



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

(21) **PI0620187-3 A2**

(22) Data de Depósito: 20/12/2006
(43) Data da Publicação: 01/11/2011
(RPI 2130)



(51) *Int.Cl.:*

C12N 5/0783

A61K 39/00

C12N 5/078

(54) Título: MÉTODO PARA A EXPANSÃO DE LINFÓCITOS T AUXILIARES CD4+ E/OU LINFÓCITOS T CD8+ REATIVOS A TUMOR, LINFÓCITO-T REATIVO A TUMOR, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODOS PARA TRATAR UM INDIVÍDUO SOFRENDO DE UMA DOENÇA DE ORIGEM NEOPLÁSTICA E PARA REALIZAR A REGRESSÃO DE TUMOR EM UM INDIVÍDUO, USO DE LINFÓCITOS-T REATIVOS A TUMOR, E, KIT

(30) Prioridade Unionista: 21/12/2005 US 60/752828, 21/12/2005 DK PA 2005 01810, 21/12/2005 DK PA 2005 01810

(73) Titular(es): Sentoclone AB

(72) Inventor(es): Magnus Thörn, Ola Winqvist

(74) Procurador(es): MOMSEN, LEONARDOS & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006012304 de 20/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/071388 de 28/06/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA A EXPANSÃO DE LINFÓCITOS T AUXILIARES CD4+ E/OU LINFÓCITOS T CD8± REATIVOS A TUMOR, LINFÓCITO-T REATIVO A TUMOR, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODOS PARA TRATAR UM INDIVÍDUO SOFRENDO DE UMA DOENÇA DE ORIGEM NEOPLÁSTICA E PARA REALIZAR A REGRESSÃO DE TUMOR EM UM INDIVÍDUO, USO DE LINFÓCITOS-T REATIVOS A TUMOR, E, KIT A presente invenção descreve um método aperfeiçoado para 5expansão e ativação de linfócitos reativos a tumor, em particular linfócitos-T auxiliar CD4+ e/ou CD8+, que podem ser usados para tratar e/ou evitar 5câncer. O método fornece elevados números de linfócitos-T reativos a tumor dentro de um curto intervalo de tempo e a possibilidade de direcionar o desenvolvimento de linfócitos-T auxiliar CD4+ e/ou CD8+ para 5subpopulações específicas. O método compreende uma primeira fase de 5linfócitos-T auxiliares CD4± T e/ou CD8+ com antígeno derivado de tumor, junto com pelo menos uma substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2, para promover a sobrevivência de linfócitos-T auxiliar CD4± T e/ou CD8+; e uma segunda fase de ativar e promover o crescimento de linfócitos-T auxiliares CD4+ T e/ou CD8+, em que a segunda fase é iniciada quando o marcador da superfície de célula CD25 (ou marcador IL-2R) é regulado negativamente em linfócitos-T auxiliar CD4+ T e/ou CD8+.

“MÉTODO PARA A EXPANSÃO DE LINFÓCITOS T AUXILIARES CD4+ E/OU LINFÓCITOS T CD8+ REATIVOS A TUMOR, LINFÓCITO-T REATIVO A TUMOR, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODOS PARA TRATAR UM INDIVÍDUO SOFRENDO DE UMA DOENÇA DE ORIGEM NEOPLÁSICA E PARA REALIZAR A REGRESSÃO DE TUMOR EM UM INDIVÍDUO, USO DE LINFÓCITOS-T REATIVOS A TUMOR, E, KIT”

Campo da Invenção

A invenção refere-se a um método aperfeiçoado para expansão e ativação de linfócitos reativos a tumor, em particular linfócitos-T auxiliar CD4+ e/ou CD8+. Os linfócitos-T não são linfócitos CD4+ CD25^{Hi}, isto é, a presente invenção não cobre linfócitos-T reguladores. Os linfócitos podem ser usados para tratar e/ou evitar câncer.

Fundamentos da Invenção

De acordo com a hipótese de vigilância imune, o sistema imune é continuamente sensibilizado contra o desenvolvimento de tumores, em que a evidência experimental apóia fortemente esta noção. A identificação de antígenos de tumor específicos criou novas possibilidades para imunoterapia de tumor e muitas abordagens imunoterapêuticas estão agora sendo transladadas para dentro de experimentos clínicos. Entre estes, a transferência adotiva de linfócitos específicos de antígeno de tumor parece particularmente promissora. Estas tentativas têm, até agora, sido usualmente baseados em células mononucleares do sangue periférico ou linfócitos de infiltração de tumor (TIL), separados de espécimes de tumor recente. Nos experimentos recentes, o tratamento de pacientes com melanoma maligno com transferência autóloga de TILs expandidos, taxas de respostas objetivas de até 51% têm sido relatadas. As células TIL são poucas, elas são freqüentemente não-responsivas (anérgicas) devido a mecanismos imunossupressivos dos longos períodos de criação do tumor para que ocorram

expansões (diversos meses). Além disso, os protocolos têm sido dirigidos à expansão das células T citotóxicas CD8⁺ e as células têm sido reintroduzidas nos pacientes pré-condicionadas com quimioterapia e, além disso, os pacientes têm sido tratados com altas doses de interleucina-2, para prover a sobrevivência das células T CD8⁺.

Descrição da invenção

Os presentes inventores mostraram anteriormente que a ativação das células T não afetadas pode ocorrer dentro do microambiente altamente especializado dos órgãos linfóides secundários, tais como o linfonodo sentinela. Em outras palavras, o nodo sentinela pode ser considerado como o sítio primário para o sistema imune encontrar antígenos tumorais.

Os inventores verificaram anteriormente um método geral para expansão de linfócitos-T reativos a tumor dos linfonodos sentinela, mostrando que é possível cultivar linfócitos-T obtidos de linfonodos sentinela, a fim de obter-se uma cultura de linfócitos-T reativos a tumor. O linfócitos-T reativos a tumor podem ser usados para tratar câncer, pela administração de uma quantidade eficaz de linfócitos-T reativos a tumor no paciente de que os nodos sentinela foram removidos.

O sucesso de um tratamento de câncer, compreendendo a administração de linfócitos-T reativos a tumor, é determinado por fatores tais como, p. ex., a quantidade de linfócitos-T reativos a tumor obtida após a etapa de expansão, isto é, a quantidade de linfócitos-T reativos a tumor disponível para infusão no paciente, o tempo requerido para obter-se uma quantidade eficaz de linfócitos-T reativos a tumor e a concentração e proporção de subpopulações de linfócitos-T reativos a tumor, obtidas pelo método de expansão.

Portanto, a presente invenção descreve um método aperfeiçoado para expansão de linfócitos-T auxiliar CD4⁺ e/ou CD8⁺, em que

condições de cultura específicas foram determinadas e otimizadas e em que marcadores específicos nos linfócitos T- e no meio de cultura são monitorados por toda a fase de expansão, a fim de obter-se elevados números de linfócitos-T reativos a tumor no mais curto possível intervalo de tempo.

5 Além disso, a invenção ao mesmo tempo fornece um método para dirigir o desenvolvimento de linfócitos-T auxiliares CD4⁺ e/ou CD8⁺ para subpopulações específicas. Os linfócitos-T não são linfócitos CD4⁺ CD25^{Hi}, isto é, a presente invenção não abrange os linfócitos-T reguladores.

10 Os linfócitos T CD4⁺CD25^{Hi}, expressando o fator de transcrição FoxP3, são considerados células T reguladoras (Treg). As Tregs têm a propriedade de regular as células auxiliares T e citotóxicas T, pela inibição da ativação e proliferação e, além disso, as Treg inibem a produção e liberação de citocinas Th1 úteis, tais como IFN-gama. Assim, o método apresentado aqui é desenvolvido a fim de promover a expansão das células

15 auxiliares T e Das células T citotóxicas e evitar a expansão das células Treg.

Os linfócitos-T reativos a tumor, muitíssimo freqüentemente gerados pelo presente método, são linfócitos-T auxiliares CD4⁺. Um dos objetivos do presente método de expansão é, em alguns aspectos, imitar o trajeto natural do sistema imune do próprio paciente e em um certo grau

20 deixar os componentes do sistema imune do paciente determinar se, em primeiro lugar, os linfócitos auxiliares CD4⁺ ou CD8⁺ são gerados, dependendo de se o antígeno é apresentado por MCHI ou MCHII. Na maioria dos casos, os antígenos serão apresentados pela molécula MCH classe II, resultando na geração de linfócitos-T auxiliares CD4⁺. Entretanto, em alguns

25 casos, os linfócitos-T CD8⁺ são gerados. Se os linfócitos-T auxiliares CD4⁺ forem gerados, eles serão mais expandidos, como descrito aqui, entretanto, o método pode também ser usado para expandir células CD8⁺. Os inventores verificaram que um método de expansão, compreendendo duas diferentes fases, são especialmente úteis para obter-se um elevado número de linfócitos-

T auxiliares CD4+ e/ou CD8+ em um intervalo de tempo relativamente curto, as duas fases sendo

i) uma primeira fase de estimular os linfócitos-T reativos a tumor com antígeno derivado de tumor, junto com pelo menos uma substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2, para promover a sobrevivência dos linfócitos-T reativos a tumor e

ii) uma segunda fase de ativar e promover o crescimento de linfócitos-T reativos a tumor, em que a segunda fase ii) é iniciada quando o marcador de superfície de célula CD25 (marcador IL-2R) é regulado negativamente nos linfócitos-T.

Este método de expansão pode também ser realizado utilizando-se monócitos isolados do paciente como células específicas de antígeno. Os monócitos serão administrados ao paciente quando diferenciadas em células dendríticas pelo uso de citocinas de maturação, tais como IL-4, GM-CSF e IL-3, seguido pela ativação das células dendríticas pela adição de agências estimuladoras do receptor semelhante a Toll, tais como lipopolissacarídeo. O uso de células dendríticas ativadas maduras como a população específica de antígeno pode promover e aumentar a expansão das células auxiliares T e células T citotóxicas T.

Definições

Pela expressão “linfócitos-T reativos a tumor” pretende-se significar linfócitos-T contendo um receptor de célula T específico para e reconhecendo um antígeno de tumor.

Pela expressão “células auxiliares T” pretende-se significar linfócitos-T que promovem respostas imune adaptativas, quando ativadas.

Pela expressão “células Th” pretende-se significar células auxiliares T, que promovem as respostas imune mediadas por célula quando ativadas, utilizando-se citocinas tais como IFN-gama.

Pela expressão “células Th2” pretende-se significar células

auxiliares T promovendo respostas imunes humorais quando ativadas, utilizando-se citocinas tais como IL-4.

Pela expressão “linfócitos-T auxiliares CD4+” pretende-se significar linfócitos-T que expressam CD4, porém não o fator de transcrição FoxP3.

Pela expressão “linfócitos-T CD8+” pretende-se significar linfócitos-T que expressam CD8.

Pela expressão “linfócito-T regulador” pretende-se significar linfócitos-T que suprimem as respostas imunes adaptativas, expressando o fator de transcrição FoxP3.

Pela expressão “ativação específica” de linfócitos-T pretende-se significar ativação específica de antígeno e mediada por receptor de célula-T restringida por MHC. Ao contrário, a expressão “ativação inespecífica” de linfócitos-T é destinada a significar uma ativação geral de todas as células-T, independente da especificidade do receptor de célula-T.

A expressão “antígeno derivado de tumor” pretende cobrir células tumorais, um homogeneizado de um tumor, homogeneizado este podendo ser desnaturado, ou proteínas de tumor, polipeptídeos ou peptídeos, p. ex., na forma de proteína, polipeptídeo ou peptídeo purificado, natural, sintético e/ou recombinante. O antígeno derivado de tumor pode ser moléculas intactas, seus fragmentos ou multímeros ou agregados de moléculas intactas e/ou fragmentos. Exemplos de polipeptídeos e peptídeos adequados são aqueles que compreendem de cerca de 5 a cerca de 30 aminoácidos, tais como, p. ex., de cerca de 10 a 25 aminoácidos, de cerca de 10 a 20 aminoácidos ou de cerca de 12 a 18 aminoácidos. Se forem usados peptídeos, uma concentração molar na cultura de cerca de 0,1 a cerca de 5,0 μM , tal como, p. ex., de cerca de 0,1 a cerca de 4,0 μM , de cerca de 0,2 a cerca de 3,0 μM , de cerca de 0,3 a cerca de 2,0 μM ou de cerca de 0,3 a cerca de 1,0 μM , pode ser usada. O antígeno derivado de tumor pode ser autólogo

ou heterólogo, isto é, originar-se do paciente a ser tratado ou ser obtido de outro indivíduo sofrendo de câncer. Nos presentes Exemplos, os inventores utilizam um extrato de tumor desnaturado autólogo. Entretanto, como mencionado acima, outras fontes do antígeno derivado de tumor podem também ser exeqüíveis para uso em um método de acordo com a presente invenção.

Pela expressão “dia 1 da primeira fase” ou, p. ex., “dia 5 da segunda fase” é para ser entendido o seguinte: O dia em que os linfócitos são colhidos é indicado dia 0 (zero). O dia 1 da primeira fase é definido como o dia em que a expansão é iniciada pela adição de pelo menos uma substância tendo atividade agonista com respeito ao receptor IL-2 e pode ser antígeno de meio de cultura e/ou derivado de tumor. A fase de expansão i) pode ser iniciada no dia 0 (zero) ou até 2 dias após colheita dos linfócitos. O dia em que a segunda fase é iniciada pela adição de antígeno derivado de tumor é por todo o texto descrito como “dia 1 da segunda fase”.

A expressão “linfonodo sentinela” é destinada a significar o(s) primeiro(s) linfonodo(s) a receber drenagem linfática de um tumor. A expressão “linfonodo metinela” refere-se ao(s) primeiro(s) linfonodo(s) a receber drenagem linfática de uma metástase.

Fase i)

A finalidade da primeira fase i) é obter uma cultura compreendendo uma proporção substancialmente elevada de linfócitos-T auxiliares CD4+ e/ou CD8+. A primeira fase é para ser considerada uma “fase de enfermagem”, em que os linfócitos-T reativos a tumor são trazidos para sobreviver e dividirem-se. Dependendo da fonte dos linfócitos-T (material de partida para o método de expansão *in vitro*), eles podem ter condições faseadas relativamente severas, tais como, p. ex., supressão e inibição por fatores secretados pelas células de câncer.

O material de partida para uso no método de expansão de

acordo com a presente invenção pode ser uma mistura de linfócitos obtida dos linfonodos drenarem um tumor primário e/ou uma metástase, tal como um linfonodo sentinela ou metinela. Estes podem ser identificados durante a cirurgia, p. ex., por injeção de um localizador de linfonodo, tal como, p. ex., uma substância traçadora, em torno ou dentro do tumor ou metástase. O localizador de linfonodo, tal como, p. ex., o traçador, é transportado nos capilares da linfa e acumula-se no(s) nodo(s) sentinela/metinela, assim identificando o(s) linfonodo(s) de drenagem de tumor ou metástase. Os inventores mostraram recentemente que o(s) primeiro(s) linfonodo(s) a receberem drenagem de um tumor são uma fonte rica potencial de linfócitos-T auxiliares CD4+ e/ou CD8+ para expansão *in vitro*, visto que tais nodos podem conter uma quantidade substancial de linfócitos-T, que foram sensibilizados em relação aos antígenos de tumor e sofreram expansão *in vivo* nos linfonodos.

Uma fonte alternativa de linfócitos-T auxiliares CD4+ e/ou CD8+ pode ser o sangue de um indivíduo sofrendo de câncer, tal como, p. ex., sangue periférico. O indivíduo pode ser um paciente não tratado, que tenha tido a doença por um longo tempo ou um paciente já tratado, de onde os linfócitos-T periféricos sensibilizados em relação a um tumor podem ser obtidos. Outras fontes adequadas de linfócitos-T auxiliares CD4+ e/ou CD8+ incluem medula óssea, tecido de baço, e tumores.

Entretanto, em uma forma de realização preferida da invenção, o material de partida é obtido de linfonodos sentinela ou metinela.

Os linfócitos-T a serem expandidos em cultura podem ser obtidos do indivíduo a ser tratado, isto é, os linfócitos-T reativos a tumor específicos resultantes para administração podem ser autólogos. Entretanto, os linfócitos-T podem também ser obtidos de uma fonte que não o indivíduo a ser tratado, tal como, p. ex., outro indivíduo sofrendo de um câncer. Em tal caso, o receptor e os linfócitos-T reativos a tumor expandidos são

preferivelmente imunologicamente compatíveis (ou o receptor é, de outro modo, tornado imuno-tolerante aos linfócitos-T reativos a tumor expandido).

Dependendo da fonte do material de partida, ele compreenderá uma mistura de vários linfócitos, tais como, p. ex., linfócitos-T, linfócitos-B, células de apresentação de antígeno, linfócitos-T reativos a tumor e linfócitos-T não-ativados/não-reativos. A fim de promover sobrevivência especificamente dos linfócitos-T auxiliares CD4⁺ e/ou CD8⁺ reativos a tumor, antígeno derivado de tumor e uma ou mais substâncias tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2 são adicionados.

Como mencionado acima, a primeira fase i) é iniciada adicionando-se pelo menos uma substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2. A função de tais substâncias é estimular os linfócitos-T via o receptor IL-2, para promover a divisão celular dos linfócitos-T, desse modo evitando a morte celular.

A ativação restringida de MHC específica de antígeno dos linfócitos-T promove a expansão clonal da população de linfócito-T útil, específica para o reconhecimento das células tumorais. Ao contrário, a ativação não-específica dos linfócitos-T resultará na expansão dos clones do linfócito T reconhecendo os peptídeos irrelevantes sem qualquer relação com o reconhecimento das células tumorais, assim a maioria dos linfócitos-T inespecificamente expandidos não reconhecendo o tumor.

A invenção objetiva promover a ativação específica e crescimento dos linfócitos-T auxiliares CD4⁺ e/ou CD8⁺ reativos a tumor. Uma ativação específica contra um certo antígeno de tumor possibilita os linfócitos-T terem efeito terapêutico quando administrados a um paciente com câncer com o mesmo tipo de tumor contra o qual os linfócitos-T são ativados.

A administração de linfócitos-T inespecificamente ativados teria nenhuma ou muito pequena probabilidade de ter efeito terapêutico contra qualquer câncer, devido ao pequeno número de linfócitos-T pertinentes a

tumor.

Em uma forma de realização da invenção, as substâncias tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2 são agonistas. Exemplos de tais substâncias incluem proteínas, polipeptídeos, peptídeos, anticorpos, 5 aficorpos e seus fragmentos, proteínas de fusão, moléculas sintéticas e/ou orgânicas, tais como, p. ex., moléculas pequenas e ligandos naturais. Em uma forma de realização preferida, a substância é o ligando natural do receptor IL-2, isto é IL-2.

Se IL-2 for usado, ele é preferivelmente adicionado em uma 10 baixa dose, a fim de reduzir a apoptose linfócita e aumentar a população de linfócitos-T reativos a tumor auxiliares positivos CD4. Em uma forma de realização específica da invenção, a baixa dose de IL-2 é de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 700 IU/ml de meio de cultura, tal como, p. ex., de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 600 IU/ml de meio 15 de cultura, de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 500 IU/ml de meio de cultura, de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 400 IU/ml de meio de cultura, de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 300 IU/ml de meio de cultura e de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 2000 IU/ml de meio de cultura. Em uma forma de realização 20 específica, a quantidade de IL-2 adicionada é de 250 IU/ml.

No caso de outras substâncias, que não IL-2, tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2 serem usadas, as doses específicas destas devem ser de modo a resultar em um efeito correspondendo ao efeito obtido pelas doses acima mencionadas de IL-2.

25 Uma outra quantidade da pelo menos uma substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2 pode ser adicionada regularmente por toda a fase i), tal como, p. ex., cada 2º., 3º. ou 4º. dia da fase i), a fim de manter as condições ótimas para promover a divisão celular. Pela expressão cada 2o., 3o. ou 4o. pretende-se significar que pelo menos uma

substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2 é adicionada por toda a fase i) cada 2o., 3o. ou 4o. dia, começando no 2o., 3o. ou 4o. dia após a primeira adição da pelo menos uma substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2, isto é, após iniciar a fase i).

5 Em uma forma de realização, a substância a ser adicionada regularmente por toda a fase i) é um agonista de IL-2. Em uma forma de realização preferida, a substância é IL-2.

 A outra dose de substâncias tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2, tal como, p. ex., IL-2, a ser adicionada regularmente, 10 tal como, p. ex., cada 2o., 3o. ou 4o. dia situa-se dentro das faixas mencionadas acima.

 Uma outra etapa importante da primeira fase i) de expansão é a adição de antígeno derivado de tumor, a fim de promover a divisão celular dos linfócitos-T expressão os receptores de linfócito T reconhecendo 15 antígenos tumorais, isto é, linfócitos-T reativos a tumor.

 O ponto ótimo de tempo para adicionar o antígeno de tumor é dependente da fonte dos linfócitos. Quando os linfócitos originam-se dos linfonodos, tais como, p. ex., linfonodos sentinela, ou de tumores, os linfócitos podem ter sido submetidos a estreita proximidade e supressão 20 imuno pelas células tumorais e precisam de incubação com uma substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2, tal como, p. ex., IL-2, por alguns dias, a fim de promover a capacidade dos linfócitos-T responderem com proliferação na apresentação de antígeno tumoral. Por conseguinte, em tal caso, o antígeno derivado de tumor é preferencialmente adicionado do dia 25 2 ao dia 5 inclusive da primeira fase i), tal como, por exemplo, no dia 2, no dia 3, no dia 4 ou no dia 5.

 Se os linfócitos originarem-se do sangue, o antígeno derivado de tumor podem ser adicionados já quando a primeira fase i) é iniciada, isto é, junto com a substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2,

visto que os linfócitos-T não foram submetidos à imuno-supressão mencionada acima pelas células tumorais. Portanto, quando sangue é usado, o antígeno derivado de tumor é adicionado essencialmente ao mesmo tempo como quando a fase i) é iniciada ou no máximo até 2 dias a seguir.

5 O antígeno derivado de tumor, tal como, p. ex., um homogeneizado tumoral, é provável ser endocitosado e processado pelas células apresentando antígeno, presentes no material de partida, tal como, p. ex., linfócitos-B, células dendríticas e macrófagos. Na maioria dos casos, o antígeno derivado de tumor será apresentado pelas moléculas MCH classe II, resultando em divisão celular dos linfócitos-T reativos a tumor auxiliares CD4⁺. Entretanto, por apresentação cruzada os antígenos absorvidos pela endocitose podem ser processados e apresentados na bolsa classe I, resultando na ativação dos linfócitos-T CD8⁺. Como citado acima, um dos objetivos do método de expansão é, em alguns aspectos, imitar o trajeto natural do próprio sistema imune dos pacientes e, em um certo grau, permitir que os componentes do sistema imune dos pacientes determinem se os linfócitos CD4⁺ ou CD8⁺ são gerados, dependendo de se o antígeno é apresentado por MCHI ou MCHII. Na maioria dos casos, os antígenos serão apresentados pela molécula MCH classe II, resultando na geração de linfócitos-T CD4⁺; 15 entretanto, em alguns casos, os linfócitos-T CD8⁺ são gerados.

Fase ii)

A finalidade da segunda fase ii) é ativar e expandir os linfócitos-T auxiliares CD4⁺ e/ou CD8⁺, obtidos pela fase i) e obter-se uma sub-população específica de linfócitos-T auxiliares CD4⁺ e/ou CD8⁺ 25 direcionando-os para dentro de um trajeto desejado.

A presente invenção verificou que uma maneira de determinar o ponto ótimo do tempo pra iniciar a fase ii) é monitorando-se a expressão do marcador de superfície da célula CD25 nos linfócitos-T, a fim de determinar especificamente quando os linfócitos-T estão susceptíveis a re-estímulo. Os

presentes inventores verificaram que a segunda fase ii) deve preferivelmente ser iniciada quando a expressão de CD25 nos linfócitos-T é regulada descendentemente. CD25 é um marcador de ativação, indicando que os linfócitos receberam um sinal de ativação. Se a segunda fase for iniciada quando a expressão de CD25 nos linfócitos-T for elevada, significando que os linfócitos já receberam um sinal, a morte celular ocorreria.

A regulação negativa de CD25 é definida como aquela que uma parte substancial da população de linfócitos-T expressa muito poucos ou essencialmente nenhum marcador CD25. Em uma forma de realização preferida, a regulação negativa de CD25 é definida como aquela que menos do que 5% da população de linfócitos-T expressa CD25, isto é, 95% ou mais dos linfócitos-T na cultura não expressam CD25 em absoluto. Os 5% ou menos dos linfócitos-T expressando CD25 são muitíssimo provavelmente linfócitos-T CD4⁺ reguladores, que têm uma expressão permanente elevada de CD25. Além disso, a população de linfócitos-T deve preferivelmente expressar muito poucos ou essencialmente nenhum marcador Foxp3, que são marcadores específicos dos linfócitos-T reguladores. Em uma forma de realização preferida, a regulação negativa de Foxp3 é definida como aquela que menos do que 5% da população de linfócitos-T expressa Foxp3, isto é, 95% ou mais dos linfócitos-T da cultura não expressam Foxp3 em absoluto.

Além de CD25, há também outros marcadores, cuja expressão é pertinente ao monitor, a fim de determinar o ponto ótimo do tempo para iniciar a segunda fase. Exemplos de tais marcadores são o marcador de ativação prematura CD69 e MCHII, que é um marcador de ativação para os linfócitos-T. Quando a expressão de CD69 e MCHII indicar que o “programa de ativação” dos linfócitos-T já está ligado, significando que as células não são capazes de responder a estímulos adicionais, ambos estes marcadores devem preferivelmente ser regulados negativamente antes da segunda fase ser iniciada. O termo regulação negativa pode ser definido como que menos do

que 5 – 10% da população de linfócitos-T expressam CD69 e/ou MCHII.

Em outra forma de realização da presente invenção, os anticorpos anti-CD4 são usados para separar as células auxiliares T de possíveis células tumorais da cultura na expansão da fase ii) do método de expansão.

Em uma outra forma de realização da presente invenção, produtos tais como Dynabeads[®] com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 são usados para promover a expansão da fase ii) do método de expansão. O uso de Dynabeads[®] CD3/CD28 fornecerá linfócitos com sinais de ativação e poderia também ser para separação de possíveis células tumorais da cultura. Dynabeads[®] CD3/CD28 ligar-se-á ao antígeno expandido por linfócitos-T, especificamente durante a fase i), em que estas células agora podem ser enriquecidas magneticamente. Uma vez que a ativação específica de antígeno inicial foi iniciada e resultou em expansão de linfócitos-T clonais, a reestimulação por Dynabeads[®] CD3/CD28 promoverá mais a expansão clonal, uma vez que a fase i) não suporta ativação de clones de linfócitos-T não-específicos.

Mesmo embora o exato ponto de partida da fase ii) varie dependendo de quando os linfócitos adquiriram a expressão preferida de marcadores específicos, a segunda fase ii) é muitíssimo freqüentemente iniciada do dia 17 ao e incluindo dia 23 da primeira fase i), tal como, p. ex., no dia 17, no dia 18, no dia 19, no dia 20, no dia 21 ou no dia 22 ou no dia 23. Em outras palavras, o ponto do tempo, em que os linfócitos expressam a quantidade e combinação preferidas de marcadores, é muito freqüentemente vista como sendo do dia 17 ao dia 23 da primeira fase i).

A expansão dos linfócitos-T, isto é fase i) e II), ocorrerá com muitíssima freqüência em um meio de cultura adequado. Preferivelmente, um meio livre de soro ou soro autólogo é usado a fim de evitar-se o risco de transmitir doenças para o paciente. Exemplos de meios padrão adequados

incluem meio AIMV, RPMI 1640, DMEM e MEM. Entretanto, outros meios podem também ser usados, compreendendo uma mistura adequada de aminoácidos, esteróides, vitaminas, fatores de crescimento, citocinas e minerais.

5 Durante as duas fases da expansão, as células podem ser divididas em diversos vasos de cultura, a fim de manter uma densidade celular adequada nas culturas. A densidade dos linfócitos T nas fases de expansão deve preferivelmente ser de cerca de 3 a cerca de 6 milhões de células/ml de meio de cultura.

10 Durante a expansão uma troca de meio de cultura com meio fresco, uma etapa que é denominada condicionamento do meio, pode também ser necessária. O ponto de tempo para dividir culturas e para condicionar o meio pode ser determinado com base na morfologia das células e na densidade da cultura de células (que não deve exceder cerca de 6 milhões de
15 células/ml) ou o meio pode conter um indicador adequado, tal como, p. ex., um indicador fenol. No caso de um indicador ser incluído no meio, o ponto de tempo para dividir as culturas ou meio de condicionamento pode ser baseado na cor do meio. Se um indicador de vermelho de fenol for usado, as células devem ser divididas ou condicionadas, quando o meio tornar-se amarelo,
20 indicando que o pH da cultura está se tornando ácido. Um programa adequado para condicionar o meio usado na presente invenção pode ser trocar de $\frac{1}{4}$ para $\frac{1}{2}$, tal como, p. ex., $\frac{1}{3}$ do meio cada 3 – 9 dias, tal como, p. ex., uma vez por semana.

25 Exceto para condições específicas mencionadas aqui, para outros parâmetros condições padrão para cultivo de culturas de linfócitos serão usadas, tais como, p. ex., uma temperatura de 37°C e 5% CO₂.

 Como mencionado acima, a segunda fase ii) é iniciada pela adição de antígeno derivado de tumor, como definido acima, aos linfócitos-T para ativar os linfócitos-T negativos-CD25 reativos a tumor, a fim de

promover a expansão clonal dos linfócitos-T reativos a tumor.

Em uma forma de realização específica da invenção, as células apresentando antígeno (APCs) são adicionadas aos linfócitos-T junto com o antígeno derivado de tumor. As células apresentando antígeno (APCs) incluem leucócitos tais como, p. ex., monócitos, macrófagos e linfócitos, tais como, p. ex., células B. Estes diversos tipos de célula têm em comum a capacidade de apresentar antígeno em uma forma que é reconhecida pelos receptores de linfócito T específicos. A preparação de leucócito é isolada de, por exemplo, sangue, fluido de linfa, medula óssea, tecido de órgão linfático ou fluido de cultura de tecido obtidos do paciente a ser tratado. Em uma forma de realização preferida, as células APCs são leucócitos sangüíneos periféricos irradiados, contendo células-B e/ou monócitos apresentando antígeno. A quantidade de APCs adicionadas situa-se dentro da faixa de cerca de 0,5 milhões de APCs/ml cultura de linfócitos a cerca de 5 milhões de APCs/ml de cultura de linfócitos, tais como, p. ex., de cerca de 1 milhão de APCs/ml de cultura de linfócitos a cerca de 4 milhões APC/ml cultura de linfócitos, de cerca de 1 milhão de APCs/ml de cultura de linfócitos a cerca de 3 milhões de APCs/ml de cultura de linfócitos, ou de cerca de 1 milhão de APCs/ml de cultura de linfócitos a cerca de 2 milhões APCs/ml de cultura de linfócitos.

Além da adição de antígeno derivado de tumor aos linfócitos-T, a fim de promover a expansão clonal dos linfócitos-T reativos a tumor, a segunda fase ii) compreende a adição de componentes específicos, cuja função é direcionar a expansão dos linfócitos-T reativos a tumor em direção à sub-população desejada.

Como mencionado acima, a presente invenção fornece um método para a geração de linfócitos-T auxiliares CD4⁺. Os linfócitos-T auxiliares CD4⁺ reconhecem e ligam-se a antígeno tumoral quando o antígeno é associado com uma molécula principal de classe II complexa de

histocompatibilidade. Os linfócitos-T auxiliares $CD4^{+}$ secretam citocinas, proteínas e/ou peptídeos que estimulam outras células do sistema imune, tais como outros linfócitos. A mais comum citocina secretada é a interleucina-2 (IL-2), que é um potente fator de cultivo de linfócito-T. Os linfócitos-T auxiliares $CD4^{+}$ proliferantes podem diferenciar-se em dois principais subtipos de células, células Th1 e Th2, que são definidas com base em citocinas específicas produzidas. As células Th1 produzem interferon-gama e interleucina 12 (IL-12), enquanto as células Th2 produzem interleucina-4, interleucina-5 e interleucina-13. Os linfócitos-T Th1 acredita-se promoverem a ativação dos linfócitos-T citotóxicos (Tc), células NK, macrófagos e monócitos, todos podendo atacar as células cancerosas e geralmente defendem-se contra tumores.

Os linfócitos ($CD4^{+}$) auxiliares-T do tipo Th1 e Th2 podem diferenciar-se em células de memória e células efectoras. Os linfócitos auxiliares-T ($CD4^{+}$) são específicos do antígeno que eles primeiro encontraram e podem ser convocados durante uma resposta imune secundária, evocando uma mais rápida e maior resposta aos antígenos tumorais. Há evidência nos humanos de que os linfócitos sobrevivem pelo menos 20 anos; talvez durante a vida. Os linfócitos-T $CD4^{+}$ efetores são células ativas produzindo citocinas e INF-gama.

Para um tratamento eficaz de câncer, a administração de linfócitos-T reativos a tumor do tipo th1 é especialmente benéfica, visto que este tipo acredita-se promover a adição dos linfócitos-T citotóxicos (Tc), células NK, macrófagos e monócitos, todos podendo atacar células cancerosas e geralmente defender-se contra tumores. Isto é, em uma forma de realização específica, a invenção refere-se a um método para gerar linfócitos-T auxiliares $CD4^{+}$ reativos a tumor e, em uma outra forma de realização, a percentagem dos linfócitos-T do tipo Th2 gerado pelo presente método é 30% ou menos, tal como, p. ex., 25% ou menos, 20% ou menos 15% ou menos,

10% ou menos, 5% ou menos ou 0%, isto é, pelo menos 70% dos linfócitos-T CD4⁺ reativos a tumor são do tipo Th1, tal como, p. ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou 100%.

5 Por conseguinte, a segunda fase pode compreender a adição de uma substância capaz de regular ascendentemente IL-12R dos linfócitos-T. A supra-regulação do IL-12R aumenta a propensão das células T a receberem e otimizar a ativação da citocina IL-12, resultando em sinalização STAT-4 máxima e, assim, desviando-se dos linfócitos em direção às células Th1 e
10 produção de IFN- γ .

As substância(s) capazes de regular ascendentemente IL-12R dos linfócitos-T podem ser substância(s) tendo atividade agonista em relação ao receptor de interferon. Em uma forma de realização da invenção, as substâncias tendo atividade agonista em relação ao receptor de interferon são
15 agonistas. Exemplos de tais substâncias incluem proteínas, polipeptídeos, peptídeos, anticorpos, aficorpos e seus fragmentos, proteínas de fusão, moléculas sintéticas e/ou orgânicas, tais como, p. ex., moléculas pequenas e ligandos naturais. Em uma forma de realização específica, a substância é o ligando natural do receptor interferon, isto é, um interferon, tal como
20 interferon- α .

O ponto de tempo ótimo para adicionar substância(s) capazes de regular ascendentemente IL-12R dos linfócitos-T, tais como, p. ex., uma substância tendo atividade agonista em relação a um receptor de interferon, pode ser determinada medindo-se o nível de IL-12 no meio de cultura. A(s)
25 substância(s) deve(m) preferivelmente ser adicionada(s) quando o nível de IL-12 é pelo menos 1 vez, tal como, p. ex., pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4 ou pelo menos 5 vezes aumentado, em comparação com o nível de IL-12 no dia 1 da fase ii). Na maioria dos casos, tal aumento no nível de IL-12 será visto do dia 2 ao e incluindo dia 4 após iniciar a segunda fase ii), tal

como no dia 2, no dia 3 ou no dia 4.

A fim de substancialmente evitar a geração de linfócitos-T reativos a tumor do tipo Th2, a segunda fase pode ainda compreender a adição de uma ou mais substâncias capazes de antagonizar o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th2. Exemplos de tais substâncias são substâncias capazes de neutralizar as interleucinas IL-4, IL-5, IL-10 e/ou TGF-beta (o último não sendo uma interleucina), todos os quatro sendo necessários para o estabelecimento do perfil da citocina Th2 e para a regulação negativa da produção de citocina Th1.

Exemplos de tais substâncias incluem proteínas, polipeptídeos, peptídeos, receptores solúveis, anticorpos, aficorpos e seus fragmentos, proteínas de fusão, moléculas sintéticas e/ou orgânicas, tais como, p. ex., moléculas pequenas e ligandos naturais. Em uma forma de realização específica, os substratos são selecionados de anticorpos que se ligam às interleucinas, desse modo neutralizando-as, tais como, p.ex., anticorpo anti IL-4, anticorpo anti IL-5 e/ou anticorpo anti IL-10, junto com receptores solúveis (tais como, p. ex., receptor TGF-beta I e II) e proteínas de ligação para TGF-beta (tais como, p. ex., LAP e/ou LTBP).

A uma ou mais substâncias capazes de antagonizar o desenvolvimento de linfócitos-T tipo Th2, tais como, p. ex., uma ou mais substâncias capazes de neutralizar IL-4, IL-5, IL-10 e/ou TGF-beta, podem ser adicionadas no dia 1 da segunda fase ii). Entretanto, como os anticorpos são dispendiosos, a adição de anticorpos pode também ser realizada em uma etapa subsequente, após a adição da substância capaz de regular ascendentemente IL-12R dos linfócitos-T, tais como, p. ex., um dia, dois dias ou três dias após a adição da substância capaz de regular ascendentemente IL-12R dos linfócitos-T.

As substâncias neutralizadoras devem ser adicionadas em uma quantidade suficiente para neutralizar as interleucinas, tais como, p. ex., em

um excesso (molar) de 10 – 100 vezes da quantidade de interleucina a ser neutralizada. Quando utilizando-se anticorpos, uma concentração final de cerca de 2 a cerca de 4 ng/ml de meio de cultura normalmente será necessária. Para outros tipos de substâncias neutralizantes, uma concentração final,
5 fornecendo o mesmo efeito que a concentração mencionada para anticorpos, deve ser usada.

A fim de manter a supressão do desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th2, uma outra quantidade da uma ou mais substâncias capazes de antagonizar o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th2, tais
10 como, p. ex., uma ou mais substâncias capazes de neutralizar IL-4, IL-5, IL-10 e/ou TGF-beta, pode(m) ser adicionada(s) regularmente por toda a fase ii), tal como, p. ex., cada 2o., 3o. ou 4o. dia da fase II). Deve ser entendido que, pela expressão cada 2o., 3o. ou 4o. pretende-se significar que pelo menos uma substância, capaz de antagonizar o desenvolvimento de linfócitos-T tipo Th2,
15 é adicionada por toda a fase i) cada 2o., 3o. ou 4o. dia, começando no 2o., 3o. ou 4o. dia após a primeira adição da pelo menos uma substância capaz de antagonizar o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th2.

Além disso, para a fase i) uma outra quantidade de uma substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2, tal como, p.
20 ex., um agonista, pode ser adicionada regularmente por toda a fase ii), tal como, cada 2o. a 4o. dia da fase ii), isto é, no 2o., 3o. ou 4o. dia, a fim de manterem-se as condições ótimas promovendo a divisão celular. A dose da substância a ser adicionada regularmente reside dentro das faixas ótimas mencionadas sob a fase i) para adição de substâncias tendo atividade agonista
25 em relação ao receptor IL-2, tal como, p. e., IL-2.

A fim de favorecer a geração dos linfócitos-T reativos a tumor tipo Th1, a segunda fase ii) pode compreender adicionar uma ou mais substâncias promovendo o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th1. Exemplos de tais substâncias são substâncias tendo atividade agonista em

relação ao receptor IL-7, IL-12, IL-15 e/ou IL-21. Substâncias mais específicas podem ser agonistas para o receptor IL-7, IL-12, IL-15 e/ou IL-21. Exemplos de tais agonistas incluem proteínas, polipeptídeo, peptídeos, anticorpos, aficorpos e seus fragmentos, proteínas de fusão, moléculas sintéticas e/ou orgânicas, tais como, p. ex., moléculas pequenas e ligandos naturais. Em uma forma de realização específica, as substâncias são os ligandos naturais do receptor IL-7, IL-12, IL-15 e/ou IL-21 receptor, respectivamente, tais como IL- 7, IL-12, IL-15 e/ou IL-21.

O efeito do IL-12 é ativar o trajeto STAT indutor de IFN-gama, pelo estímulo do IL-12R, desse modo promovendo a ativação dos linfócitos-T tipo Th1. A função de IL-2 é aumentar a proliferação, ativação e desenvolvimento em relação aos linfócitos-T tipo Th1.

Tanto IL-7 como IL-15 funcionam promovendo a expansão homeostática dos linfócitos-T, aumentando a enumeração dos linfócitos-T programado Th1 ativados.

O ponto de tempo ótimo para adicionar uma ou mais substâncias promovendo o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th1 é quando os linfócitos-T são susceptíveis a modificação. Se os substratos forem adicionados quando os linfócitos-T não forem susceptíveis a modificação, a adição não terá efeito, isto é, o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th1 não será favorecido. A fim de determinar o ponto de tempo ótimo para adicionar substâncias promovendo o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th1, tais como, p. ex., substâncias tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-7, IL-12, IL-15 e/ou IL-21, a produção de INF- γ pelos linfócitos-T pode ser monitorada. Em uma forma de realização, a uma ou mais substâncias promovendo o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th1, tais como, p. ex., substâncias tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-7, IL-12, IL-15 e/ou IL-21, deve ser adicionada quando o nível de IFN-gama for aumentado, em comparação com o nível de IFN-gama na iniciação da

segunda fase ii).

Em uma forma de realização específica, o aumento do nível do IFN-gama pode ser determinado como pelo menos um aumento de 1 vez no nível de IFN-gama, tal como, p. ex., um aumento de pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, em comparação com o nível de IFN-gama na iniciação da segunda fase ii). Com frequência tal aumento poderá ser correlacionado com aquele do conteúdo de IFN-gama do meio de cultura de pelo menos 100 picograma/ml de meio de cultura, tal como, p. ex., pelo menos 150 picograma/ml de meio de cultura, pelo menos 200 picograma/ml de meio de cultura ou pelo menos 250 picogramas/ml de meio de cultura.

Quando determinando o ponto de tempo ótimo para adicionar substâncias promovendo o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th1, tais como, p. ex., substâncias tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-7, IL-12, IL-15 e/ou IL-21 receptor, pode-se olhar a expressão dos marcadores de ativação CD25 e CD69 dos linfócitos-T CD4⁺, marcadores estes devendo preferencialmente ser supra-regulados. Por supra regulação entende-se que pelo menos cerca de 40% a cerca de 60% ou mais dos linfócitos-T CD4⁺ devem expressar CD25 e CD69, em comparação com a expressão de CD25 e CD69 dos linfócitos-T no dia 1 da fase ii), mostrando que os linfócitos-T receberam um sinal de ativação.

Normalmente, o ponto de tempo ótimo para adicionar as substâncias promovendo o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th1 situar-se-á subsequente às etapas de adicionar as substâncias capazes de regular ascendentemente IL-12R dos linfócitos-T e as substâncias capazes de antagonizar o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th2. Mais especificamente, o ponto de tempo ótimo para adicionar as substâncias promovendo o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th1 situar-se-á entre o dia 5 ao dia 8 após iniciação da segunda fase ii), tal como no dia 5, dia 6, dia 7 ou dia 8. No caso de IL-7, IL-12, IL-15 e/ou IL-21 serem adicionados a

concentração de cada uma destas substâncias no meio de cultura deve situar-se dentro da faixa de cerca de 150 IU/ml de meio de cultura a cerca de 300 IU/ml de meio de cultura, tais como, e.g. 250 IU/ml de meio de cultura. Quando outras substâncias que não as específicas mencionadas forem usadas, elas devem ser adicionadas à cultura na concentração final, o que resulta no mesmo efeito que a adição de IL-7, IL-12, IL-15 e/ou IL-21, dentro das faixas específicas mencionadas, fornecerá.

Como mencionado acima, o presente método é preferencialmente usado para a expansão dos linfócitos-T, a fim de obter linfócitos-T reativos a tumor CD4⁺ do tipo Th1. Um outro aspecto da invenção é que, utilizando-se o método aqui descrito para expandir os linfócitos-T reativos a tumor, uma quantidade relativamente elevada de linfócitos-T do tipo de memória será obtida. No tratamento do câncer é naturalmente importante que o paciente seja tratado para receber uma alta quantidade de linfócitos-T CD4⁺ reativos a tumor, visto que estes, como mencionado acima – promovem a ativação dos linfócitos-T citotóxicos (Tc), células NK, macrófagos e monócitos, todos podendo atacar as células cancerosas e geralmente defendem-se contra tumores.

Entretanto, administrando-se ao mesmo tempo um quantidade substancial de linfócitos-T CD4⁺ reativos a tumor de memória, o paciente obtém até proteção de longa vida em relação a recorrência do tumor ou metástase do tumor primário.

Portanto, a presente invenção refere-se a um método para a preparação de linfócitos-T de memória. Normalmente, quando uma cultura dos linfócitos-T reativos a tumor é expandida de acordo com a presente invenção, cerca de 35% a cerca de 90% de linfócitos-T reativos a tumor do tipo de memória, tais como, p. ex. cerca de 40% a cerca de 90%, cerca de 50% a cerca de 80% ou cerca de 60% a cerca de 70% serão obtidos. Os presentes inventores especulam que o fato de que os linfócitos da fase i)

serem permitidos regenerarem-se antes do antígeno de tumor ser adicionado, junto com a fase de expansão relativamente lenta, resulta na formação de uma elevada relação de linfócitos de memória para linfócitos efetores.

Como mencionado acima, a expressão dos marcadores de ativação de superfície de célula CD25 e CD69 dos linfócitos-T pode ser usada para determinar quando iniciar as etapas importantes do presente método, tais como, p. ex., quando iniciar a segunda fase ii). Portanto, pode ser benéfico monitorar continuamente a expressão de CD25 e CD69 por toda a fase i) e fase ii), tal como, p. ex., cada 2º, 3º. ou 4º. dia.

Como uma das finalidades do presente método é obter um elevado número de linfócitos-T reativos a tumor CD4⁺, que possam ser usados para administração em um paciente, os linfócitos-T reativos a tumor podem ser colhidos em algum ponto, resultando no término da etapa de expansão. O ponto de tempo ótimo para colher os linfócitos-T reativos a tumor é quando a expressão de CD25 dos linfócitos-T é regulada descendentemente, onde a regulação negativa é definida como aquela em que 5% da população de linfócitos-T CD4⁺ expressa CD25. O ponto de tempo ótimo para colher pode também ser determinado com base na medição da quantidade de IFN-gama produzida. A produção de IFN-gama deve ser de pelo menos 2 vezes aumentada, tal como, p. ex., pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes ou pelo menos 5 vezes aumentada, em comparação com a produção de IFN-gama inicial, que normalmente corresponde a um nível de IFN-gama de pelo menos 100 pg/ml de meio de cultura.

Normalmente, este evento ocorrerá do dia 10 ao e incluindo dia 14 após iniciar a segunda fase ii), isto é, normalmente as células serão cultivadas do dia 10 ao e incluindo dia 14 após iniciação da segunda fase ii).

Por conseguinte, o inteiro processo para expansão dos linfócitos-T reativos a tumor de acordo com a presente invenção pode ser em geral levar de cerca de 25 dias a e incluindo 45 dias, tal como, p. ex., de cerca

de 26 dias a e incluindo cerca de 44 dias, de cerca de 27 dias a e incluindo 43 dias, de cerca de 27 dias a e incluindo 42 dias, de cerca de 27 dias a e incluindo 41 dias e de cerca de 27 dias a e incluindo cerca de 40 dias.

Em vez de colher os linfócitos-T reativos a tumor quando o marcador CD25 é regulado negativamente, eles podem ser submetidos a um ou mais ciclos adicionais de fase ii). Isto poderia ser benéfico se a quantidade de linfócitos-T reativos a tumor obtida pelo método de expressão não for considerada uma quantidade eficaz a ser administrada a um paciente sofrendo de câncer, ou se o paciente estiver em um regime de tratamento de quimioterapia, quando pode ser benéfico adiar a administração dos linfócitos-T até o tratamento de quimioterapia ser terminado. A fim de determinar se os linfócitos-T reativos a tumor devem ser submetidos a um ou mais ciclos adicionais de fase ii), pode-se examinar o nível de IFN-gama produzido e/ou o número total de linfócitos-T reativos a tumor obtidos e/ou a expressão de CD25. No caso de os níveis de IFN- γ serem de 30 pg/ml de meio de cultura ou menos, tal como, p. ex., 20 pg/ml de meio de cultura e/ou o número total de células T for insatisfatório, ciclos adicionais de fase ii) podem ser iniciados, começando quando a maior parte das células T for CD25 negativo (isto é, menos do que 5% da população de linfócitos-T expressam CD25) e, desse modo, susceptíveis a reestimulação.

Após colheita, os linfócitos-T reativos a tumor podem ser purificados por qualquer meio convencional, tal como, p. ex., utilizando-se gradiente de densidade, tal como, p. ex., um meio Ficoll. Uma parte dos linfócitos-T reativos a tumor pode ser armazenada por congelamento em um meio de congelamento adequado, após colher e purificar os linfócitos-T reativos a tumor.

Método de tratamento

Os linfócitos-T reativos a tumor, obtidos por um método de expansão aperfeiçoado como descrito acima, podem ser usados em um

método para tratar um indivíduo sofrendo de uma doença de origem neoplásica ou para realizar a regressão do tumor em um indivíduo tendo um tumor, o método compreendendo administrar ao indivíduo em necessidade uma quantidade eficaz de linfócitos-T reativos a tumor de acordo com a presente invenção.

O método descrito aqui pode ser usado para tratamento de qualquer neoplasma sólido de origem epitelial, mesenquimal ou embriológica em qualquer local anatômico, tal como, p. ex., para neoplasmas epiteliais, p. ex., carcinomas da mama, cólon, pâncreas, bexiga, intestino delgado, próstata, cerviz, vulva, ovários; para neoplasmas mesenquimais, p. ex., sarcomas das juntas, ossos, músculos e tendões e alguns hematológicos, tais como linfomas; para neoplasmas embriológicos, p. ex., teratomas.

A definição de uma quantidade eficaz de linfócitos-T reativos a tumor depende do tipo específico de linfócitos, da proporção de memória para linfócitos-T efetores e da severidade da doença. Entretanto, em média, um mínimo de pelo menos 10 milhões, tal como pelo menos 20 milhões, pelo menos 30 milhões, pelo menos 40 milhões, pelo menos 50 milhões, pelo menos 60 milhões, pelo menos 70 milhões ou pelo menos 80 milhões de linfócitos-T reativos a tumor podem ser administrados. Os presentes inventores não identificaram qualquer limite com respeito à quantidade de linfócitos-T reativos a tumor a ser administrada em uma única dose. Em uma forma de realização preferida, os linfócitos-T reativos a tumor para administração compreendem uma combinação de linfócitos-T efetores e linfócitos-T de memória. Mais especificamente, a quantidade de linfócitos-T reativos a tumor do tipo de memória pode ser de cerca de 35% a cerca de 90%, tal como, p. ex. de cerca de 40% a cerca de 90%, de cerca de 50% a cerca de 80% ou de cerca de 60% a cerca de 70%, e a percentagem dos linfócitos-T efetores de cerca de 10% a cerca de 65%, tal como, p. ex., de cerca de 20% a cerca de 50% ou de cerca de 30% a cerca de 40%.

Os linfócitos-T reativos a tumor podem ser formulados como uma composição farmacêutica adequada para administração parenteral ao paciente, tal como, p. ex., intravenosa, intra-arterial, intratecal ou intraperitoneal.

5 Quando os linfócitos-T reativos a tumor são administrados parenteralmente, eles podem ser formulados em um meio isotônico, isto é, em um meio tendo a mesma tonicidade que o sangue e compreendendo uma ou mais substâncias compreendendo a agregação das células. Um exemplo específico de um meio adequado é uma solução de 0,9% de NaCl, 10 compreendendo até 3% de albumina de soro humana, tal como, p. ex., até 2% de albumina de soro humano ou até 1% de albumina de soro humano. Para administração intravenosamente, a concentração dos linfócitos-T reativos a tumor na composição a ser administrada normalmente situa-se dentro da faixa de cerca de 0,5 milhões linfócitos/ml de meio a cerca de 4 milhões 15 linfócitos/ml de meio, tal como, p. ex., de cerca de 0,5 milhões linfócitos/ml de meio a cerca de 3 milhões linfócitos/ml de meio, de cerca de 0,5 milhões linfócitos/ml de meio a cerca de 2 milhões linfócitos/ml de meio ou de cerca de 1 milhões linfócitos/ml de meio a cerca de 2 milhões linfócitos/ml de meio.

A composição compreendendo linfócitos-T reativos a tumor 20 pode ser administrada como uma única dose ou múltiplas doses. Ela pode ser infundida através de 1 a 2 horas.

O método de tratamento pode ser realizado uma vez ou repetido, dependendo da severidade da doença. Além disso, o tratamento pode ser reiterado na recorrência da doença.

25 O tratamento de acordo com a presente invenção pode ser suplementado com qualquer outro tratamento pertinente para câncer. Tal tratamento suplementar pode ser dado antes, na mesma ocasião ou após a administração dos linfócitos e pode ser dado em frequências normalmente usadas para tais tratamentos. Um exemplo adequado de tratamento

suplementar é quimioterapia e similares.

Kits

A invenção refere-se ainda a kits para uso em um método de acordo com a presente invenção, o kit compreendendo um meio para cultivo dos linfócitos-T. O meio pode ser qualquer meio livre de soro adequado, tal como, p. ex., AIMV, RPMI 1640, DMEM ou MEM.

O kit pode ainda compreender uma ou mais substâncias para estimular, ativar e direcionar os linfócitos-T reativos a tumor. Exemplos de tais substâncias podem ser antígeno derivado de tumor, substâncias tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2, substâncias capazes de regular ascendentemente IL-12R dos linfócitos-T, substâncias capazes de antagonizar o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th2 e/ou substâncias promovendo o desenvolvimento de linfócitos-T tipo Th1.

Mais especificamente, tais substâncias podem ser IL-2, interferon-alfa, anticorpo anti-IL-4, anticorpo anti-IL-5, anticorpo anti-IL-10, IL-7, IL-12, IL-15 e/ou IL-21.

O kit pode também compreender uma composição farmacêutica adequada para administração intravenosa. A composição farmacêutica pode ser misturada com a população de linfócitos-T reativos a tumor antes administração.

O kit pode também compreender uma ou mais seringas, compreendendo um localizador de linfonodo, tal como, p. ex., os mencionados acima.

Os kits podem também compreender instruções para uso, tais como, p. ex., instruções na forma de software de computador.

Legendas das Figuras

A Figura 1 ilustra que o nodo sentinela é o sítio primário natural para a apresentação e ativação da reatividade da célula T em relação ao antígeno de tumor.

A Figura 2 mostra que, inicialmente, os linfócitos de nodo sentinela são ativados com antígeno tumoral e baixa dose de IL-2, resultando em ativação e expressão do marcador de ativação CD25 (Painel de topo). O final da fase de ativação da fase I é definida pelo número diminuído de células T CD4⁺ expressando CD25 (Painel de base). Quando menos do que 5% das células T CD4⁺ expressam CD25, a fase II é iniciada com reestimulação com antígeno.

A Figura 3 ilustra que a ativação da Fase I e Fase II resulta em expansão e enriquecimento das células auxiliares CD4⁺ T.

A Figura 4 ilustra que, na Fase I, a maior parte das células são células CD62L⁺ não afetadas ou células CD69⁺CD62L⁺ ativadas. Após a Fase II, a maioria das células são CD62L⁻ e são compostas células auxiliares CD4⁺ T de memória e efectoras. As células CD62L não estão expressando a molécula de retorno de linfonodo preferida; assim elas estão procurando áreas inflamatórias e órgãos não-linfáticos.

A Figura 5 mostra células primárias estimuladas na Fase I por tumor (linfócitos de infiltração de tumor), nodos sentinela (SN) e um linfonodo irrelevante (LN) resulta em não pouca produção de IFN- γ .

A Figura 6 ilustra que, após expansão após a fase ii), há um aumento dependente da dose na produção de IFN- γ dependente de antígeno.

A Figura 7 ilustra que o protocolo de expansão e ativação promove a expansão dos clones de célula T específica de antígeno, pelo enriquecimento da expressão V β TCR.

A Figura 8 A-D são varreduras CT do paciente # 5. Após transfusão dos linfócitos reativos a tumor, o paciente teve regressão total de metástases do fígado localizadas em ambos os lóbulos (que tinham sido declaradas incuráveis por cirurgia do fígado), normalização dos níveis de CEA, desaparecimento de ascite e ficou fisicamente em boa forma, exercitando-se regularmente.

A Figura 9 A-F são varreduras CT do paciente # 10. Após transfusão, o paciente teve regressão de metástases do fígado e fluido ascítico. Ele estava com boa saúde e formação de imagem adicional mostrou doença estável.

5 A Figura 10 A-H são varreduras CT do paciente # 12. Três meses após transfusão, ele teve regressão de metástases do fígado e pulmões com nível de CEA quase normalizado a 5,9 (Normal < 4,0), desaparecimento de ascite e ele parecia clinicamente saudável.

10 A Figura 11 mostra linfócitos T ativados para a expressão de CD4⁺, que foram tingidos para a expressão de CD25 e o fator de transcrição FoxP3 no início (A) e no final (B) de uma expansão. Inicialmente (painel A), 4,8% dos linfócitos-T CD4⁺ expressavam FoxP3 e altos níveis de CD25, assim identificados como Treg. No final da expansão, um número muito pequeno de Tregs estavam presentes 0,3% (painel B).

15 **Exemplos**

Exemplo 1

Expansão de linfócitos-T reativos a tumor

A identificação de diversos nodos sentinela foi realizada pré-operativamente empregando-se a técnica de nodo sentinela. Resumidamente, 20 1 ml de corante azul patente foi injetado (Guerbet, Pris) e distribuído superficialmente na serosa em torno do tumor. Dentro de cinco a dez minutos, um a três linfonodos mesentéricos foram coloridos azul, estes nodos sentinela foram marcados com suturas e removidos (vide Figura 1). Um linfonodo mesentérico não-sentinela, distante do tumor, foi também identificado e 25 removido como um controle.

Os linfonodos sentinela e não-sentinelas foram cortados pela metade e fatias de 1 mm de espessura foram retiradas do centro e da periferia. O resto dos linfonodos foram remetidos para exame histopatológico, de acordo com o procedimento de rotina. Uma parte do tumor, incluindo uma

amostra da margem invasiva, foi também removida para fins de pesquisa.

Cultura de Células

Fase I, ativação inicial

O material do nodo sentinela foi mantido sobre gelo e imediatamente tomou-se cuidado utilizando-se AIM V[®] Media (Invitrogen) em todas as ocasiões. Suspensões de célula única de linfócitos de nodo sentinela foram obtidas através de homogeneização suave em um homogeneizador de vidro de adaptação folgada e as células de homogeneização a seguir foram lavadas duas vezes em meio. Os linfócitos de nodo sentinela foram colocados em frascos de cultura de célula a 4 milhões de células/ml e interleucina-2 (IL-2) (Proleukin[®], Chiron) foi adicionada a uma concentração de 240 IU/ml meio.

Extrato de tumor autólogo foi preparado por homogeneização com um Ultra Turrax em 5 volumes (p/v) 2 x PBS, seguido por desnaturação por 5 minutos a 97°C. Três a quatro dias após iniciação o extrato de tumor autólogo de cultura de célula foi adicionado em uma concentração de 1/100. Para cultura de longo termo, as células foram mantidas em um incubador de célula a 37°C e 5% CO₂ e 250 IU IL-2/ml meios adicionados cada 3 – 4 dias.

Fase II, ativação e expansão

Após 18 – 22 dias, as culturas de células foram monitoradas para a expressão de CD25. Quando o número de células expressando CD25 foi diminuído abaixo de 5%, as células foram re-estimuladas na Fase II (Figura 2) pela adição de extrato de tumor autólogo em uma concentração de 1/100. Para apresentação de antígeno eficiente, PBMC autólogas foram coletadas usando-se Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences, GE Healthcare), irradiadas com 2500 rd e adicionadas às culturas de célula. Três dias após reestimulação, interferon- α (Introna) na conc. de 100 – 500 IU/ml e anticorpo anti IL-4 foram adicionados a uma concentração de 2 μ g/ml. Após 5 a 8 dias, IL-12 (4 ng/ml) foi adicionado à expansão, a fim de promover a

indução de IFN- γ produzindo as células Th1.

No dia antes da transfusão no paciente, as culturas de célula foram submetidas a purificação, usando-se um Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences, GE Healthcare), a fim de recuperar as células viáveis da cultura. No dia de transfusão, as células foram lavadas duas vezes com solução Salina (Natriumklorid Baxter Viaflo 9 mg/ml, Baxter) e então transferidas para um saco de transferência contendo 200 – 200 ml de solução salina e 1% de albumina de soro humano (Baxter). As investigações quanto à presença microbiana foram realizadas antes da transfusão. As infusões das células foram realizadas durante 1 – 2 horas sob supervisão médica profissional.

Avaliação Imunológica

Mais avaliação imunológica foi realizada usando-se ensaios de proliferação de incorporação de timidina rotulada com trítio. Uma alíquota de linfócitos de nodo Sentinela foi posta de lado para esta finalidade, uma única suspensão de célula de linfócitos de nodo não-sentinela foi obtida por pressão suave em um homogeneizador de vidro de ajuste solto e os leucócitos de sangue periférico foram purificados por Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences, GE Healthcare).

As células foram ressuspensas e lavadas duas vezes em RPMI 1640 (Life Technologies) contendo 2,5% de soro de bezerro fetal (FCS) (Life Technologies). Finalmente, as células foram ressuspensas em meio de proliferação RPMI 1640 contendo 10% de soro AB humano (Sigma), 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma) e 1% de glutamina (Sigma). Células de linfonodo e PBL purificado foram usadas a 3×10^5 células/poço em uma placa de 96-poços e estimulados com homogeneizado de tumor diluído 1/100, 1/10 ou Con A 10 μ g/ml (Sigma) em triplicatas. A proliferação foi medida no dia 5, 6 e 7 pela adição de 1 μ Cl de 3 H-Timidina/poço (Amersham) 18 horas antes da colheita. As amostras foram submetidas a contagem de cintilação.

No início da cultura de célula, estímulos das células de linfonodo e PBL, para a medição da secreção de IFN- γ , foram realizados em placas e 96 poços com 3×10^5 células/poço em triplicata, com homogeneizado de tumor diluído 1/10 e 1/100, ou Con A 10 $\mu\text{g/ml}$ (Signa). A quantidade de IFN- γ secretado foi medida com ELISA (IFN- γ Humano DuoSet, R&D Systems) nos sobrenadantes de cultura em amostras reunidas das triplicatas (Figura 5). No final das culturas de células, amostras do sobrenadante foram removidas e a secreção de IFN- γ e IL-4 medida em triplicata com ELISA (IFN-DuoSet Humano e DuoSet-IL-4 Humano, R&D Systems) (Figura 6A e 6B).

Análises de citometria de fluxo

A caracterização das células foi realizada usando-se citometria de fluxo inicialmente nas células do nodo sentinela, nodo não-sentinela, PBMC e do tumor. Do nodo sentinela, linfócitos adquiridos em amostras de cultura foram retirados cada duas a três semanas para análises de citometria de fluxo. As células foram incubadas por 30 minutos em PBS suplementado com 2% FCS e 0,05% NaN_3 (tampão FACS) com anticorpos contra marcadores para subpopulações de célula imune e para ativação de linfócito (Figura 3, 4 e 5). Anticorpos conjugados com isotiocianato de Fluoresceína (FITC) contra os seguintes marcadores foram usados: CD89, HLA-DR, CD45RA, CD25, conjugados com ficoeritrina (PE): CD62L, CD19, CD45RO, CD56, conjugados com Peridina-Clorofil-Proteína (PerCP): CD8, CD3 conjugados com alofocianina (APC): CD4, CD14, CD8.

O repertório-V β foi examinado usando-se o kit de marca Beta (Beckman Coulter), 5×10^5 células/tubo foram tingidas em 10 μl dos 8 diferentes frascos contendo misturas de FITC, PE e anticorpos V β TCR conjugados FITC-PE de dupla cor e com a adição de CD8 PerCP e CD4 APC em cada tubo (Figura 7).

Exemplo 2

Tratamento de câncer de cólon pela administração de linfócitos-T reativos a tumor

Identificação e remoção dos linfonodos sentinela e metinela de pacientes com câncer de cólon

5 Dezesseis pacientes diagnosticados com câncer de cólon, seis mulheres e dez homens com uma idade média de 62 anos, foram estudados. Os pacientes foram histopatologicamente classificados como Duke's C ou D. Houve também 5 pacientes com Duke's B com características de tumor agressivo, tais como ulcerações, invasão vascular ou perineural. Os pacientes
10 7 e 14, entretanto, foram anteriormente cirurgicamente tratados devido a câncer do cólon e agora tinham doença recorrente com metástases para o fígado. O comitê ético local aprovou o estudo e cada paciente forneceu consentimento informal.

 A identificação dos nodos sentinela ou metinela foi realizada
15 intraoperativamente. A mobilização do sítio do tumor colônico foi conseguida pela divisão das adesões peritoneais, a fim de facilitar a inspeção do tumor e mesentério. Injeções de corante azul Patente (Guerbet, Paris) foram distribuídas superficialmente na serosa em torno do tumor. Dentro de cinco minutos, um a três linfonodos mesentéricos foram coloridos azul, estes nodos
20 sentinela foram marcados com suturas e removidos quando a ressecção estava completa. Um linfonodo mesentérico não-sentinela, distante do tumor, foi manipulado da mesma maneira.

 Os linfonodos sentinela e não-sentinela foram cortados pela metade e fatias de 1 mm de espessura foram retiradas do centro e da periferia.
25 O resto dos linfonodos foi remetido para exame hispatológico de acordo com o procedimento de rotina. Um pedaço do tumor, incluindo uma parte da margem invasiva, foi usado para preparação antígeno.

 Os linfócitos obtidos dos linfonodos foram então expandidos como descrito no Exemplo 1.

Administração de linfócitos-T reativos a tumor

16 pacientes foram tratados com infusão de linfócitos autólogos expandidos como descrito no Exemplo 1. Em média 74,7 milhões ativados e clonalmente expandidos de células T foram administrados como uma transfusão. Não foram observados efeitos colaterais tóxicos, como febre, calafrios, mal-estar, retenção severa de fluido, edema pulmonar ou angústia respiratória.

Avaliações de acompanhamento

O acompanhamento incluiu exame clínico cada terceiro a sexto mês e controle de níveis de CEA. Todos os pacientes do estágio III e IV foram além disso investigados com tomografia computadorizada do tórax e abdome. Os pacientes foram acompanhados em visitas regulares em média por 13 meses (faixa de 5 – 20), o tempo de acompanhamento médio foi de 13 ½ meses. De cada 16 pacientes que tinham sido tratados com infusão de linfócitos autólogos, oito tiveram conhecimento no diagnóstico. Quatro pacientes receberam suas transfusões devido a recorrências conhecidas e deles três estão ainda sem sinais de recorrências. Um paciente foi operado devido a metástases do fígado solitárias e estiveram desde então sem recaídas. Como manifesta-se pela Figura 8 e Figura 9, um paciente com metástases de fígado localizadas em ambos os lóbulos (que tinham sido declarados incuráveis pela cirurgia de fígado), tiveram total regressão das metástases de fígado após transfusão de linfócitos reativos a tumor e, além disso, tiveram normalização dos níveis de CEA, desaparecimento de ascite e está fisicamente bem e exercitando-se regularmente. Um outro paciente com metástases de fígado tiveram regressão de metástases de fígado e fluido ascético após transfusão (vide Figura 10, 11 e 12). Um paciente teve, três meses após transfusão, regressão das metástases do fígado e pulmões (vide figura 13, 14, 15 e 16) com um nível de CEA quase normalizado a 5,9 (Normal < 4,0), desaparecimento de ascite e ele mostra-se clinicamente saudável.

Resultados

Dezesseis pacientes com câncer de cólon ou metástases de fígado colo-retais solitárias foram operados no South Stockholm General Hospital e incluídos no estudo. Os locais primários dos tumores eram três no ceco, 4 no cólon ascendente, 1 no cólon descendente, 7 no cólon sigmóide e 1 no reto. Sete hemicolectomias laterais direitas, 1 hemicolectomia lateral esquerda, 7 ressecções sigmóides e 1 retoamputação foram realizadas. Dois pacientes tinham sido anteriormente operados com retoamputação e ressecção sigmóide; eles agora sofreram ressecções parciais do fígado devido a metástases do fígado. Um paciente teve recorrências em dois locais abdominais e tinham sido anteriormente operados devido a um tumor no ceco. Em nossa operação, dois nodos sentinela drenando a metástase foram identificados, um no mesentério colônico e um no mesentério do intestino delgado. Uma ressecção prolongada da região ileocolônica anastomótica com mesenteria foi realizada.

Em todos os pacientes, um a três (média 2,1) nodo(s) sentinelas foram identificados intraoperativamente por injeções de azul patente peritumorais. Entre os pacientes com ressecção colônica primária, em média 15,8 linfonodos foram recuperados de cada espécime. Após investigação histopatológica destes linfonodos, cinco pacientes foram classificados como pacientes Duke's C e 5 pacientes como Duke's B, todos eles foram classificados como tumores de alto risco, devido a crescimento de células tumorais ao longo dos nervos e nos vasos em investigação anatômica patológica. Cinco pacientes tiveram metástases distantes e foram em uma ocasião de ressecção metastática classificados como Duke's D. Dois pacientes deles tiveram metástase de fígado solitárias. Além disso, nodos sentinela foram também analisados por FACS (classificador de célula ativada por Fluorescência) e anticorpos contra citoceratina 20, que é expressa por tumores de câncer do cólon, para fins de detectar micrometástases. As avaliações da

citoceratina 20 dos linfonodos por citometria de fluxo estavam de acordo com o diagnóstico anatômico patológico (não mostrado), exceto em um caso em que um nodo sentinela negativo falso (de acordo com análise histopatológica) era positivo na análise FACS de citoceratina 20.

5 O nodo sentinela é o primeiro linfonodo drenando o tumor e é, portanto, o primeiro sítio de metástase de linfonodo (Dahl et al.), porém o nodo sentinela é também o sítio primário para a ativação do sistema imune. As células tumorais, escombros, células necróticas e células apresentando antígeno acumulam-se no nodo sentinela, onde ocorrem a apresentação,
10 ativação e expansão clonal das células T direcionadas contra o tumor. Os presentes inventores aproveitaram esta população de células T expandidas *in vivo* de linfócitos adquiridos de nodo sentinela para cultura, expansão e transfusão de célula *in vitro*.

Os linfócitos adquiridos de nodo sentinela é uma população de
15 células T ativadas e clonalmente expandidas contra antígenos tumorais, que podem eficientemente ser colhidas durante o procedimento cirúrgico. Ao contrário dos recentes experimentos de imunoterapia focalizando-se em células T citotóxicas, o objetivo dos presentes inventores foi criar um protocolo para intensificação *in vitro* da expansão clonal iniciada *in vivo* de
20 células auxiliares T. As células auxiliares T parecem ser necessárias para a função eficaz das células T citotóxicas e para a criação das células de memória. Além disso, em um sistema transgênico de receptor de célula-T objetivando um antígeno de células das ilhotas, a transfusão das células Th1 foi constatada ser suficiente para a destruição das células β e desenvolvimento
25 do diabetes melito. Cultura *in vitro* de linfócitos adquiridos de nodo sentinela resultou em uma ativação de Th1 e expansão clonal de células auxiliares T, como indicado pela produção dominante do IFN- γ de citocina Th1 de marca de autenticidade e o enriquecimento de um repertório V β TCR restringido. O homogeneizado tumoral usado para expandir as células T é provável ser

endocitosado e processado pelas células apresentando antígeno para apresentação de classe II resultando na ativação das células auxiliares T CD4⁺, resultando na expansão favorecendo as células auxiliares T. Por apresentação cruzada, os antígenos absorvidos por endocitose podem ser processados e apresentados na bolsa classe I, resultando em ativação de células T citotóxicas CD8⁺. Interessantemente, em alguns casos os inventores constataram expansão clonal de células tanto CD4⁺ como CD8⁺.

O número médio de linfócitos adquiridos de nodo sentinela no início da expansão foi de 107,4 milhões de células (faixa 3,6 – 509 milhões, média 70 milhões). As células foram caracterizadas por citometria de fluxo. A relação entre as células CD4⁺ e CD8⁺ no início foi na média de 4,9 (faixa de 0,36 – 10, média 5,4) indicando uma expansão de células auxiliares CD4⁺ nos nodos sentinela comparada com a relação de CD4/CD8 no sangue periférico (faixa normal 1,0 – 2,5) (figura 2A). Além disso, linfócitos B (CD 19) e células matadoras naturais (NK) (CD 56) estavam presentes nos nodos sentinela (não mostrados). As células foram mantidas em cultura em média 36,1 dias (faixa de 23 – 58 dias), média de 33 dias. As células foram monitoradas rigorosamente por citometria de fluxo pelo menos semanalmente. Inicialmente, o número total de células diminuiu. As células B e células NK desapareceram quase completamente e o número de células matadoras T CD8⁺ foi diminuído. O procedimento de cultura usado promoveu principalmente a expansão das células auxiliares, uma vez que a relação média de CD4/CD8 foi de 92,5. O re-estímulo com antígeno de tumor autólogo resultou em expansão clonal das células T reativas a tumor, como avaliado investigando-se o repertório Vβ do receptor de célula-T dos linfócitos adquiridos do nodo sentinela, antes e após cultura *in vitro*.

Antes da transfusão, as células T expandidas foram funcionalmente testadas contra antígenos de tumor autólogos medindo-se a ativação e a produção de citocina do IFN-γ de citocina Th1 e IL-4 da citocina

Th2. Os linfócitos adquiridos do nodo sentinela expandido *in vitro* responderam no re-estímulo com antígeno tumoral com a produção de IFN- γ e nenhum ou muito pouco IL-4, indicando que as células T expandidas eram funcionais e responsivas a Th1.

5 Seis pacientes com Duke's D foram tratados no estudo. Dois pacientes estagiados como Duke's D na cirurgia com metástases para o fígado e para os pulmões e fígado, respectivamente, exibiram regressão marcante da doença (pat 5 e 12). Após transfusão dos linfócitos, o primeiro paciente teve regressão total das metástases do fígado localizadas em ambos os lóbulos (que
10 tinham sido declaradas incuráveis pela cirurgia do fígado) (figura 3), normalização dos níveis de CEA, desaparecimento do ascite e mostrou-se saudável. O Paciente 12 mostrou regressão das metástases do fígado e pulmões com um nível de CEA quase normalizado a 5,9 (Normal < 4,0), desaparecimento do ascite e mostrou-se clinicamente saudável. O paciente 1
15 exibiu uma regressão do tamanho da metástase do fígado e inicialmente uma diminuição dos níveis de CEA, desaparecimento do ascite e estava em excelente forma quando repentinamente morreu (dia 191), o que parece ter sido um embolia pulmonar. Dois pacientes de Duke's D exibiram doença estável, sem progressão da metástase ou aumento dos níveis de CEA. A
20 paciente mais idosa no. 7 do estudo apresentou doença estável por cinco meses, porém em seguida, os níveis de CEA começaram a aumentar e morreu na idade de 83. Não foi realizada autópsia. Um paciente estagiou como Duke's C na cirurgia, porém logo desenvolveu metástase para o fígado e pulmões (Duke's D), porém em seguida a transfusão e quimioterapia uma
25 regressão das metástases do pulmão e fígado foram vistas com somente níveis de CEA ligeiramente elevados. Os pacientes classificados como Duke's C todos tinham níveis normais de CEA e mostraram-se sem quaisquer sinais de recorrência radiológica ou clínica da doença. Quatro dos pacientes Duke's B são saudáveis, com níveis de CEA normais e não têm sinais de doença

recorrente. O paciente no. 9, classificado como Duke's B, porém com um tumor de crescimento agressivo, mostra sinais de doença recorrente com elevados níveis de CEA (67) e sinais de metástases de fígado.

Para investigar o fato de células T transfundidas, os presentes inventores analisaram a proliferação das células T em relação ao extrato de tumor no sangue periférico. Como mencionado antes, eles não puderam demonstrar qualquer reatividade de célula T no sangue periférico contra antígenos de tumor autólogos em quaisquer dos pacientes antes da transfusão. Entretanto, fomos capazes de detectar a proliferação de células T contra os antígenos de tumor autólogos no sangue periférico em todos os pacientes investigados até 10 meses após a transfusão, indicando a presença de células T reativas a tumor circulantes clonalmente expandidas.

Resumo das características dos pacientes

Embaixo é apresentada uma tabela de todos os participantes do estudo, escolhidos após a classificação de Duke na cirurgia:

Características dos participantes

Idade/ sexo	Classificação de Duke	Células infundidas (x10⁶)	CD4/ CD8 *	IFN-γ (pg/ml)	Sobrevivência total (meses)	Resposta
67/M	B	4	92 / 0.2	ND	31	SD
67/F	B	8	15 / 51	ND	30	SD
71/M	B	50	74 / 15	2091	29	SD
74/M	B	63	64 / 22	ND	29	SD
66/M	B	152	82 / 1.5	1411	27	SD
64/F	C	110	64 / 25	ND	34	SD
58/F	C	16	77 / 18	417	23	SD
61/F	D	1	3.7 / 35	ND	6	SD
47/M	D	80	24 / 16	ND	36	CR
54/M	D	40	37 / 24	ND	36	SD

65/M	D	270	82 / 15	ND	36	CR
42/F	D	80	66 / 11	ND	33	CR
82/F	D	40	98 / 0.1	ND	6	SD
74/M	D	130	73 / 22	142	30	CR
33/M	D	72	72 / 1.5	908	12	PR
66/M	D	25	37 / 27	764	26	PR

^{a)} Os números representam a percentagem de células positivas CD4 e CD8, detectadas com FACS.

Exame

Do conhecimento dos presentes inventores, a imunoterapia baseado em nodo sentinela ou metinela, em pacientes com câncer de cólon, nunca foi apresentada antes. Assim, esta é a primeira tentativa de utilizarem-se linfócitos adquiridos de nodos sentinela ou metinela para terapia. Há algumas diferenças principais entre o presente estudo e, p. ex., o tratamento com IL-2 de alta dose (Rosenberg). Primeiramente, o uso de linfócitos adquiridos de nodo sentinela, que foram estimulados *in vitro* por homogeneizado de tumor autólogo e APCs, provoca uma resposta imune celular altamente específica em relação ao tumor. Somente as células T com alta afinidade para o tumor primário sobreviverão até a transfusão. Em um tratamento generalizado sistêmico com alta dose de IL-2 intravenosamente em pacientes, todos os linfócitos serão igualmente estimulados e razoavelmente somente uma muito pequena fração deles são específicos de tumor. Os presentes inventores acreditam que, uma vez que o(s) nodo(s) sentinela são os primeiros drenando linfonodos para um tumor, haverá um excessivo acúmulo de linfócitos específicos de tumor. A proliferação e transfusão de células T verdadeiras reconhecendo tumor deve criar uma reação específica de tumor maciço. Em segundo lugar, o regime de IL-2 de alta dose provoca alta toxicidade e severas complicações, longos períodos de tratamento e altos custos. As transfusões de acordo com o presente método foram feitas sem complicações durante cerca de uma hora e os pacientes foram com frequência descarregados no mesmo dia. Em terceiro lugar, o

presente protocolo aponta em direção à expansão das células auxiliares T dos nodos sentinela, ao contrário da expansão das células T citotóxicas, colhidas como linfócitos de infiltração de tumor.

5 Este estudo mostra que os linfócitos adquiridos de nodo
sentinela recentemente isolados possuem uma capacidade proliferativa *in*
vitro em relação ao homogeneizado de tumor autólogo e podem, sem
complicações, ser transfundidos no paciente como imunoterapia adotiva. Há
uma forte indicação que o tratamento com linfócitos adquiridos de nodo
10 sentinela expandido pode melhorar o resultado de pacientes com alto risco de
câncer de cólon disseminado, bem como pacientes sofrendo de tipos de sólido
de câncer.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a expansão de linfócitos T auxiliares CD4+ e/ou linfócitos T CD8+ reativos a tumor, caracterizado pelo fato de compreender

5 i) uma primeira fase de estimular linfócitos T auxiliares CD4+ e/ou linfócitos T CD8+ reativos a tumor com antígeno derivado de tumor, junto com pelo menos uma substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2, para promover a sobrevivência de linfócitos T auxiliares CD4+ e/ou linfócitos T CD8+; e

10 ii) uma segunda fase de ativar e promover o crescimento de linfócitos T auxiliares CD4+ e/ou linfócitos T CD8+ reativos a tumor, em que a segunda fase ii) é iniciada quando o marcador de superfície das células CD25 (ou marcador IL-2R) é regulado negativamente nos linfócitos T auxiliares CD4+ e/ou linfócitos T CD8+.

15 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a regulação negativa ser definida como aquela que 5% ou menos da população de linfócitos-T expressa CD25.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de os linfócitos-T estarem presentes em um meio de cultura.

20 4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de o meio de cultura ser um meio livre de soro, tal como, p. ex., meio AIMV.

25 5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de a primeira fase i) ser iniciada adicionando-se a pelo menos uma substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de a substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2 é IL-2.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de IL-2 ser adicionado em uma baixa dose, tal como, p. ex., de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 700 IU/ml de meio de cultura, de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 600 IU/ml de meio de cultura, de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 500 IU/ml de meio de cultura, de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 400 IU/ml de meio de cultura, de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 300 IU/ml de meio de cultura e de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 200 IU/ml de meio de cultura.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de mais uma quantidade da pelo menos uma substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2 ser adicionada regularmente por toda a fase i), tal como, p. ex., cada 2o., 3o. ou 4o. dia de fase i).

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de a substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2 ser IL-2.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de a concentração de IL-2 adicionado ser de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 700 IU/ml de meio de cultura, de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 600 IU/ml de meio de cultura, de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 500 IU/ml de meio de cultura, de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 400 IU/ml de meio de cultura, de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 300 IU/ml de meio de cultura e de cerca de 100 IU/ml de meio de cultura a cerca de 200 IU/ml de meio de cultura.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de o antígeno derivado de tumor ser adicionado do dia 2 ao e incluindo dia 5 da primeira fase i), tal como, p. ex.,

no dia 2, no dia 3, no dia 4 ou no dia 5.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 10, caracterizado pelo fato de o antígeno derivado de tumor ser adicionado essencialmente ao mesmo tempo que quando a fase i) é iniciada ou no
5 máximo até 3 dias após.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de o antígeno derivado de tumor ser um homogeneizado desnaturado de um tumor.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado
10 pelo fato de o antígeno derivado de tumor ser autólogo.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de o antígeno derivado de tumor ser uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações
15 precedentes, caracterizado pelo fato de a segunda fase ii) ser iniciada do dia 17 ao e incluindo dia 23 da primeira fase i), tal como, p. ex., no dia 17, no dia 18, no dia 19, no dia 20, no dia 21, no dia 22 ou no dia 23.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de a segunda fase ser iniciada pela adição
20 de antígeno derivado de tumor aos linfócitos-T, para ativar os linfócitos-T negativos-CD25, reativos a tumor.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de o antígeno derivado de tumor ser autólogo.

19. Método de acordo com a reivindicação 17 ou 18,
25 caracterizado pelo fato de o antígeno derivado de tumor ser um homogeneizado desnaturado de um tumor.

20. Método de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizado pelo fato de o antígeno derivado de tumor ser uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo de tumor.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 – 20, caracterizado pelo fato de compreender ainda a adição aos linfócitos-T de células apresentando antígeno, junto com o antígeno derivado de tumor.

5 22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de as células apresentando antígeno serem leucócitos sangüíneos periféricos irradiados, contendo células-B e/ou monócitos apresentando antígeno.

10 23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de a segunda fase ii) compreender adicionar pelo menos uma substância capaz de regular ascendentemente IL-12R dos linfócitos-T.

15 24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de a(s) substância(s) capaz(es) de regular ascendentemente IL-12R dos linfócitos-T ser(em) substância(s) tendo atividade agonista em relação a um receptor de interferon.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a(s) substância(s) tendo atividade agonista em relação a um receptor de interferon ser um interferon.

20 26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de a(s) substância(s) tendo atividade agonista em relação a um receptor de interferon ser interferon- α .

25 27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 – 26, caracterizado pelo fato de a(s) substância(s) capaz(es) de regular ascendentemente IL-12R dos linfócitos-T, tais como, p. ex., uma substância tendo atividade agonista em relação ao receptor de interferon, ser adicionada(s) quando o nível de IL-12 for de pelo menos 1 vez, tal como, p. ex., pelo menos 2, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, ou pelo menos 5 vezes aumentado, em comparação com o nível de IL-12 no dia 1 da fase ii).

28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

23 – 27, caracterizado pelo fato de a substância capaz de regular ascendentemente IL-12R dos linfócitos-T, tal como, p. ex., uma substância tendo atividade agonista em relação a um receptor de interferon, ser adicionada do dia 2 ao e incluindo dia 4 após iniciar a segunda fase ii), tal como, p. ex. no dia 2, no dia 3 ou no dia 4.

29. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de a segunda fase ii) compreender adicionar uma ou mais substâncias capazes de antagonizar o desenvolvimento de linfócitos-T tipo Th2.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de uma ou mais substâncias capazes de antagonizar o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th2 ser(em) uma ou mais substâncias capazes de neutralizar IL-4, IL-5, IL-10 e/ou TGF-beta.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de a uma ou mais substâncias capazes de neutralizar IL-4, IL-5, IL-10, e/ou TGF-beta serem anticorpo anti IL-5 e/ou anticorpo anti IL-10.

32. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 – 31, caracterizado pelo fato de a uma ou mais substâncias capazes de antagonizar o desenvolvimento de linfócitos-T tipo Th2, tais como, p. ex., uma ou mais substâncias capazes de neutralizar IL-4, IL-5, IL-10, e/ou TGF-beta ser(em) adicionada(s) no dia 1 da segunda fase ii).

33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 – 31, caracterizado pelo fato de a uma ou mais substâncias capazes de antagonizar o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th2, tais como, p. ex., uma ou mais substâncias capazes de neutralizar IL-4, IL-5, IL-10 e/ou TGF-beta, ser(em) adicionada(s) em uma etapa subsequente após a adição da substância capaz de regular ascendentemente IL-12R dos linfócitos-T.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de a uma ou mais substâncias capazes de antagonizar o

desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th2, tais como, p. ex., uma ou mais substâncias capazes de neutralizar IL-4, IL-5, IL-10 e/ou TGF-beta, ser adicionada um dia após a adição da substância capaz de regular ascendentemente IL-12R dos linfócitos-T.

5 35. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de uma outra quantidade da uma ou mais substâncias capazes de antagonizar o desenvolvimento dos Linfócitos-T tipo Th2, tais como, p. ex., uma ou mais substâncias capazes de neutralizar IL-4, IL-5, IL-10, e/ou TGF-beta ser(em) adicionada(s) regularmente através da
10 fase ii).

 36. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de uma outra quantidade da uma ou mais substâncias capazes de antagonizar o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th2, tais como, p. ex., uma ou mais substâncias capazes de neutralizar IL-4, IL-5, IL-10, e/ou TGF-beta, ser(em) adicionadas em cada 2º, 3º ou 4º dia de fase ii).

 37. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de uma outra quantidade de uma substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2 ser(em) adicionada(s) regularmente através da fase ii).

20 38. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato da substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2 ser(em) adicionadas em cada 2º, 3º ou 4º dia de fase ii), tais como, p. ex., cada 3º dia.

 39. Método de acordo com a reivindicação 37 ou 38,
25 caracterizado pelo fato da substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2 ser IL-2.

 40. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato da segunda fase ii) compreender adicionar uma ou mais substâncias promovendo o desenvolvimento dos

Linfócitos-T tipo Th1.

41. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato da uma ou mais substâncias promovendo o desenvolvimento dos Linfócitos-T tipo Th1 ser(em) substâncias tendo atividade agonista em relação a IL-7, IL-12, IL-15 e/ou Receptor IL-21.

42. Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato da uma ou mais substâncias ser(em) selecionada(s) de IL-7, IL-12, IL-15 e IL-21.

43. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 40-42, caracterizado pelo fato da uma ou mais substâncias promovendo o desenvolvimento dos Linfócitos-T tipo Th1, tais como, p. ex., substâncias tendo atividade agonista em relação a IL-7, IL-12, IL-15 e/ou Receptor IL-21 ser(em) adicionada(s) quando o nível de IFN-gama for aumentado, em comparação com o nível de IFN-gama no início da segunda fase ii).

44. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato do nível aumentado de IFN-gama ser determinado como pelo menos um aumento de 1 vez no nível de IFN-gama, tais como, p. ex., pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, em comparação com o nível de IFN-gama no início da segunda fase ii).

45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 40-44, caracterizado pelo fato da uma ou mais substâncias promovendo o desenvolvimento dos Linfócitos-T tipo Th1, tais como, p. ex., substâncias tendo atividade agonista em relação a IL-12, IL-15 e/ou Receptor IL-21 ser(em) adicionada(s) quando CD25 e/ou CD69 forem regulados negativamente.

46. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 40-45, caracterizado pelo fato de a concentração de cada uma ou mais substâncias promovendo o desenvolvimento dos Linfócitos-T tipo Th1, tais como, p. ex., substâncias tendo atividade agonista em relação a IL-7, IL-12,

IL-15 e/ou Receptor IL-21 adicionadas, ser de cerca de 150 IU/ml de meio de cultura a cerca de 300 IU/ml de meio de cultura, tais como, p. ex. 250 IU/ml de meio de cultura.

47. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 40-46, caracterizado pelo fato de uma ou mais substâncias promovendo o desenvolvimento dos Linfócitos-T tipo Th1, tais como, p. ex., substâncias tendo atividade agonista em relação a IL-12, IL-15 e/ou Receptor IL-21, ser(em) adicionada(s) do dia 5 ao e incluindo dia 8 após iniciar a segunda fase ii), tais como, no dia 5, dia 6, dia 7 ou dia 8.

48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de ser para a preparação dos Linfócitos-T auxiliares CD4+.

49. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de ser para a preparação dos linfócitos-T efetores.

50. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de linfócitos-T da memória.

51. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de Linfócitos-T tipo Th1.

52. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de compreender ainda monitorar a expressão dos marcadores de superfície de célula, tais como, p. ex., CD25 e/ou CD69 dos linfócitos-T continuamente durante a primeira fase i) e segunda fase ii).

53. Método de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de os linfócitos-T serem colhidos quando CD25 dos linfócitos-T da segunda fase ii) forem regulados negativamente.

54. Método de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato dos linfócitos-T serem submetidos a pelo menos um ciclo adicional de fase ii), quando CD25 dos linfócitos-T for regulado negativamente.

55. Método de acordo com a reivindicação 53 ou 54, caracterizado pelo fato de a regulação negativa ser definida como aquela em que 5% ou menos da população de linfócitos-T positivos CD4 expressa CD25.

56. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato dos linfócitos-T reativos a tumor serem colhidos do dia 10 ao e incluindo dia 14 após iniciar a segunda fase ii).

57. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato dos linfócitos-T reativos a tumor serem purificados após colheita.

58. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de compreender ainda uma etapa de congelar os linfócitos-T reativos a tumor obtidos na segunda fase ii).

59. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato dos linfócitos-T serem derivados de nodos de linfa drenando um tumor primário e/ou uma metástase, ou serem derivados de sangue.

60. Linfócito-T reativo a tumor, caracterizado pelo fato de ser preparado de acordo com o método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 – 59.

61. Linfócito-T reativo a tumor de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de ser um linfócito-T CD4+.

62. Linfócito-T reativo a tumor de acordo com a reivindicação 60 ou 61, caracterizado pelo fato de ser um linfócito-T efector.

63. Linfócito-T reativo a tumor de acordo com qualquer uma das reivindicações 60-62, caracterizado pelo fato de ser um linfócito-T de memória.

64. Linfócito-T reativo a tumor de acordo com qualquer uma das reivindicações 60-63, caracterizado pelo fato de ser um Linfócito-T tipo Th1.

5 65. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de compreender linfócitos-T reativos a tumor como definidos em qualquer uma das reivindicações 60-64.

10 66. Método para tratar um indivíduo sofrendo de uma doença de origem neoplásica, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao indivíduo em necessidade uma quantidade eficaz de linfócitos-T reativos a tumor como definidos em qualquer uma das reivindicações 60-65.

15 67. Método para realizar a regressão de tumor em um indivíduo tendo um tumor, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao indivíduo em necessidade uma quantidade eficaz de linfócitos-T reativos a tumor, como definidos em qualquer uma das reivindicações 60-65.

68. Método de acordo com a reivindicação 66 ou 67, caracterizado pelo fato dos linfócitos-T reativos a tumor serem administrados intravenosa, intra-arterial, intratecal ou intraperitonealmente.

20 69. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66-68, caracterizado pelo fato de a quantidade de linfócitos-T reativos a tumor administrada ser de pelo menos 10 milhões, tal como, p. ex. pelo menos 20 milhões, pelo menos 30 milhões, pelo menos 40 milhões, pelo menos 50 milhões, pelo menos 60 milhões, pelo menos 70 milhões ou pelo menos 80 milhões.

25 70. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66-69, caracterizado pelo fato de os linfócitos-T reativos a tumor administrados serem uma combinação de linfócitos-T efetores e linfócitos-T de memória.

71. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado

pelo fato de a percentagem de linfócitos-T efetores ser de cerca de 10% a cerca de 65%, tal como, p. ex., de cerca de 20% a cerca de 50% ou de cerca de 30% a cerca de 40%.

5 72. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66-71, caracterizado pelo fato de os linfócitos-T reativos a tumor serem autólogos.

73. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66-71, caracterizado pelo fato de os linfócitos-T reativos a tumor não serem autólogos.

10 74. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66-73, caracterizado pelo fato de a doença neoplásica ser selecionada de qualquer neoplasma sólido de origem epitelial, mesenquimal ou embriológica de qualquer local anatômico, tais como para neoplasmas epiteliais, p. ex., carcinomas da mama, cólon, pâncreas, bexiga, intestino delgado, próstata,
15 cerviz, vulva, ovários; para neoplasmas mesenquimais, p. ex., sarcomas das juntas, ossos, músculos e tendões e alguns hematológicos, tais como linfomas; para neoplasmas embriológicos, p. ex., teratomas.

20 75. Uso de linfócitos-T reativos a tumor, preparados de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 59, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para o tratamento de doença de origem neoplásica.

76. Kit para uso no método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 – 59 ou 66 – 74, caracterizado pelo fato de compreender um meio para cultivo de linfócitos-T.

25 77. Kit de acordo com a reivindicação 76, caracterizado pelo fato de compreender ainda uma ou mais substâncias para estimular, ativar e direcionar os linfócitos-T reativos a tumor.

78. Kit de acordo com a reivindicação 76 ou 77, caracterizado pelo fato de os meios serem um meio livre de soro, tais como, p. ex., AIMV,

RPMI 1640, DMEM ou MEM.

79. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 76-78, caracterizado pelo fato de uma ou mais substâncias para estimular, ativar e direcionar linfócitos-T reativos a tumor serem selecionadas de antígeno derivado de tumor, substâncias tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2, substâncias capazes de regular ascendentemente IL-12R dos linfócitos-T, substâncias capazes de antagonizar o desenvolvimento dos linfócitos-T tipo Th2 e substâncias promovendo o desenvolvimento dos Linfócitos-T tipo Th1.

80. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 76-79, caracterizado pelo fato de uma ou mais substâncias para estimular, ativar e direcionar os linfócitos-T reativos a tumor serem selecionadas do grupo compreendendo IL-2, interferon-alfa, anticorpo anti-IL-4, anticorpo anti-IL-5, anticorpo anti- IL-10, IL-7, IL-12, IL-15 e IL-21.

81. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 76-80, caracterizado pelo fato de compreender uma composição farmacêutica adequada para administração intravenosa.

82. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 76-81, caracterizado pelo fato de compreender ainda uma seringa compreendendo um localizador de linfonodo.

83. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 76-82, caracterizado pelo fato de compreender instruções para uso.

84. Kit de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato de as instruções serem na forma de software de computador.

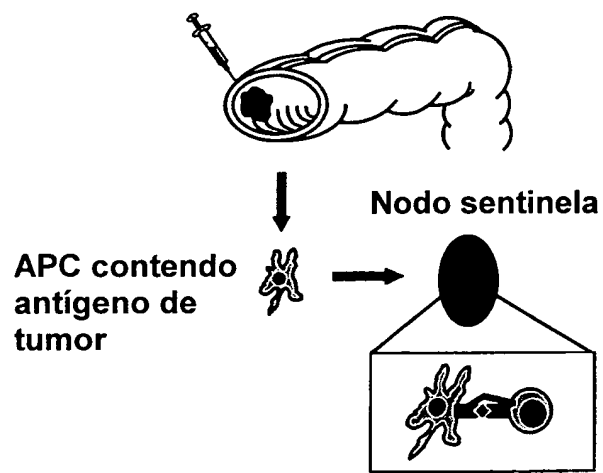


Fig. 1

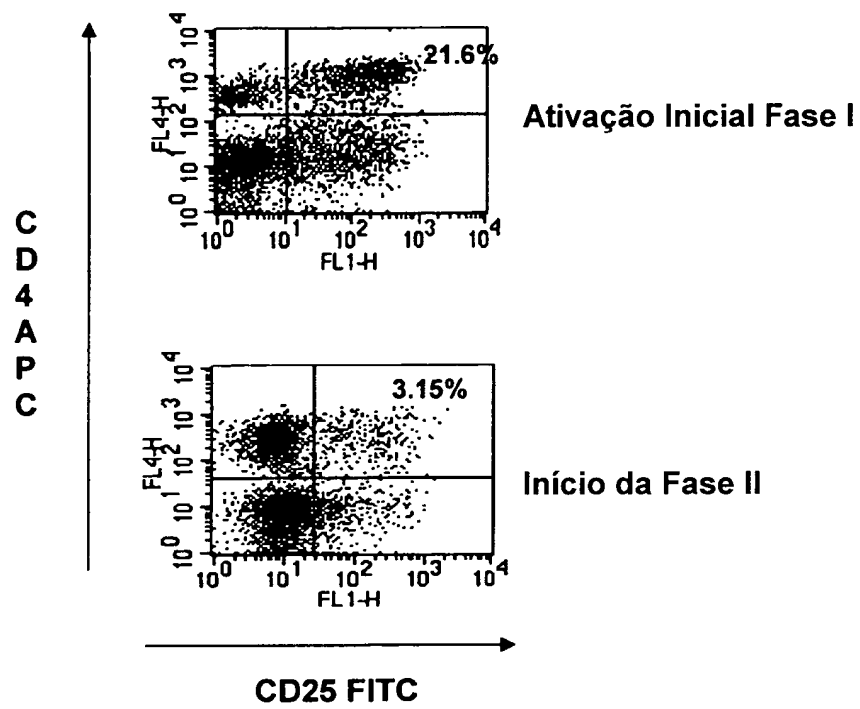
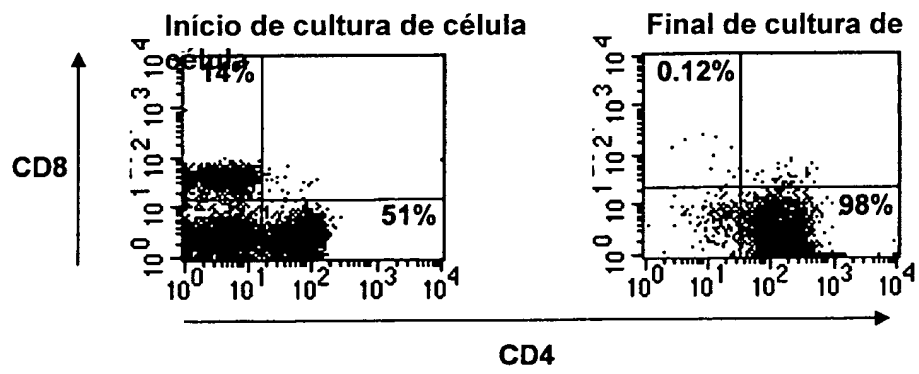


Fig. 2

**Fig. 3**

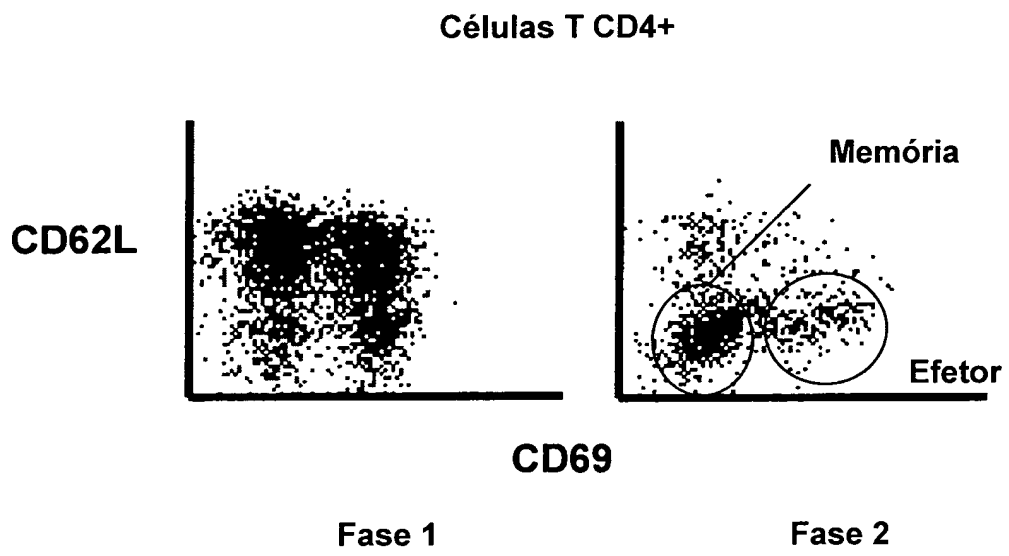
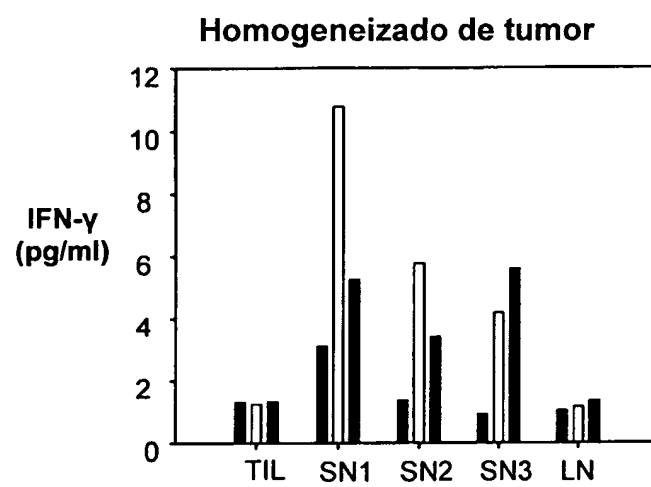
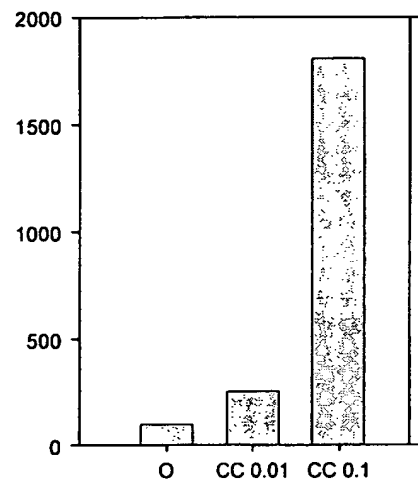
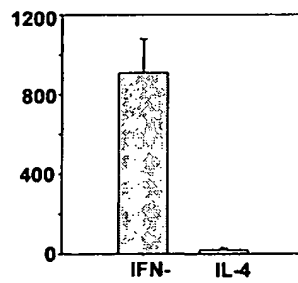
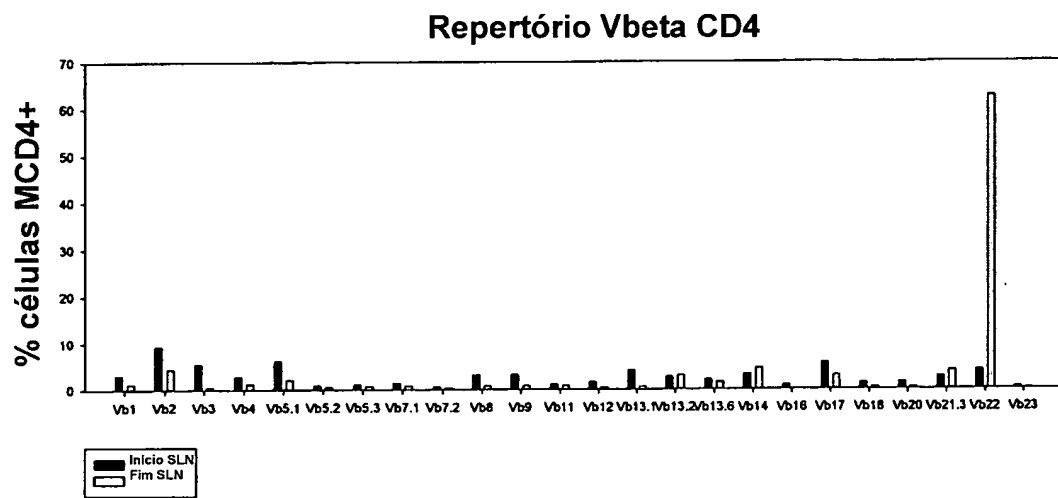


Fig. 4

**Fig. 5**

A**B****Fig. 6**

**Fig. 7**

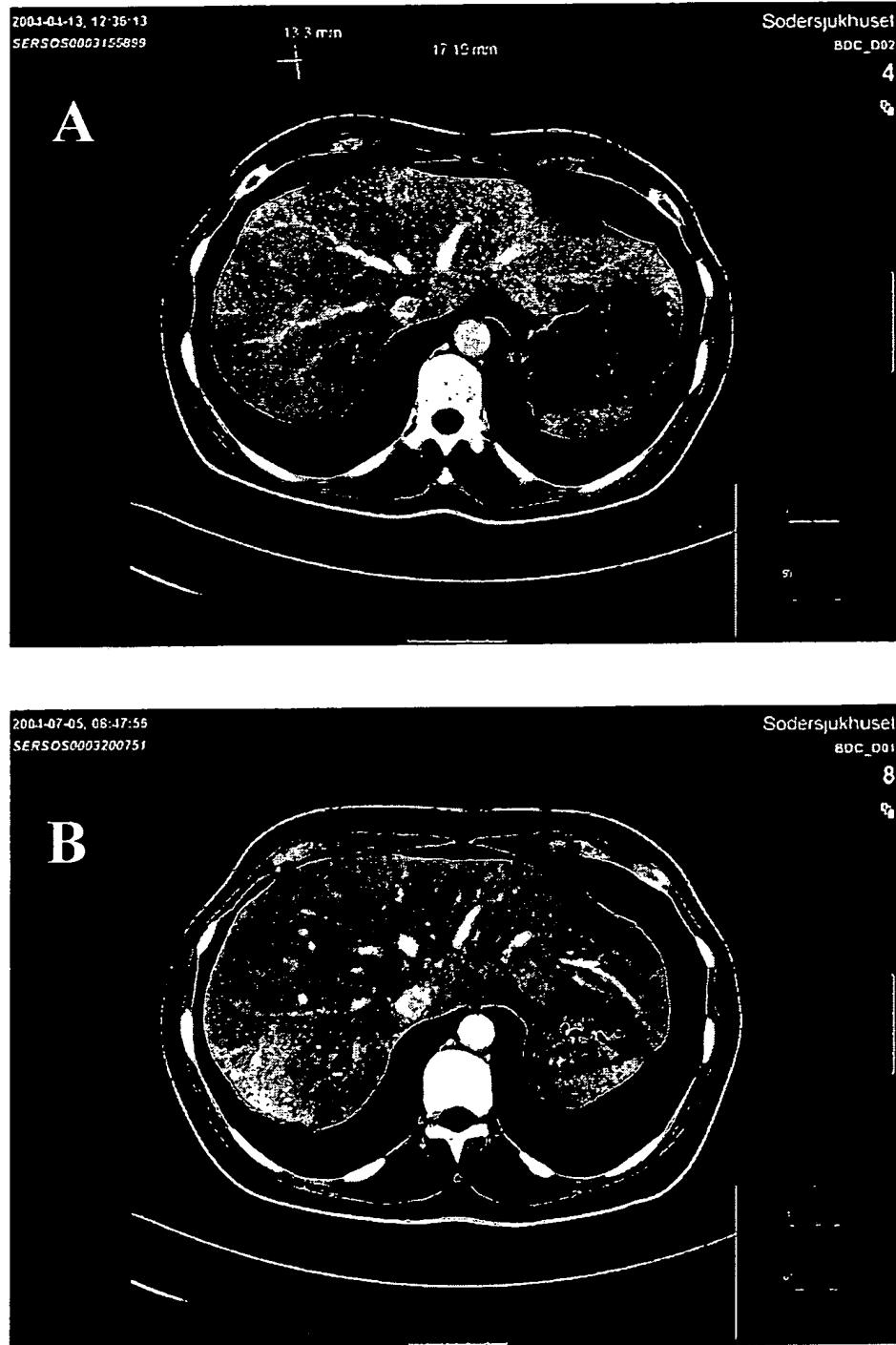


Fig. 8

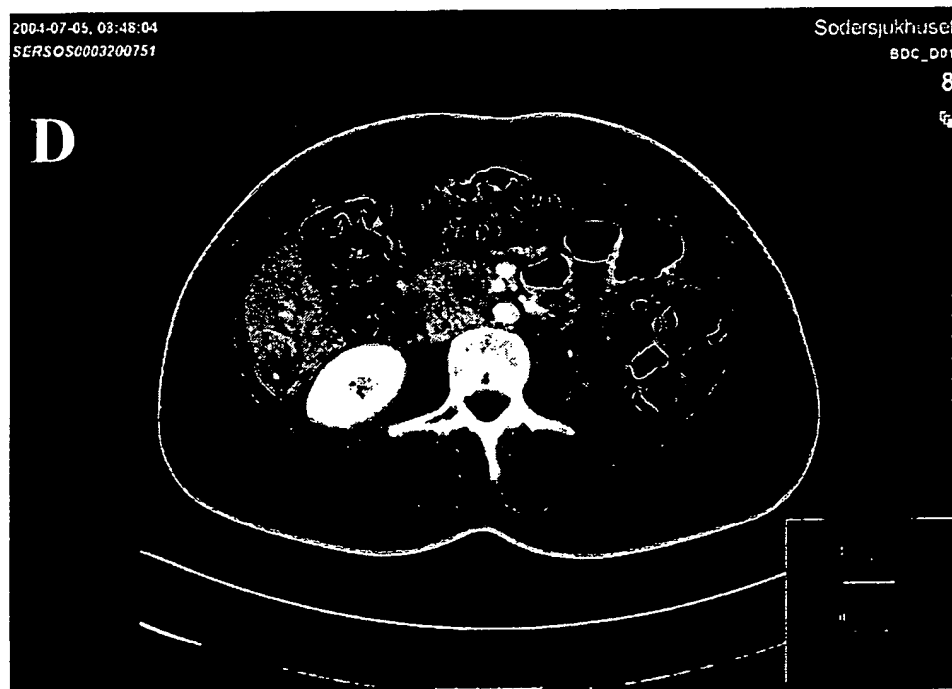
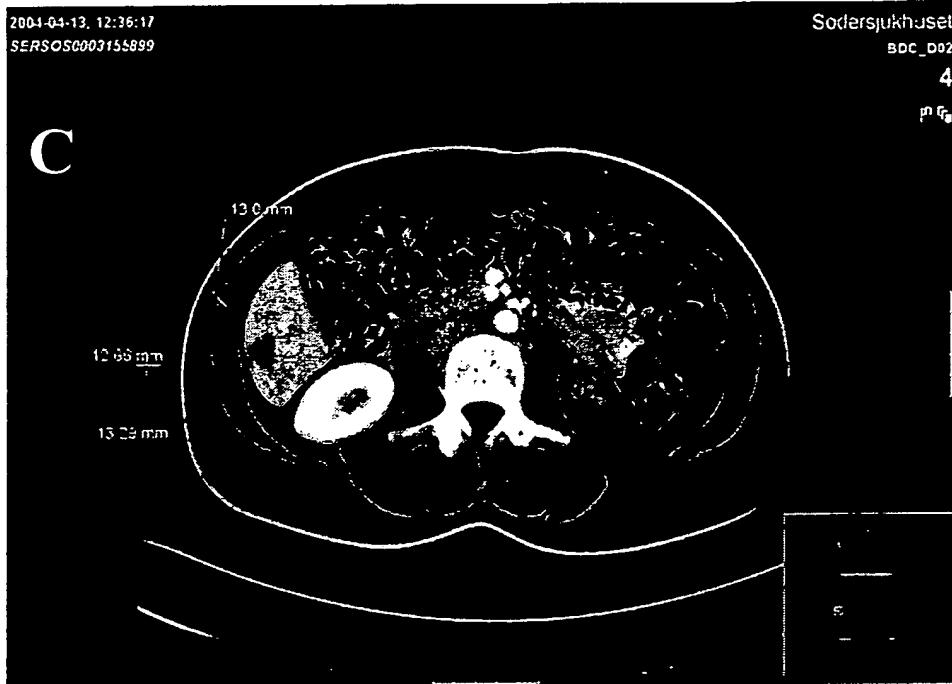


Fig. 8

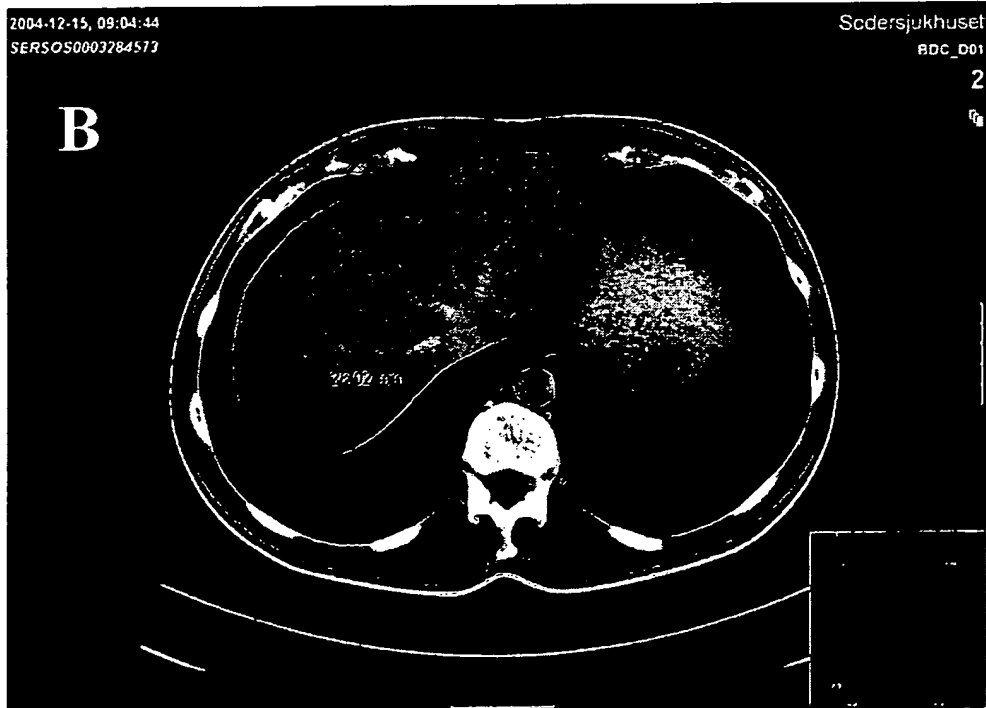
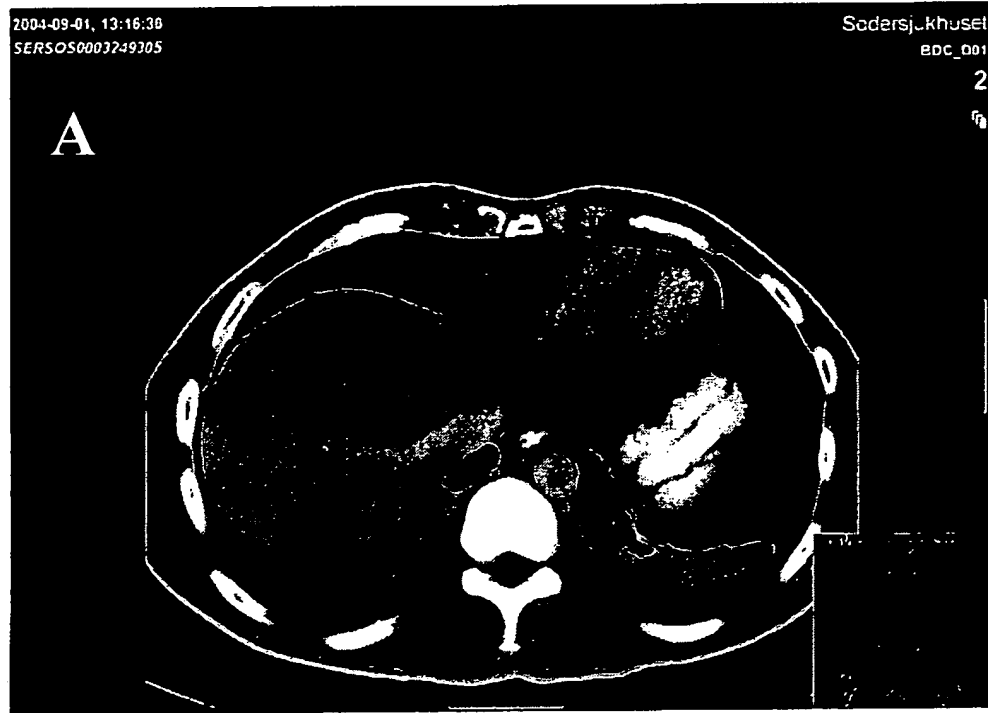


Fig. 9

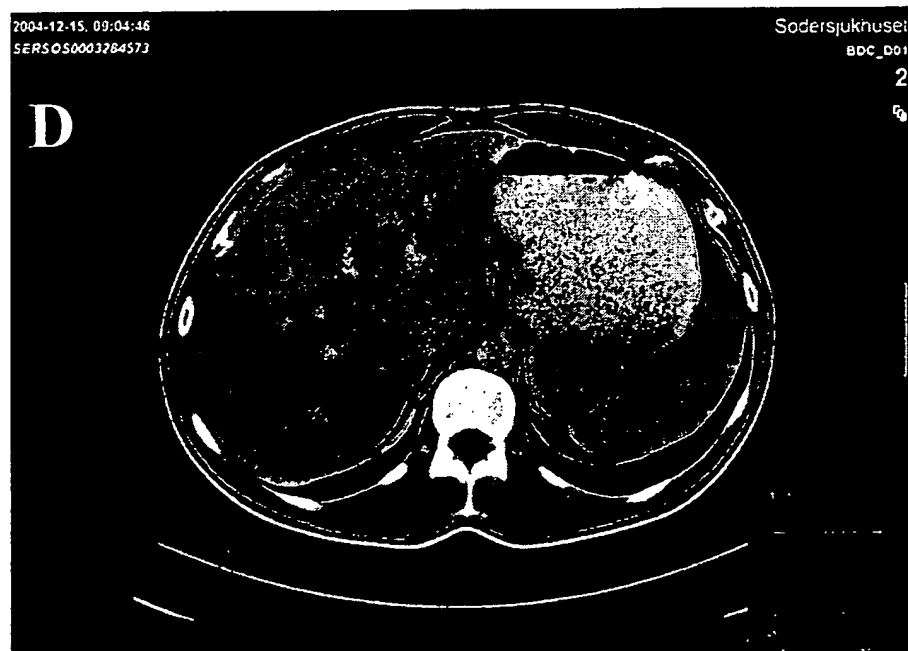
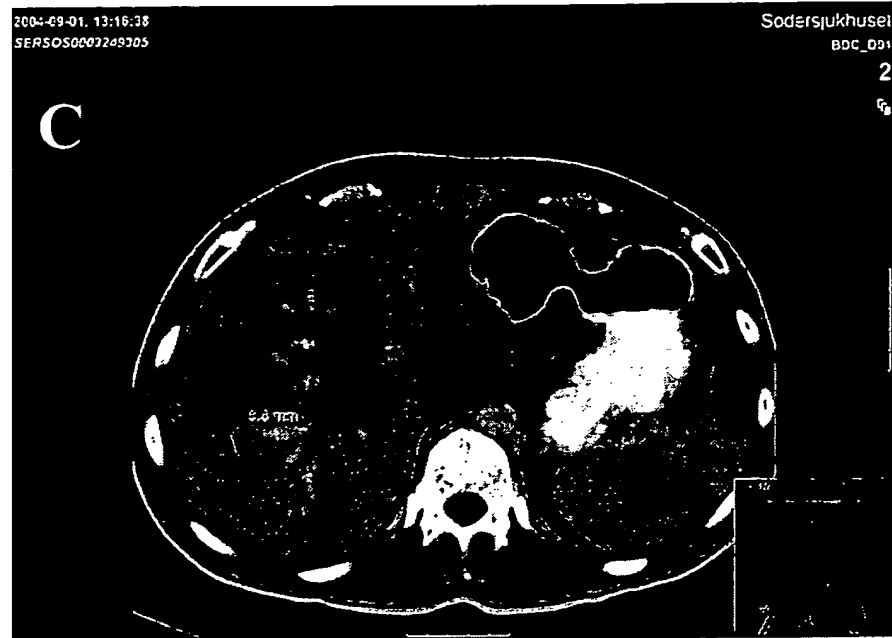


Fig. 9

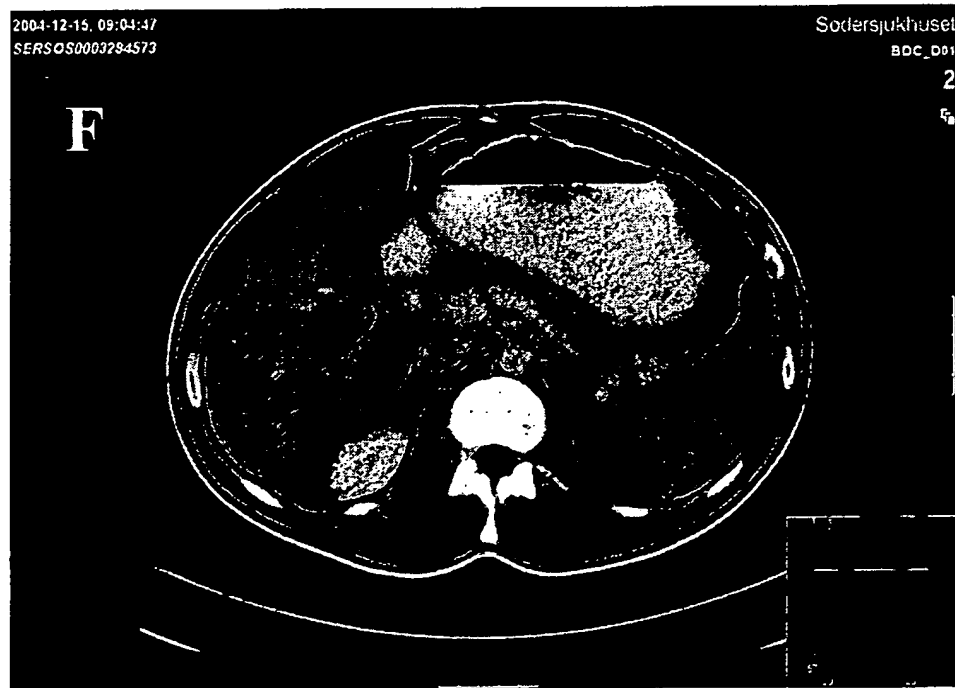
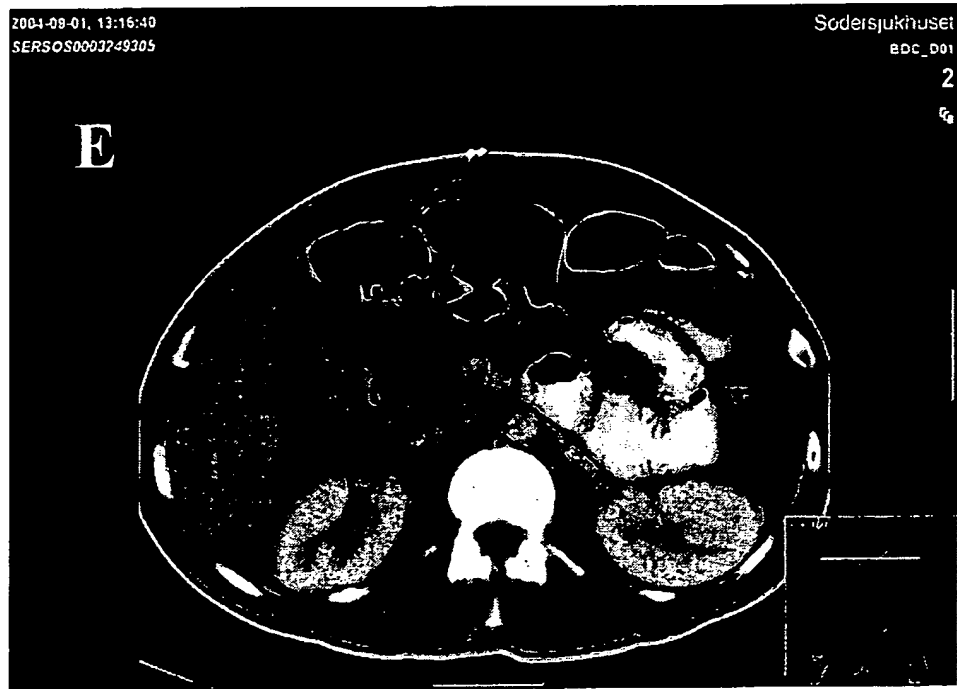


Fig. 9

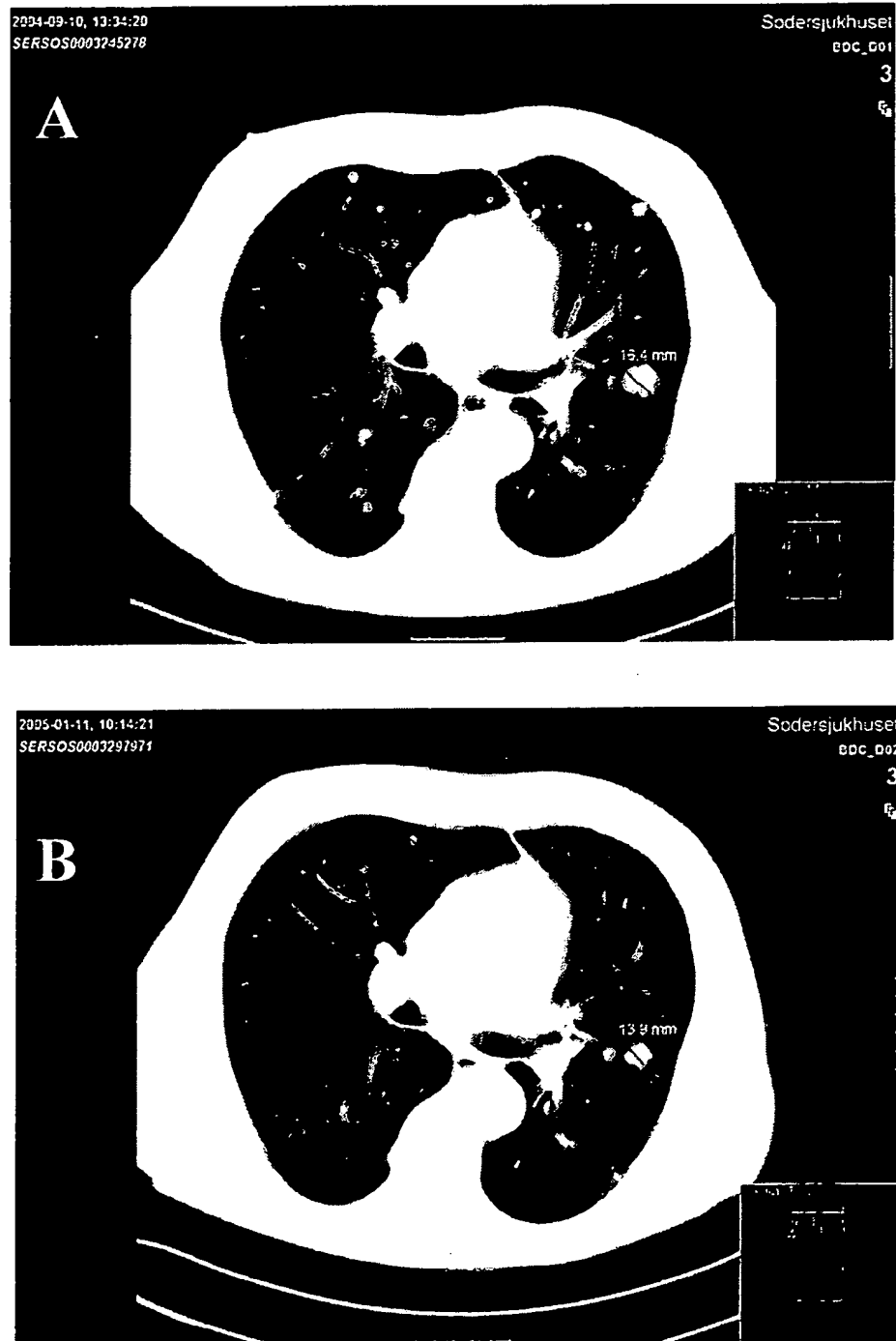


Fig. 10

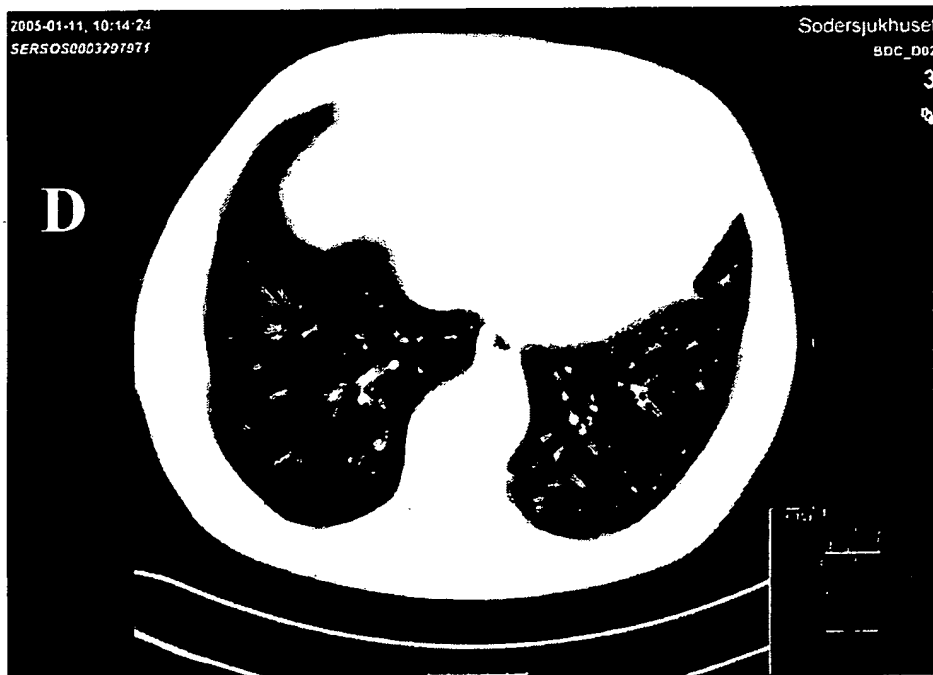


Fig. 10

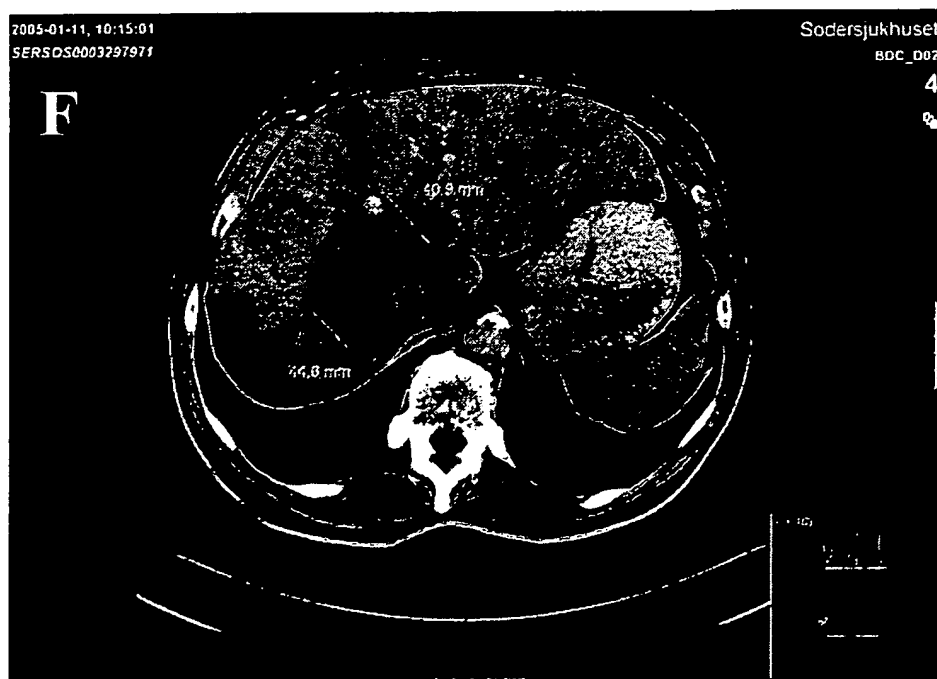
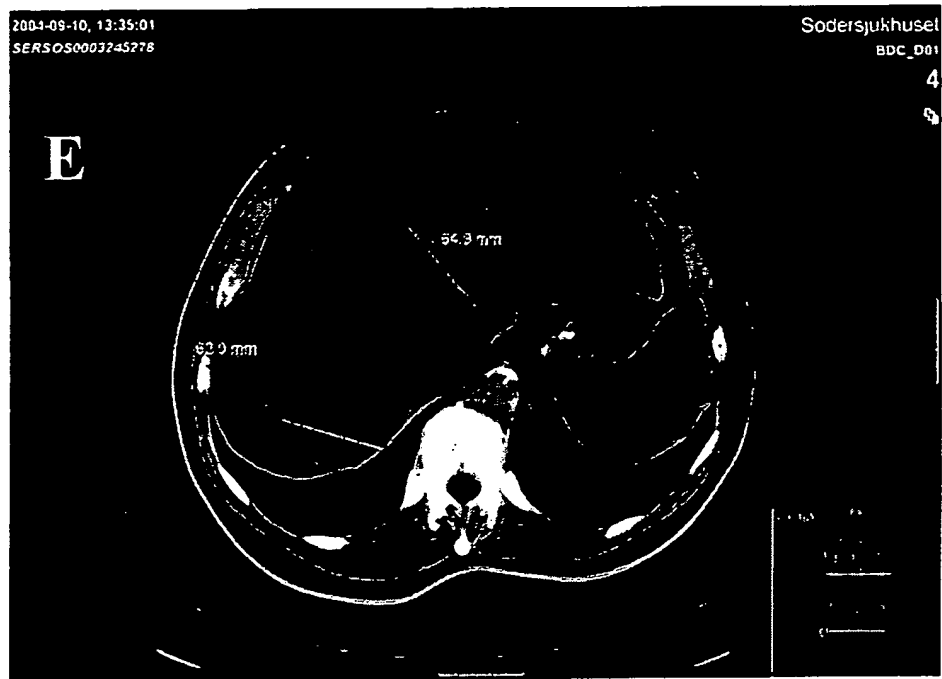


Fig. 10

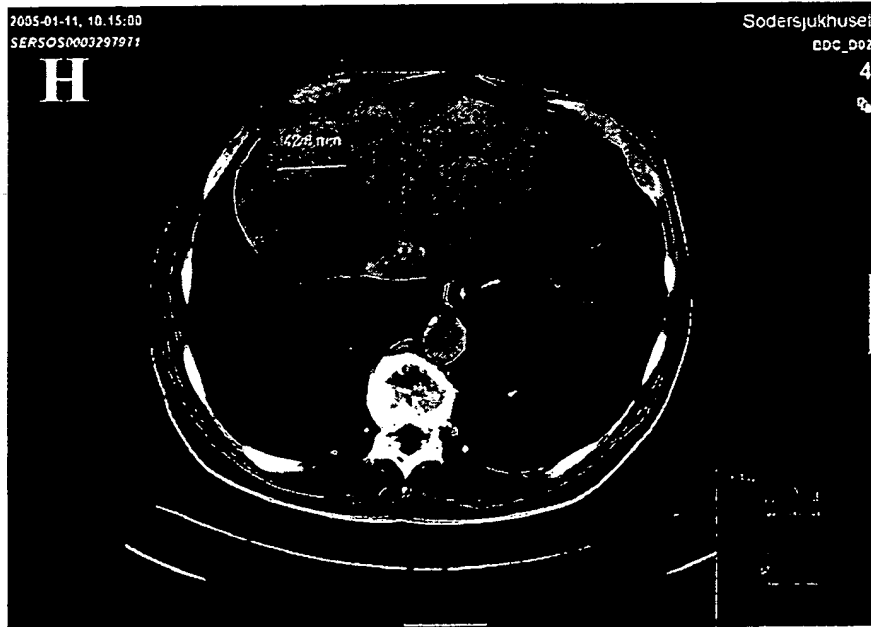
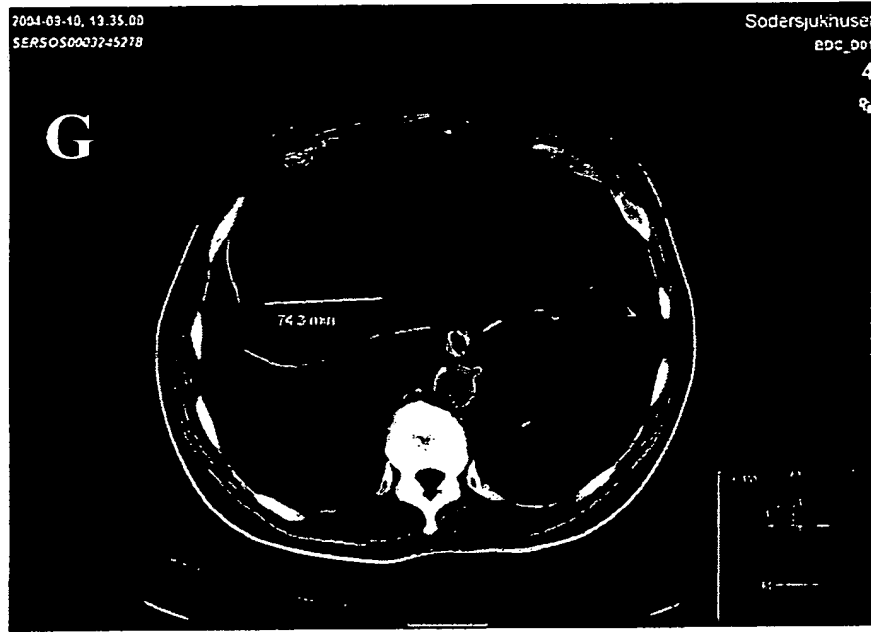
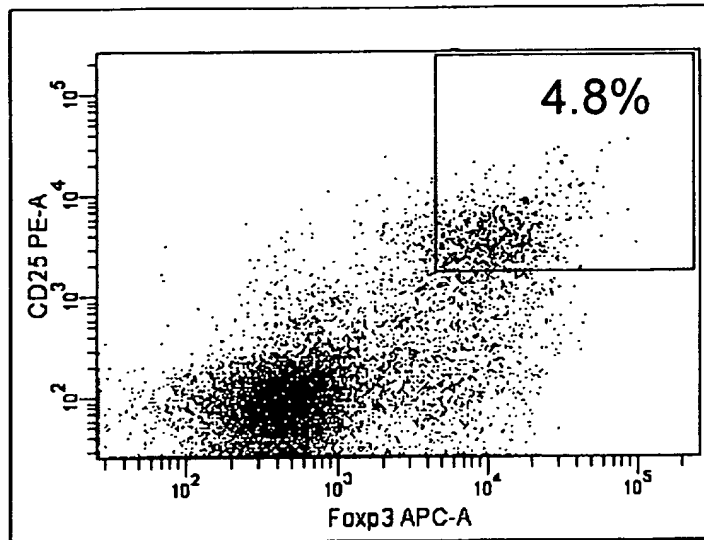


Fig. 10

A: COMEÇO



B: FIM

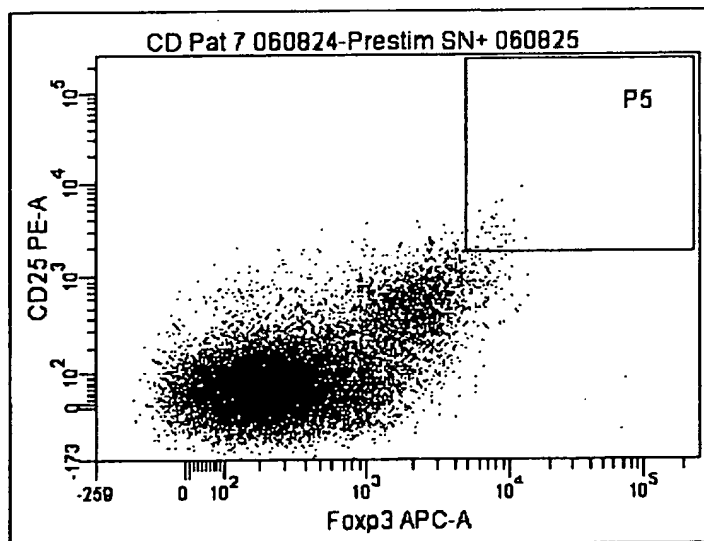


Fig. 11

RESUMO

“MÉTODO PARA A EXPANSÃO DE LINFÓCITOS T AUXILIARES CD4+ E/OU LINFÓCITOS T CD8+ REATIVOS A TUMOR, LINFÓCITO-T REATIVO A TUMOR, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODOS PARA TRATAR UM INDIVÍDUO SOFRENDO DE UMA DOENÇA DE ORIGEM NEOPLÁSICA E PARA REALIZAR A REGRESSÃO DE TUMOR EM UM INDIVÍDUO, USO DE LINFÓCITOS-T REATIVOS A TUMOR, E, KIT”

A presente invenção descreve um método aperfeiçoado para expansão e ativação de linfócitos reativos a tumor, em particular linfócitos-T auxiliar CD4+ e/ou CD8+, que podem ser usados para tratar e/ou evitar câncer. O método fornece elevados números de linfócitos-T reativos a tumor dentro de um curto intervalo de tempo e a possibilidade de direcionar o desenvolvimento de linfócitos-T auxiliar CD4+ e/ou CD8+ para subpopulações específicas. O método compreende uma primeira fase de linfócitos-T auxiliares CD4+ T e/ou CD8+ com antígeno derivado de tumor, junto com pelo menos uma substância tendo atividade agonista em relação ao receptor IL-2, para promover a sobrevivência de linfócitos-T auxiliar CD4+ T e/ou CD8+; e uma segunda fase de ativar e promover o crescimento de linfócitos-T auxiliares CD4+ T e/ou CD8+, em que a segunda fase é iniciada quando o marcador da superfície de célula CD25 (ou marcador IL-2R) é regulado negativamente em linfócitos-T auxiliar CD4+ T e/ou CD8+.