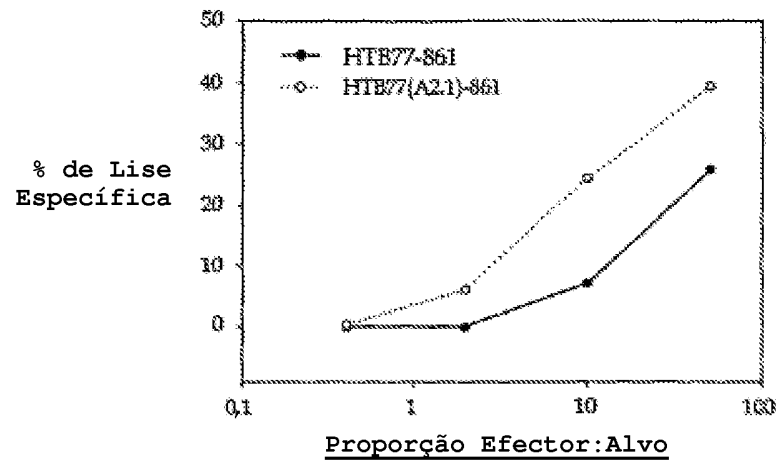
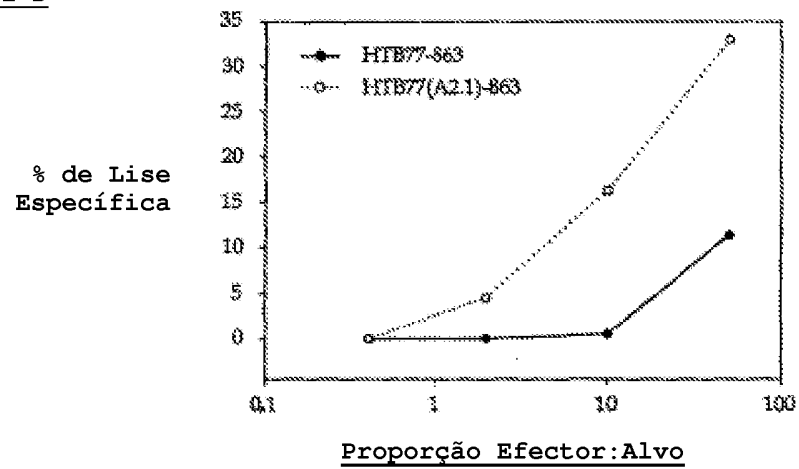
Figura 15**Painel C****Painel D**

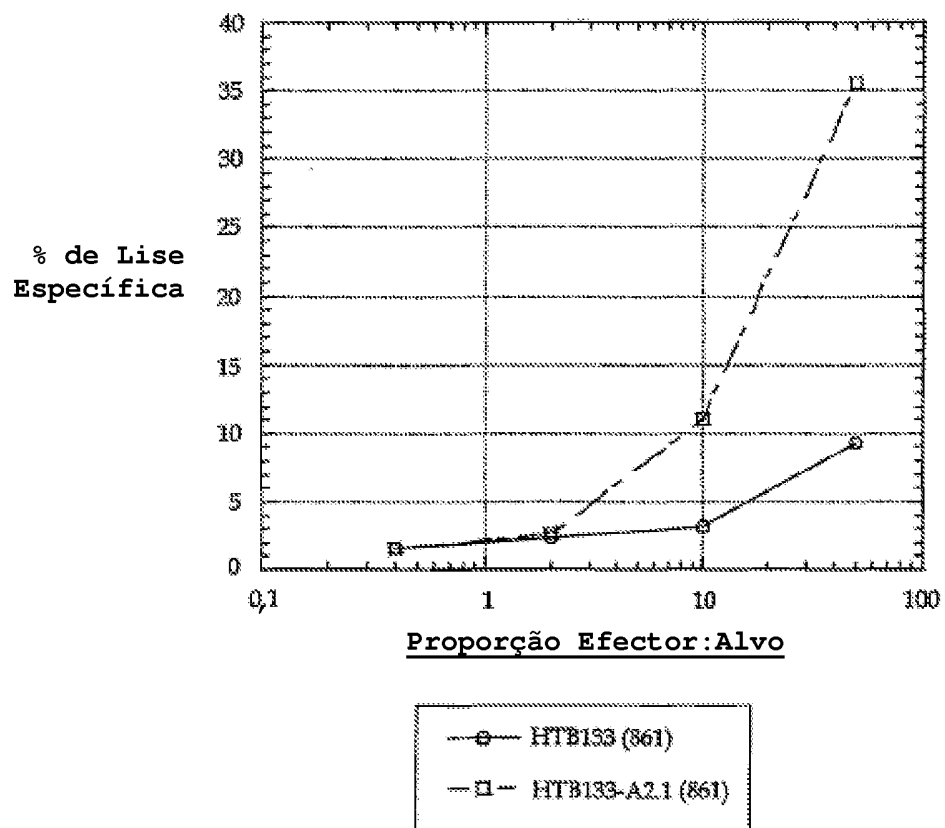
Figura 16

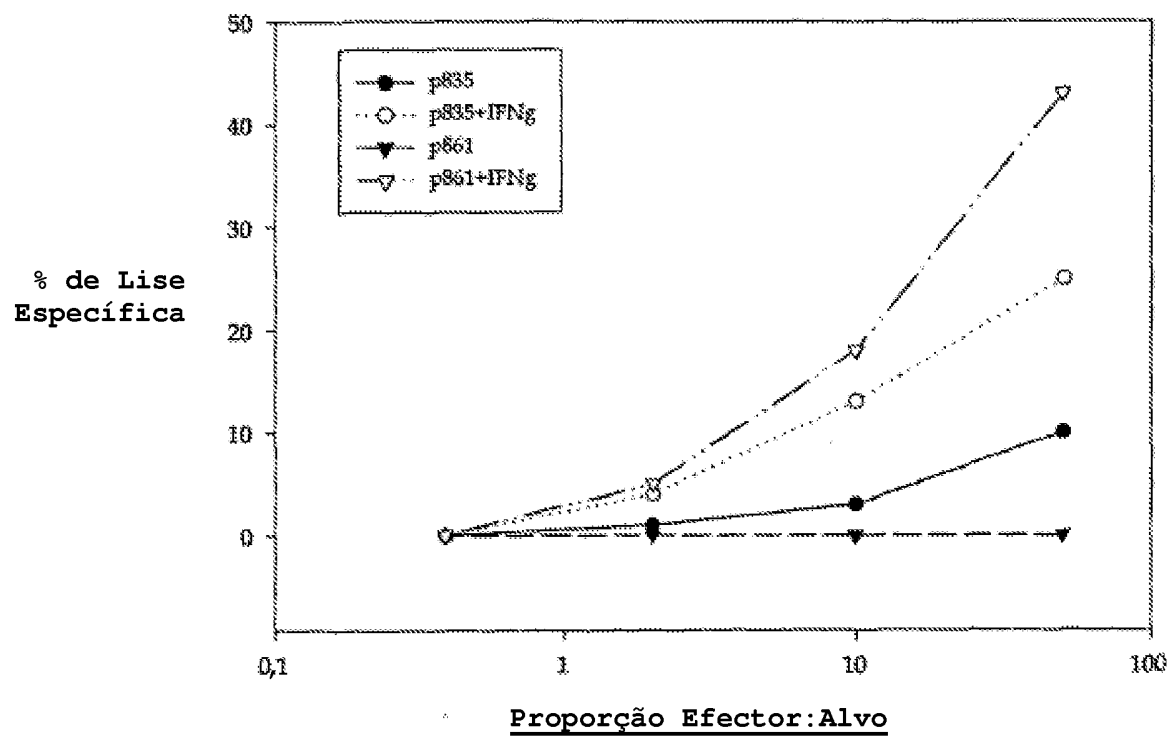
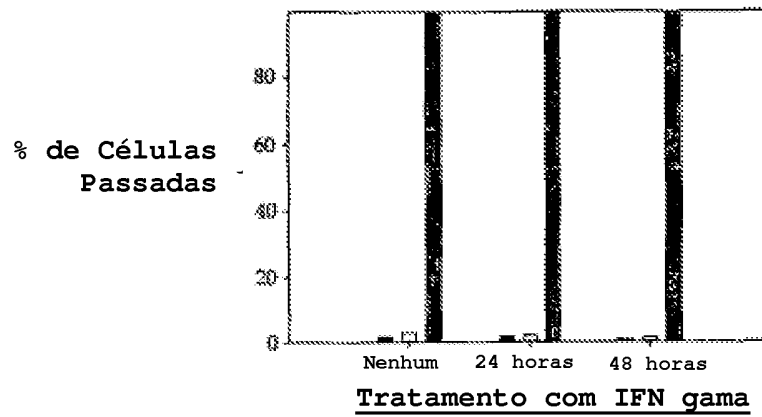
Figura 17

Figura 18

Painel A



Painel B

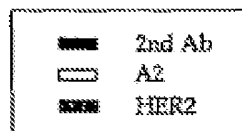
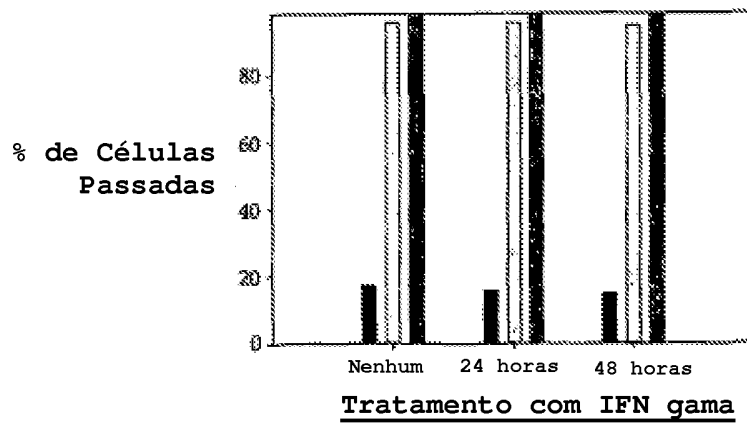


Figura 19