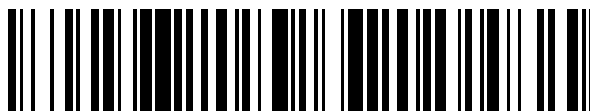


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 762**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2007** **E 07751592 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016** **EP 1996232**

54 Título: **Tratamiento del cáncer combinando agente linfo - reductor con CLTs y citoquinas**

30 Prioridad:

01.03.2006 US 778516 P

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

16.08.2016

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA N.V. (100.0%)
TURNHOUTSEWEG 30
2340 BEERSE, BE**

72 Inventor/es:

**CAI, ZELING;
MORIARTY, ANN;
PETERSON, PER, A. y
RICHARDS, JON, M.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 579 762 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Tratamiento del cáncer combinando agente linfó - reductor con CLTs y citoquinas**Descripción**

5 **[0001]** El invento se refiere a cladribina en calidad de un agente linfó - reductor para su uso en métodos para tratar al cáncer en pacientes, método que involucra la administración de linfocitos citotóxicos T y citoquinas tales como IL-2 e IFN-alfa-2b.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

10 **[0002]** Para facilitar una apreciación del invento, esta sección podría discutir los antecedentes históricos y técnicos que conllevan al desarrollo del invento, incluyendo observaciones, conclusiones y puntos de vista que podrían ser únicos de un inventor. Asimismo, las declaraciones de fondo aquí mencionadas no deberían ser consideradas como una admisión en relación al contenido previo en la industria.

15 **[0003]** Varias terapias han sido desarrolladas para tratar una variedad de cánceres. Muchos de estos esfuerzos se han centrado alrededor de regímenes quimioterapéuticos. En un régimen específico de combinación de quimioterapia diseñado como un tratamiento para melanoma metastásico, se reportaron índices de respuesta de 35-50% con el "régimen de Dartmouth" (una combinación de DTIC, cisplatino, BCNU y tamoxifeno), pero la duración de la supervivencia ha permanecido entre 6 a 10 meses. Índices altos de remisión también han sido reportados para quimioterapias¹ agresivas de dosis de alta intensidad y la repleción de hematopoyesis con trasplantes autólogos de médula ósea. Sin embargo, la duración media de supervivencia fue corta, aproximadamente 4 meses².

20 **[0004]** Se han notado mejoras significativas en la supervivencia, en el rango de algunos años, en un porcentaje pequeño de pacientes de melanoma que experimentan ciertas inmunoterapias. Este incluye inmunoterapias específicas activas con vacunas del cáncer, así como el uso de impulsadores no específicos del sistema inmunológico, tales como la interleucina-2 (IL-2) y el interferón-alfa (IFN- α).³⁻⁵

25 **[0005]** La identificación de antígenos tumorales definidos por células T en el melanoma ha conllevado a ensayos clínicos que usan como objetivo a las células cancerígenas al intentar aumentar la respuesta inmunológica celular específica de antígenos. Este método ha sido el objetivo de muchas estrategias de vacunación en las cuales los antígenos son administrados en un contexto inmunogénico en un intento de inducir a las respuestas potentes de las células T in vivo. Aunque algunas respuestas clínicas han sido observadas en los ensayos de vacunas, la magnitud de la respuesta inducida de células T ha sido generalmente baja, o no ha sido detectable y ha sido poco correlacionado con las respuestas clínicas. La inmunización de pacientes de melanoma con antígenos de cáncer podría incrementar el número de precursores CTL circulatorios; sin embargo, no se ha correlacionado con la regresión tumoral clínica, sugiriendo un defecto en la función o en la activación in vivo.

30 **[0006]** Estudios en modelos tumorales de ratones han demostrado que inmunoterapias adoptivas que involucran la inmunización in vitro de células T específica en relación a uno o más antígenos de tumores, podrían ser eficaces con una toxicidad mínima. Un obstáculo para aplicar esta estrategia al tratamiento de tumores humanos ha sido la identificación de antígenos inmunogénicos que hacen que las células tumorales sean susceptibles a la destrucción regulada por CTL. El aislamiento de células T que reaccionan contra los tumores de pacientes de melanoma, ha conllevado a la identificación de algunos antígenos tumorales (epítopes) a los cuales se dirigen los CTLs. Estos incluyen a la tirosinasa, a MART-1/Melan A, a gp100, y a MAGE. De estos, la tiroquinasa y MART-1 son casi universalmente expresadas en el melanoma y por lo tanto representan a una elección objetiva deseada para inmunoterapia adoptiva.⁶⁻³

35 **[0007]** La terapia adoptiva de células T involucra la remoción de células T del entorno anfitrión donde los mecanismos tolerogénicos están activos in vivo en pacientes de cáncer y esto contribuye a las respuestas inefectivas demostradas en esta población de pacientes. Las células T CD8⁺ podrían ser estimuladas ex vivo para generar a CTLs específicos a antígenos (refiérase a, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6225042). Los primeros métodos de inmunoterapia adoptiva utilizaron linfocitos activados como un tratamiento para varios cánceres.¹⁴ Inicialmente, se utilizaron células eliminadoras activadas por linfocinas (LAK - lymphokine-activated killer), y posteriormente linfocitos que se infiltran en tumores (TIL - tumor-infiltrating lymphocytes), activados ex vivo con IL-2, pero la demostración de la eficacia fue equívoca. Estos ensayos clínicos controlados tempranos no pudieron demostrar una ventaja del uso de células activadas ex vivo por sobre la administración directa de IL-2 a pacientes de melanoma. Estudios más recientes por Yee et al. (Fred Hutchinson Cancer Research Center - Centro de Investigación del Cáncer Fred Hutchinson)¹⁵ y Dudley et al. (NCI)¹⁶ han demostrado el potencial para ciertos métodos adoptivos terapéuticos de células T. Estos estudios involucraron el uso de clones de células de específicos para MART-1 o gp100 y una dosis baja de IL-2, o TILs expandidas ex vivo con células suministradoras alogénicas y altas dosis de IL-2. Estos estudios confirmaron que inmunoterapias adoptivas son prometedoras como tratamientos del cáncer. Aunque su desarrollo completo ha sido impedido por la falta de métodos reproducibles para la generación ex vivo de números terapéuticos de CD8⁺ CTLs de antígenos específicos.¹⁷

60 **[0008]** Las células T CD8⁺ citolíticas son una línea importante de defensa en contra de infecciones virales. Los

linfocitos CD8⁺ reconocen específicamente y lisan a las células anfitrionas que son infectadas con un virus. Aunque sería deseable el cosechar la actividad citotóxica de los CTLs, unos cuantos procedimientos in vitro/ex vivo han estado disponibles para activar específicamente a los CTLs. La identificación de antígenos clave asociados con el melanoma y un método para la activación específica in vitro de CTLs, permite una evaluación eficiente de inmunoterapias adoptivas para el melanoma metastásico.^{15-18.}

[0009] Mientras que es posible utilizar a células que presentan a antígenos (APCs – antigen presenting cells) que ocurren naturalmente para la activación de CD8⁺ in vitro (por ejemplo, células dendríticas, macrófagos, células tumorales autólogas), la eficiencia de la activación es baja puesto que las moléculas MHC de clase I de APCs nativos contienen muchos otros epítopes de péptidos, permitiendo, por lo tanto, una presentación mínima de epítopes de péptidos asociados con tumores. La mayoría de estos péptidos presentados representan a proteínas endógenas inocuas normales. Un método más directo a este problema sería el activar a las células T de CD8⁺ específicamente a aquellos epítopes relevantes que combaten la enfermedad, en este caso específico, los antígenos asociados con el melanoma.

[0010] Recientemente, un APC artificial ha sido desarrollado utilizando una línea celular embrionaria del *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), que expresa a moléculas de clase I del complejo importante de histocompatibilidad (MHC - major histocompatibility complex).^{18, 19} refiérase además a las patentes de Estados Unidos números 6,225,042 y 6,355,479. Puesto que el insecto *Drosophila* no tiene un sistema inmunológico avanzado, los transportadores de péptidos TAP-1,2, que están involucrados en la carga de epítopes de péptidos a las moléculas humanas de clase I, están ausentes. Como resultado, las moléculas transfectadas de clase I aparecen en la superficie celular de la *Drosophila* como contenedores vacíos. Al incubar a estas células transfectadas de *Drosophila* con péptidos sintéticos exógenos que se enlazan a las moléculas específicas de clase I (es decir, epítopes tumorales de péptidos de células T antígenas), todas las moléculas disponibles de clase I podrían estar ocupadas con epítopes de péptidos específicos restringidos por MHC. La expresión de alta densidad de las moléculas de clase I que presentan a epítopes individuales o múltiples, y la adición de las moléculas claves co-estimuladoras B7-1 (CD80), CD70, LFA-3 (CD58), y ICAM-1 (CD54) en estas APCs de *Drosophila* podrían permitir la generación in vitro de células CD8⁺ T citotóxicas autólogas potentes que son específicas para los péptidos antígenicos.²⁰

RESUMEN DEL INVENTO

[0011] Varios aspectos generales y secciones preferidas del invento se reflejan en las reivindicaciones adjuntas a esta especificación.

El invento suministra a cladribina para su uso como un agente linfo-reductor en un método para tratar a un sujeto con la necesidad de tratamiento de cáncer, donde dicho método comprende:

- (a) obtener células CD8⁺ T nativas del sujeto;
- (b) contactar a las células CD8⁺ T nativas con células que presentan a antígenos xenogénicos cargados con uno o más antígenos de péptidos, generando, por lo tanto, a CTLs activados que usan como objetivo a células que expresan a dichos antígenos de péptidos;
- (c) administrar al sujeto los CTLs activados;
- (d) administrar al sujeto por lo menos 2 citoquinas que ejercen persistencia de CTL; y
- (e) administrar cladribina al sujeto.

Donde la administración de cladribina empieza antes de la administración de los CTLs activados.

Este invento suministra además el uso de cladribina como un agente linfo- reductor para la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto con la necesidad de un tratamiento para el cáncer, donde dicho método comprende:

- (a) obtener células CD8⁺ T nativas del sujeto;
- (b) contactar a las células CD8⁺ T nativas con células que presentan a antígenos xenogénicos cargadas con uno o más antígenos de péptidos, generando, por lo tanto, a CTLs activados que usan como objetivo a células que expresan a dichos antígenos de péptidos;
- (c) administrar al sujeto las CTLs activadas;
- (d) administrar al sujeto por lo menos 2 citoquinas que efectúan la persistencia de CTL; y
- (e) administrar cladribina al sujeto.

Donde la administración de cladribina empieza antes de la administración de las CTLs activadas.

[0012] Otras secciones, características y ventajas preferidas, de los varios aspectos del invento se volverán aparentes a partir de la descripción detallada más adelante tomada en conjunto con las figuras de los esquemas.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS ESQUEMAS

[0013]

La figura 1 ilustra la actividad citolítica de los CTLs generados ex vivo dirigidos en contra de las células objetivo cargadas con péptidos. Las células CD8⁺ T aisladas de un paciente con melanoma fueron inmunizadas in vitro con APCs de *Drosophila* cargados con 5 epítopes diferentes de péptidos asociados con el melanoma. Las células CD8⁺ T activadas fueron cultivadas in vitro utilizando a IL-2 e IL-7 para expandir selectivamente a las CTLs específicas de melanoma. La actividad fue evaluada como la lisis específica de células que tienen como objetivo al T2 marcado por ⁵¹Cr cargadas individualmente con cada péptido ((Tyr-1₆₈₉, Tyr-2₇₉₂, gp100-1₈₁₇, gp100-2₈₅₃, o MART-1₈₁₉ vs. Células T2 cargadas con un péptido de control HLA-A2).

La figura 2 suministra una ilustración esquemática de una sección preferida de un régimen de tratamiento de acuerdo al invento junto con un régimen adicional de tratamiento de acuerdo a la presentación y a un régimen de control.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO Y SUS SECCIONES PREFERIDAS

[0014] Los varios aspectos del invento son ilustrados más adelante a través de descripciones detalladas de secciones específicas y preferidas. A menos que se defina de otra forma en este documento o que se vuelva aparente a partir del contexto, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el usado comúnmente en la industria.

[0015] Los términos “incluir”, “comprender” y “contener” son utilizados en este documento en su sentido abierto y no limitante.

[0016] Los regímenes terapéuticos del invento, que comprenden la administración de CTLs que han sido activados al contactar a xAPCs cargados con péptidos seleccionados en conjunto con citoquinas y cladribina como un agente linfo-reductor podrían utilizarse para tratar al cáncer en un sujeto en la necesidad de aquel tratamiento. Preferiblemente, el cáncer es seleccionado de melanomas malignos, mielomas múltiples, cáncer a la próstata, linfoma, linfoma que no es de Hodgkin, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia aguda mieloide, leucemia crónica linfocítica, leucemia mieloide crónica, linfoma de Borkitt, cáncer a las tiroides, cáncer uterino, cáncer al riñón, cáncer al ovario, cáncer al pulmón, cáncer a la mamá, cáncer al hígado, cáncer pancreático, cáncer a la próstata, cáncer al colon, cáncer a la piel, cáncer al estómago y cáncer cervical.

[0017] Por lo tanto, en una sección preferida el invento suministra cladribina para su uso en un régimen adoptivo de terapia de CTL para tratar o reducir un melanoma metastásico de donde el método comprende: obtener células CD8⁺ T nativas de un sujeto; contactar a las células CD8⁺ T nativas con células que portan a antígenos xenogénicos (xAPCs - xenogenic antigen presenting cells) que han sido cargadas con antígenos de péptidos seleccionados, generando, por lo tanto, a CTLs que usan como objetivo a células que expresan al antígeno de péptidos seleccionados; administrar a las CTLs activadas de vuelta al sujeto; administrar cladribina como un agente linfo-reductor; y administrar por lo menos 2 citoquinas que ejercen la persistencia de CTL. El régimen adoptivo de la terapia de CTL utiliza a células CD8⁺ T autólogas que son activadas ex vivo, y que cuando son activadas y administradas a un sujeto de acuerdo con el invento son capaces de una destrucción in vivo, de células tumorales que tienen a epítopes antigénicos asociados con el cáncer.

[0018] El término “sujeto” en este contexto se refiere a un paciente mamífero que necesita el tratamiento de un cáncer. Por ejemplo, un sujeto podría ser un humano diagnosticado con melanoma, tal como un melanoma avanzado maligno, por ejemplo, un paciente que ha sido diagnosticado como HLA-A2 positivo y tiene una etapa III/IV de una enfermedad que no se puede tratar completamente por medio de cirugías.

[0019] El agente CTL es preparado a partir de xAPCs. Células de ejemplo que presentan a antígenos xenogénicos (xAPCs - xenogenic antigen presenting cells) que son adecuadas para su uso podrían incluir a los siguientes componentes: una molécula MHC I exógena; una o más moléculas exógenas de asistencia para dar apoyo a la activación de células T nativas; y células anfitrionas capaces de expresar a las moléculas exógenas en su superficie. Preferiblemente, las moléculas exógenas son codificadas por ácidos nucleicos xenogénicos que han sido introducidos a las células anfitrionas. Las xAPCs también expresan, preferiblemente, a moléculas exógenas co-estimuladoras y de adhesión, que potencian a la capacidad de activación de las células T de las xAPCs. Preferiblemente, las células anfitrionas son células de insectos, más preferiblemente células de *Drosophila*, tales como las células Schneider 2 (S2). Métodos y xAPCs de ejemplo para su fabricación se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 6,225,042 y 6,355,479.

[0020] Las xAPCs podrían estar cargadas con antígenos de péptidos por medio de una variedad de métodos conocidos o que están disponibles en la industria. Los péptidos seleccionados son capaces de enlazarse a las moléculas vacías MHC de clase I. Los péptidos seleccionados corresponden preferiblemente a epítopes que comprenden a secuencias antigénicas o inmunogénicas de aminoácidos derivadas de proteínas expresadas en la superficie de las células, que servirán como objetivos para las células T utilizadas en la terapia CTL adoptiva. Para cargar a moléculas vacías MHC de clase I con el péptido seleccionado, uno o más especies de péptidos antigénicos

o inmunogénicos que se enlazan a aquellas moléculas vacías MHC de clase I podrían ser contactadas con las xAPCs bajo condiciones adecuadas para que ocurran los enlaces.

[0021] Una o más especies antigénicas o inmunogénicas de péptidos podrían ser seleccionadas. Si se selecciona más de una especie, estas podrían ser contactadas con las xAPCs simultáneamente o en instancias distintas, resultando en complejos multi-antigénicos o multi-inmunogénicos de péptidos MHC producidos por los xAPCs.

[0022] Cargar al péptido seleccionado en moléculas MHC vacías ocurre, preferiblemente, bajo condiciones que se aproximan a las condiciones biológicas de los enlaces, que podrían ser aproximadas in vitro, ex vivo o in vivo. Al seleccionar a los péptidos, la persona con conocimiento en la industria podría considerar uno o más factores tales como consideraciones termodinámicas, electrostáticas, energéticas y entrópicas, así como aminoácidos específicos dentro de péptidos seleccionados que son requeridos para enlaces eficaces de moléculas MHC.

[0023] Péptidos preferidos incluyen a, por ejemplo, los péptidos correspondientes a secuencias de aminoácidos seleccionadas de la proteína tirosinasa, una proteína gp100 y una proteína MART-1. Otros péptidos preferidos incluyen a YMNGTMSQV (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1), YMDGTMSQV (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2), AAGIGILTV (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 3), ITDQVPFSV (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 4), YLEPGPVTA (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 5), y KTWGQYWQV (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 6). Péptidos adicionales de ejemplo que podrían ser seleccionados incluyen a, por ejemplo, las siguientes secuencias de aminoácidos, en las cuales la proteína de la cual se deriva a cada péptido es indicada entre paréntesis: SILSLKEAST (C-Lectina; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 70), KMASRSMRL (C-Lectina; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 71), ALALAALLVV (Pec 60; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 72), ALLVVDREV (Pec60; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 73), YMNGTMSQV (Tirosinasa; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 74), YMDGTMSQV (Tirosinasa; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 75), ITDQVPFSV (gp100; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 7), YLEPGPVTA (gp100; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 8), AAGIGILTV (MART-1; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 9), ELAGIGILTV (MART-1; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 10), CLTSTVQLV (Her-2/neu; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 11), HLYQGCQVV (Her-2/neu; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 12), KIFGSLAFL (Her-2/neu; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 13), IISAVVGIL (Her-2/neu; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 14), PLTSIISAV (Her-2/neu; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 15), VMAGVGSPYV (Her-2/neu; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 16), VLVKSPNHV (Her-2/neu; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 17), ELVSEFSRM (Her-2/neu; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 18), YLSGANLNL (CEA; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 19), GPLTPLPV (AES; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 20), SLLMWITQC (NY-ESO-1; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 21), KALFAGPPV (CA-125; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 22), YLETFREQV (CA-125; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 23), GLQSPKSPL (CA-125; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 24), VLLKLRRPV (CA-125; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 25), ELYPSVDL (CA-125; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 26), SLLMWITQV (NY-ESO-1; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 27), ILAKFLHWL (Telomerasa; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 28), STAPPVHN (MUC-1; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 29), FLWGPRALV (MAGE-3; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 30), FMWGNLTLA (CA-125; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 31), RLVDDFLLV (Telomerasa; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 32), HLSTAFARV (G250; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 33), QLSLLMWIT (NY-ESO-1; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 34), ELWTHSYKV (FBP; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 35), KVAELVHFL (MAGE-3; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 36), YIFATCLGL (MAGE-3; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 37), HLYIFATCL (MAGE-3; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 38), MLMAQEALAF (CAMELLO (CAMEL); IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 39), STLEKINKT (SSX-4; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 40), KASEKIFYV (SSX-2; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 41), SLLMWITQCFL (NY-ESO-1; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 42), ELTLGEFLKL (Survivina; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 43), LTLGEFLKL (Survivina; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 44), SLLEKREKT (SP17; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 45), TLGEDDPWL (SART-1; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 46), KLGLKPLEV (SART-1; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 47), YLWTSKNT (SCP-1; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 48), STAPPAHGV (MUC-1; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 49), GMGSEELRL (LIVINA; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 50), SLGSPVLGL (LIVINA; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 51), YLFFYRKSV (hTRT; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 52), CQQEETFL (CA-125; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 53), TLAKFSPYL (PRAME; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 54), NLTHVLYPV (PRAME; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 55), STFKNWPFL (Survivina; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 56), SLLQHLIGL (PRAME; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 57), FLDQRVFFV (gp100; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 58), FLDQRVFV (gp100; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 59), FLDQVAFV (gp100; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 60), GLDREQLYL (MUC-16; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 61), VMQHLLSPL (MUC-16; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 62), QQTHGITRL (MUC-16; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 63), LQPLSGPGL (MUC-16; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 64), TLDRLSLYV (MUC-16; IDENTIFICACIÓN

SECUENCIAL NÚMERO: 65), QLYLELSQL (MUC-16; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 66), KVLEYVIKV (MAGE-1; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 67), KVADLVGFL (MAGE-1; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 68), y KTWGQYWQV (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 69).

[0024] Los péptidos seleccionados podrían ser presentados a las células por medio de una variedad de sistemas y de métodos en la industria. Los péptidos seleccionados podrían ser presentados en una forma que les permite ingresar a un grupo intracelular de péptidos. Por ejemplo, los péptidos podría ser presentados por medio de cargas osmóticas. Preferiblemente, los péptidos son agregados al medio del cultivo del sistema de las xAPCs. Los péptidos podrían ser agregados al medio de cultivo en la forma de un polipéptido o una proteína intacta que es degradada subsiguientemente por medio de procesos celulares, tales como, por ejemplo, una degradación enzimática. Alternamente, el polipéptido o la proteína intacta podría ser degradada por medio de otros sistemas tales como una digestión química (por ejemplo, bromuro de cianógeno) o proteasas (por ejemplo, tripsina y quimiotripsina) antes de la adición al medio de cultivo del sistema xAPCs. Alternamente, la secuencia completa de proteína o de polipéptido podría ser clonada a un vector apropiado e insertada en una célula procariota, la cual genera un monto significativo del polipéptido antigénico que es cosechado, purificado y digerido a péptidos que son agregados entonces al medio de cultivo del sistema xAPC.

[0025] Un monto suficiente de cada péptido seleccionado podría ser agregado al cultivo celular para permitir a las moléculas MHC de clase I enlazarse y presentar subsiguientemente a una densidad grande del péptido en la superficie de células que expresan a MHC humana de clase I.

[0026] Las xAPCs pueden ser expuestas a ensayos para detectar funciones mejoradas de APCs en comparación a la función APC de células que presentan a antígenos no xenogénicos o endógenos. La función APC mejorada podría determinarse al medir a cualquiera de una variedad de parámetros de la activación de las células CD8⁺ T, tal como, por ejemplo, el nivel de una o más expresiones proteínicas de la superficie celular, que sea un indicador de la activación de las células CD8⁺ T, tal como la expresión de la superficie de las células CD69, el nivel de diferenciación, el nivel de capacidad de eliminación citotóxica, el nivel de lisis celular específica, y el nivel de producción de citoquinas.

[0027] La purificación de proteínas y péptidos puede lograrse a través de varias técnicas que son conocidas en la industria, tales como la cromatografía de inmutafinidad, la cromatografía de afinidad, la precipitación proteínica, intercambios de amortiguadores, cromatografía de intercambio de iones, la cromatografía de interacción hidrofóbica, la cromatografía de exclusión por tamaño. Los CTLs estimulados por antígenos podrían ser detectados o aislados por medio de coloración de tetrámeros de péptidos MHC pMHC, donde los CTLs detectados son específicos para un péptido seleccionado que es presentado por las xAPCs.

[0028] Los leucocitos sanguíneos periféricos (PBLs - peripheral blood leukocytes) son obtenidos de un sujeto, y son preferiblemente, purificados sustancialmente. Los métodos para la purificación de los PBLs incluyen, métodos que utilizan agravantes de Ficoll. Los PBLs purificados son mezclados entonces con células xAPCs pre incubadas con los péptidos antigénicos apropiados. Los PBLs, preferiblemente, son purificados por medio de sistemas de purificación de micropartículas magnéticas que son comunes en la industria, tales como microesferas de Miltenyi (Myltenyi Biotec) y sistemas de Dynabead (Dynal Biotec). Los PBLs también podrían ser purificados por medio de procedimientos de organización celular, tal como los métodos que se basan en la organización celular asistida por fluorescencia (FACS - fluorescence assisted cell sorter), u otros dispositivos y metodologías apropiados de organización celular. Aquellos métodos de organización celular o de organización de células de glóbulos rojos usando proteínas fluorescentes verdes (GFP - green fluorescent protein) como un marcador para varias proteínas de células específicas.

[0029] Células T nativas son incubadas en cultivos con las xAPCs apropiadas y cargadas con péptidos seleccionados para un periodo de tiempo suficiente para activar y enriquecer además a una población de células CD8⁺. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos número 4,690,915 describe un método para obtener números grandes de linfocitos por medio de linfocitoféresis. Preferiblemente, las células CD8⁺ son activadas en una forma específica para antígenos. La tasa de células CD8⁺ (ejecutoras) de descanso o precursoras en relación a células que presentan antígenos podría variar de individuo a individuo y podría depender además de variables tales como la susceptibilidad de los linfocitos de un individuo, las condiciones de cultivo y la naturaleza y la gravedad del cáncer. Preferiblemente, sin embargo, la tasa de linfocitos:células que presentan antígenos (por ejemplo, la célula de la Drosophila) está preferiblemente en el rango de alrededor de 30:1 a 300:1. Por ejemplo, en una sección, 3x10⁷ PBL humanos y 1x10⁶ células vivas de Drosophila son mezcladas y mantenidas en 20 ml de un medio de cultivo de RPMI 1640.

[0030] El ejecutor/cultivo que presenta a antígenos podría mantenerse por un tiempo tan largo como fuese necesario para activar y enriquecer a una población de un número terapéuticamente útil o efectivo de células CD8⁺. Con un nivel máximo de activación específica de CD8⁺ que se observa generalmente después de 1 a 10 días de cultivo, por ejemplo, después de 5 días de cultivo, un tiempo preferido es desde alrededor de 3 a 7 días. En una sección de este invento, la activación in vitro de las células CD8⁺ T podría detectarse dentro de un periodo breve de tiempo después de la transfección de una línea celular. En una sección, la expresión transitoria en una línea celular transfectada

capaz de activar a las células CD8⁺ T es detectable en las 48 primeras horas de transfección. Por lo tanto, cultivos transitorios de células transformadas que expresan a moléculas MHC humanas de clase I son efectivas para activar a las células CD8⁺ T.

[0031] Los linfocitos citotóxicos T activados podrían ser separados efectivamente de las xAPCs (por ejemplo, células de *Drosophila*) utilizando un método adecuado conocido y disponible en la industria. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos para las APCs artificiales, para los péptidos cargados en las APCs artificiales, o para los CTLs (o uno de sus segmentos) podrían ser utilizados para enlazar a su ligando complementario apropiado. Las células marcadas con anticuerpos podrían ser extraídas de la mezcla celular estimulador-ejecutor por medio de una variedad de métodos en la industria, tales como, por ejemplo, métodos de inmunoprecipitaciones e inmunoensayos. Alternamente, un paso de separación podría omitirse completamente y las xAPCs desactivadas podrían ser dejadas en el cultivo con los CTLs activados.

[0032] Montos citotóxicos terapéuticamente efectivos de los CTLs activados podrían ser seleccionados como adecuados para su uso descrito in vitro e in vivo, por ejemplo, en vista del monto y el tipo de las células que son el blanco principal de estas células CTL. El monto también será seleccionado en vista de la condición del paciente y podría determinarse por el profesional de la salud en base a consideraciones de todos los factores apropiados. Preferiblemente, alrededor de 1×10^6 alrededor de 1×10^{12} , más preferiblemente desde alrededor de 1×10^6 alrededor de 1×10^{11} , y aún más preferiblemente desde alrededor de 1×10^9 a alrededor de 1×10^{10} células CD8⁺ activadas son utilizadas para adultos humanos, en comparación de alrededor de 5×10^6 - 5×10^7 células utilizadas en ratones.

[0033] Preferiblemente, las células CD8⁺ activadas, que son CTLs, son cosechadas tal como se describió anteriormente a partir del cultivo xAPC antes de la administración de las células CTLs al individuo que está siendo tratado. El sistema de cultivos celulares es preferiblemente no tumoral. Por lo tanto, si existe una separación completa de las células de *Drosophila* y las células CD8⁺ activadas no se logra, no debería existir ningún daño inherente asociado con la administración de un número pequeño de células de *Drosophila*.

[0034] Células CD4⁺ nativas o células CD8⁺ T, o ambos tipos de célula, podrían extraerse preferiblemente de un sujeto antes de la incubación con los cultivos xAPC. Los sujetos podrían experimentar una variedad de procedimientos conocidos o disponibles de separación de células sanguíneas (por ejemplo, la leucoféresis) para recaudar glóbulos blancos.

[0035] Las células T nativas podrían ser cultivadas de un sujeto antes de la iniciación de otro tratamiento o terapia que pudiese interferir con, atenuar, o limitar de cualquier forma, a la activación de métodos y usos de las células T nativas tal como se indica o se requiere por este invento. Por ejemplo, en el tratamiento de un individuo con una neoplasia o un tumor, una muestra de células T nativas podría obtenerse antes de la iniciación de un tratamiento de quimioterapia o radiación y podrían mantenerse en el cultivo. Después de que las células T nativas sean activadas con las xAPCs cargadas con péptidos, las células T nativas podrían expandirse y activarse, y los CTLs activados podrían ser introducidos de vuelta al sujeto. Alternamente, las células T nativas podrían ser activadas, y las CTLs activadas podrían ser introducidas de vuelta al sujeto de quien las células T nativas fueron obtenidas antes, después, o en conjunto con otras formas opcionales de tratamiento, tales como quimioterapia o radiación.

[0036] Las CTLs activadas también podrían ser suspendidas en un vehículo apropiado para su entrega e infusión en un sujeto. Técnicas para reintroducir a componentes celulares son conocidas en la industria e incluyen procedimientos tales como aquellos ejemplificados en las patentes de Estados Unidos números 4,844,893 y 4,690,915. Por ejemplo, podría utilizarse la administración de células de CTLs activadas por medio de infusiones intravenosas. Varias infusiones podrían ser requeridas, y estas infusiones podrían ocurrir durante un período de algunas semanas o más.

[0037] En los regímenes de tratamiento del invento, las citoquinas también son administradas para obtener persistencia CTL y mejorar, por lo tanto, las propiedades de vida media, actividad, potencia y/o selectividad de los CTLs que son administrados a un sujeto. Aquella persistencia podría resultar de un efecto directo en los CTLs o de un efecto indirecto que involucra la regulación-incremento de la expresión antigénica de células objetivo de los CTLs. Las citoquinas preferidas son las IFN- α -2b y IL-2.

[0038] La cladribina (2-CdA, Leustatin[®]) también es administrada como un agente linfo-reductor en el régimen de tratamiento del invento. DAB IL-2 (ONTAK[®]) es administrado como un agente linfo-reductor en regímenes de tratamiento de la presentación. Estos agentes no son mieloblásticos y provocan una inmunosupresión transitoria en sujetos que reciben la terapia de CTL.

[0039] La programación y duración de la administración de cada uno de los agentes CTL, citoquinas y linfo-reductores podría seleccionarse por una persona con conocimiento en la industria basándose en experimentación rutinaria y la guía aquí indicada, incluyendo a los ejemplos a continuación.

[0040] Para ilustrar varios aspectos y características del invento, se suministran a los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Preparación ex-vivo de CTLs

5 **[0041]** Las líneas APC xenogénicas (xAPC - Xenogenic APC) son generadas a partir de células Schneider S2 (células S2), que fueron establecidas en 1969 a partir de algunos cientos de embriones (ATCC CRL-1963) de *Drosophila melanogaster* (Oregon-R) Oregon-R (de tipo silvestre) que tenían de 20 a 24 horas de edad, de acuerdo a los procedimientos publicados (Schneider, J. Embryol. Morph. 27:353-365,1972). La línea celular S2 ha sido depositada con la colección americana de tipos de cultivo (CRL10974). El suministro original de células S2 utilizadas para derivar a las líneas celulares de las cuales se deriva a las xAPCs se obtienen de esta fuente. Para generar a xAPCs, células S2 son transfectadas con vectores derivados del vector de plásmidos pRMHa-3 (refiérase a, por ejemplo, la patente de Estados Unidos número 6,225,042). Una línea xAPC, designada como el clon A, es transfectada con vectores que codifican a HLA-A2.1 clase I, B7.1 y ICAM-1. Una 2ª línea xAPC, designada el clon B, es transfectada con vectores que codifican a HLA-A2.1 clase I, B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA-3. Una 3ª línea xAPC, designada como el clon C, es transfectada con vectores que codifican a HLA-A2.1 clase I, B7.1, ICAM-1, LFA-3, y CD70. Por lo tanto, el clon A expresa a HLA-A2, B7.1, y ICAM-1, el clon B expresa a HLA-A2.1 clase I, B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA-3, y el clon C expresa HLA-A2.1 clase I, B7.1, ICAM-1, LFA-3, y CD70. B7.2 y LFA-3.

20 **[0042]** Cultivos independientes continuos del clon A- y células que descienden del clon B son mantenidas en un medio de Schneider suplementado con un 10% de suero fetal de ternero y 500 µg/mililitro de geneticina (G418) y son divididos 2 veces a la semana con medio fresco agregado durante cada división para ajustar a la densidad celular a aproximadamente 1×10^6 células/mililitro. Aproximadamente un día antes de la inducción (el día -2 al -4; donde se define al día cero como el día en que las células son examinadas para detectar la expresión de moléculas exógenas y que son cargadas con péptidos), 3 x T75 matraces son inoculados con un volumen de suspensión celular mantenida en cultivos almacenados equivalentes a 1.5×10^7 células/matraz. Un medio completo de *Drosophila*-SFM sin G418 es agregado para tener un volumen de 15 ml/matraz. Los matraces son incubados entonces en una cámara a aproximadamente 27 °C. En aproximadamente el día -1 al -3, las células son inducidas entonces por medio de la adición de sulfato de cobre (CuSO₄) a una concentración final de 1.0 mM (dilución de 1:200 de 200 mM almacenado de CuSO₄; 75 µl de CuSO₄ para cada matraz T75 que contenga 15 ml de suspensión celular) y se regresa a la cámara a 27 °C. El tiempo de inducción dura aproximadamente de 24 a 72 horas.

35 **[0043]** En el día cero, matraces que contienen a cultivos inducidos celulares son revisados visualmente y microscópicamente para detectar evidencias de contaminaciones. Los matraces no contaminados son agrupados y las células viables son contadas. Las muestras de cultivos agrupados de células de aproximadamente 6×10^6 células son evaluadas mediante citometría de flujos utilizando un análisis de organización celular asistida por fluorescencia (FACS - fluorescence assisted cell sorter) para determinar el nivel de expresión de las moléculas exógenas. Los cultivos celulares (aproximadamente 1×10^7 células/mililitro) son probadas entonces para verificar la expresión exógena de HLA-A2.1, B7.1 e ICAM-1 (para las células del clon A) o HLA-A2.1, B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA-3 (para las células del clon B) antes de la carga de péptidos. Una vez que la expresión de moléculas exógenas es verificada, cada cultivo celular es lavado dividiendo a cada cultivo en 2 tubos cónicos estériles de 50 ml. Cada tubo es llenado entonces con un medio de insectos HYQ SFX (Hyclone) y centrifugado a 1700 revoluciones por minuto (600 x g) durante aproximadamente 7 minutos para poner a las células en peletes. Los sobrenadantes son descartados, y los tubos que contienen a los peletes celulares son centrifugados nuevamente a 1700 revoluciones por minuto (600 x g) durante aproximadamente un minuto. Los sobrenadantes son removidos con una pipeta de punta fina. Los peletes de cada cultivo celular dividido son recombinados entonces y re-suspendidos en 8 ml de medio de insectos SFX a una densidad celular de aproximadamente 1×10^7 células/mililitro. Aproximadamente, 40 µl de una solución almacenada de microglobulinas β2 a 1.0 mg/mililitro y 24 µl de una dilución 1:50 de una solución combinada de péptidos almacenados a 1.67 miligramos/mililitro para cada péptido es agregada a cada cultivo re-suspendido. Por lo tanto, cada una de las suspensiones del cultivo contiene a microglobulina β2 a una concentración final de aproximadamente 5 µg/mililitros y cada péptido seleccionado que va ser cargado en las xAPCs a una concentración final de aproximadamente 0.1 µg/mililitros por péptido. Los cultivos celulares son incubados en la suspensión conteniendo a microglobulina β2 y a péptidos durante por lo menos 4 horas, y no más que 8 horas, con un arremolinado cada 30 minutos a la temperatura del cuarto. Después del período de incubación de péptidos, porciones de aproximadamente 1 ml de cada cultivo celular son distribuidos por separado en 8 tubos de polipropileno (Falcon 2006). Cualquier suspensión residual de cultivo celular es descartada.

60 **[0044]** Las células CD8⁺ aisladas de muestras de leucoféresis por medio de la selección positiva con un anticuerpo anti-CD8 son estimuladas en contra de péptidos asociados con melanoma humano (tirosinasa-689369-377, tirosinasa -792369-377, MART-1-81927-35, gp100-817209-217, gp100-818280-288 y gp100-853154-162) presentadas por células de *Drosophila* que expresan a moléculas de co- estimulación/adhesión de clase I humanas HLA-A2.1, B7.1, CD70, LFA-3 y ICAM-1. Las células CD8⁺ son estimuladas durante 2 rondas con monocitos autónomos (pulsadas con los epítopes descritos) en la presencia de IL-2 e IL-7. El número de células ejecutoras es incrementado entonces por medio de estimulaciones no específicas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 en la presencia de células alimentadoras autólogas irradiadas por gama e IL-2. La actividad citotóxica de los linfocitos T es medida en contra de las células T2 cargadas por péptidos y un panel de células de melanoma, mientras que la

pureza de las células CD8⁺ T estimuladas in vitro es evaluada por medio de una citometría de flujo.

Materiales.

5 [0045]

Línea celular	Fuente
Drosophila S2	ATCC
Malme 3	ATCC (fibroblastos normales de la piel de un paciente de melanoma)
Malme 3M	ATCC (melanoma metastásico del pulmón, del mismo paciente que en Malme 3)
M14	USCD: refiérase a US 5,208,146 y Cahan et al., PNAS EE.UU. 1982, vol. 79(24), pp. 7629-7633 (HLA-A2.1 melanoma humana)
01-KN	US 5,208,146 y Cahan et al., PNAS EE.UU. 1982, vol. 79(24), pp. 7629-7633 (melanoma humano HLA-A2.1)
K562	J&JPRD; refiérase a US 2004-0071671 (línea celular de melanoma HLA-A2.1, negativo para antígenos de melanoma)
Células T2	ATCC (negativo de linfoblástica B y T híbridos humanos de clase II)

25 *Reactivos*

[0046] *rhIL-7*. Interleucina-7 (IL-7) recombinante humana es una linfoquina producida en el E. Coli y purificada por el proveedor (PeproTech) utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC - high performance liquid chromatography) pero no a anticuerpos. IL/7, recibido como polvo, es diluida en DPBS estéril que contiene 1% de albúmina sérica humana. La solución aglutinada es filtrada entonces a través de un filtro de 0.2 micrómetros, dividida (30,000 U/mililitro, una concentración de 1000X) a matraces estériles, y almacenada a -80 °C antes de ser usada.

[0047] *rhIL-2*. Interleucina-2 (IL-2) recombinante humana es producida por medio de tecnología recombinante de ADN y suministrada por Chiron Corporation (Proleukin®). IL-2, recibida como polvo, es diluida en un diluyente de IL-2 (0.5 por ciento de albúmina sérica humana en 50 mM de ácido acético), filtrada a través de un filtro de 0.2 micrómetros, dividida en matraces estériles (20,000 U/mililitro, una concentración de 1000X), y almacenada entonces a -80 °C antes de su uso.

[0048] Péptido *YMNGTMSQV* de tirosinasa (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1). Un péptido de tirosinasa (tyr (tyrosinase) 369-377), que corresponde a los aminoácidos 369-377 de tirosinasa humana, es fabricada y purificada utilizando estándares de cumplimiento de GLP (Synpep Corporation). El polvo de péptidos tal como es recibido del fabricante (Synpep Corporation) es disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) para elaborar una solución de péptidos almacenada a una concentración de 10 mg/mililitro, y almacenada a -72 °C a -88 °C antes de su uso. Esta solución almacenada de péptidos es mezclada en partes iguales con otras soluciones almacenadas de péptidos (también a una concentración de 10 mg/mililitro) para generar soluciones de péptidos combinadas para su uso en la carga de xAPCs. Las soluciones combinadas de péptidos son divididas en matraces estériles en un cuarto limpio de clase 10,000 bajo condiciones asépticas en un gabinete de bioseguridad de clase II.

[0049] Péptido *YMDGTMSQV* de tirosinasa (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2). Una forma deamidada del péptido tyr 369-377 descrito anteriormente, que contiene a un residuo de ácido aspártico en lugar de un residuo de asparisina en la posición 3 del péptido, es fabricado y purificado utilizando estándares de cumplimiento de GLP (Synpep Corporation). Esta forma de deamidación es denominada tyr 369-377d. El polvo del péptido recibido del fabricante es disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) para elaborar una solución almacenada de péptidos a una concentración de 10 mg/mililitro, y almacenada a un rango que va desde -72 °C a -88 °C antes de su uso.

[0050] Péptido *ITDQVPFSV gp100* (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 4). Un péptido gp100 (gp100209-217), que corresponde a los aminoácidos 209-217 del gp-100, es fabricado y purificado utilizando los estándares de cumplimiento GLP (Synpep Corporation). El polvo del péptido es disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) para elaborar la solución de péptidos almacenada a una concentración de 10 mg/mililitro, y se guarda a -72 °C a -88 °C antes de su uso.

[0051] Péptido *KTWGQYWQY gp100* (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 6). Un péptido gp100 (gp100154-162), que corresponde a los aminoácidos 154-162 de gp100 humana, es fabricado y purificado utilizando a estándares de cumplimiento de GLP. El polvo del péptido tal como es recibido de Synpep Corporation es disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) para elaborar una solución almacenada de péptidos a una concentración de 10 mg/mililitro, y almacenada a desde el 2 °C a -88 °C antes de su uso.

[0052] Péptido *YLEPGPVTA* de *gp100* (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 5). Un péptido de *gp100* (*gp100*280-288), que corresponde a los aminoácidos 280-288 de *gp100* humano, es fabricado y purificado utilizando estándares de cumplimiento GLP por Synpep Corporation. El polvo de péptidos es disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) para elaborar una solución almacenada de péptidos a una concentración de 10 mg/mililitro, y es almacenada a -72 °C a -88 °C antes de su uso.

[0053] Péptido *AAGIGILTV* de *MART-1* (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 3). Un péptido de *MART-1* (*MART-1*27-35), que corresponde a los aminoácidos 27-35 de *MART-1* humano, es fabricado y purificado utilizando estándares de cumplimiento GLP (Synpep Corporation). El polvo de péptidos es disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) para elaborar a una solución almacenada de péptidos a una concentración de 10 mg/mililitro, y almacenada -72 °C a -88 °C antes de su uso.

[0054] *M-450* de *DYNABEADS®*. Los IgGs *M-450* de *DYNABEADS®* (SAM) son micropartículas paramagnéticas cubiertas con un IgG policlónal de oveja anti-ratón que se enlaza a la IgG primaria de ratón. *DYNABEADS*, disponibles de Baxter Oncology Inc., son almacenadas a 4 °C antes de su uso en el aislamiento de las células T usando al selector celular magnético Isolex 300i.

[0055] Albúmina sérica humana. Un 25% de HSA, USP (Baxter Fenwal Laboratories); la fuente de plasma para cada lote demostró ser negativa para VIH-1 VIH-2, HCV, y HBV), es almacenada a la temperatura del cuarto antes de su uso como una fuente de proteína amortiguada durante la siguiente preparación de células T y el paso de activación: purificación de las células CD8⁺ T y de las células CD8⁻ T; carga de péptidos de las células adherentes; y formulación final de células T activadas.

[0056] El anticuerpo anti-CD-8. El anticuerpo monoclonal anti-CD8 (37B1A) es un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido en contra del antígeno CD8 de las células T, que es utilizado para seleccionar a las células CD8⁺ T con el sistema magnético selector de células Isolex 300i. La solución concentrada es diluida en DPBS estéril para su uso en el aislamiento de las células CD8⁺ T o los procesos de activación. La solución aglutinada es filtrada a través de un filtro de 0.2 micrómetros y luego es dividida en matraces de un sólo uso en un cuarto limpio de clase 10,000 bajo condiciones asépticas en un gabinete de bioseguridad de clase II. Las porciones (10.0 miligramos/mililitro) son almacenadas a -80 °C antes de su uso.

[0057] Péptido de cadena alfa CD8 - *AAEGLDTQRFSG* (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 76). El péptido de cadena ligera alfa CD8 (*AAEGLDTQRFSG* (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 76)) es purificado y fabricado bajo normas de cumplimiento GLP. El péptido de cadena alfa CD8 es utilizado en los procesos de aislamiento de las células CD8⁺ T para liberar a las células CD8⁺ T capturadas utilizando al anticuerpo CD8 (37B1A) y el selector celular magnético Isolex 300i. Cada lote de péptidos es fabricado por Synpep Corporation para cumplir con los estándares de nivel farmacéutico, y es probado para detectar secuencias de péptidos, la pureza, la masa molecular y la apariencia. El péptido de cadena alfa CD8, recibido en forma de polvo, es procesado aún más para crear a una solución almacenada de 10 mg/mililitros. Esta solución almacenada es diluida en DPBS, filtrada a través de un filtro de 0.2 micrómetros, dividida en matraces estériles, y almacenada a -72 °C a -88 °C antes de su uso. La colocación en matraces del reactivo de péptidos es realizada en un cuarto limpio de clase 10,000 bajo condiciones asépticas en un gabinete de bioseguridad de clase II.

[0058] *Microglobulina β2M humana*. Una concentración de microglobulina beta-2 humana (β2M) producida por tecnología recombinante de ADN es diluida en DPBS estéril para conseguir una concentración de 1.0 mg/mililitro. La solución aglutinada es filtrada entonces a través de un filtro de 0.2 micrómetros, dividida en matraces estériles y almacenada a -80 °C antes de su uso. Durante la preparación y carga de péptidos de los xAPCs y de la carga de péptidos de las células adherentes.

[0059] *Solución de citrato de sodio*. Una solución estéril no pirogénica anticoagulante de citrato de sodio, USP (Baxter Fenwal), es almacenada a la temperatura del cuarto (RT - room temperature) antes de su uso como un aditivo de amortiguador para ejecutar al selector magnético de células Isolex 300i para la selección de células CD8⁺ T y de células CD8⁻ T.

[0060] *Medio de Schneider*. Un medio de *Drosophila* de *Schneider* es un medio de cultivo utilizado para cultivar a las células de *Drosophila*. Cada lote de medio es probado por el proveedor (Invitrogen Corporation) para detectar su osmolaridad, su pH, su esterilidad y su capacidad para mantener el crecimiento de las células de *Drosophila*. El medio de *Drosophila* de *Schneider* (concentración de 1X) es almacenado a una temperatura que varía entre 2 °C a 6 °C antes de su uso.

[0061] *Suero fetal bovino*. El suero fetal bovino (FBS - Fetal bovine serum), que es utilizado como una fuente proteínica para el crecimiento de las células anfitrionas o de las células xAPCs, es almacenado a -80 °C. El FBS, disponible de Gemini Bioproducts, es procesado a partir de la sangre fetal bovina de animales originarios de Estados Unidos. Los animales maternos de los cuales se derivó a la sangre no tienen infecciones ni enfermedades contagiosas ni parásitos dañinos.

[0062] *Medio de insectos HYQ SFX*. El medio de insectos SFX de Hyclone (Hyclone Corporation) es un medio de cultivo libre de sueros (concentración de 1X) utilizado durante la carga de péptidos de las xAPCs, y almacenado en un rango de temperatura que varía desde 2 °C a 6 °C antes de su uso. Este medio no contiene productos de origen bovino.

[0063] *Sulfato de cobre*. Se utiliza un pentahidrato de sulfato de cobre (II) (Aldrich) para la inducción de células anfitrionas modificadas para expresar a células HLA humanas, co-estimuladoras y de adhesión. La solución almacenada es formulada al disolver al CuSO₄ cristalino en agua estéril libre de endotoxinas para elaborar una concentración de 200 mM y filtrar asépticamente la solución a través de un filtro de 0.2 micrómetros en un contenedor estéril en un gabinete de bioseguridad de clase II. La solución almacenada filtrada es guardada a desde 2 °C a 6 °C antes de su uso.

[0064] *RPMI*. El medio de cultivo de RPMI (disponible de Invitrogen Corporation o Gibco), que es libre de sueros y anticuerpos (a una concentración de 1X), es utilizado para cultivar a células T. El medio de cultivo RPMI es almacenado antes de 2 a 6 °C antes de su uso.

[0065] *Sustancia salina amortiguada de fosfato de Dulbecco* (DPBS - *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*). La solución salina amortiguada de fosfato de Dulbecco que es estéril y no es pirogénica (DPBS - *Dulbecco's phosphate buffered saline*) (disponible de Invitrogen Corporation o Gibco, a una concentración de 1X) es almacenada a la temperatura del cuarto antes de su uso. La DPBS es utilizada para los siguientes procedimientos: la ejecución del instrumento magnético selector de células Isolex 300i durante la selección de las células CD8⁺ T y de las células CD8⁻ T; lavado de células no adherentes durante los pasos de re-estimulación y de lavado de anticuerpos no enlazados monoclonales OKT3 durante expansiones no específicas; y la dilución de la microglobulina humana β 2, IL-7, el péptido CD8 y OKT3.

[0066] *Medio de Leibovitz*. El medio L-15 de Leibovitz (100 L-glutamina; a una concentración de 1X), disponible de SigmaAldrich, es almacenado a entre 2 °C y 6 °C antes de su uso durante la carga de péptidos del proceso de activación de las células T.

[0067] *Anticuerpo OKT[®]3*. Orthoclone OKT[®]3 (1.0mg/mL), un anticuerpo monoclonal de ratones específico para el antígeno CD3 de las células T suministrado en ampollas en forma de una solución estéril aprobada para su uso clínico (disponible de Ortho), es dividida en matraces desechables bajo condiciones estériles y almacenada y congelada a -80 °C antes de su uso en la activación de las células T.

[0068] *Geneticina (G418)*. Geneticina (Invitrogen Corporation) es un antibiótico selectivo utilizado en el cultivo de células de Drosophila para mantener la expresión de moléculas exógenas codificadas por ácidos nucleicos xenogénicos. La geneticina es suministrada como una solución almacenada estéril (50 mg/mililitro), y almacenada a desde 2 a 6 °C antes de su uso.

[0069] *Cloruro de calcio*. El hidrato de cloruro de calcio es utilizado para la coagulación de plasma autólogo obtenido del producto de linfóresis para generar al suero autólogo utilizado en los procesos de aislamiento o de activación de las células CD8⁺ T. El hidrato de cloruro de calcio es recibido en forma de un polvo cristalino, es compuesto en una solución almacenada (1 M), y guardado a desde 2 °C a 6 °C antes de su uso. La solución almacenada es formulada al disolver a cloruro de calcio en agua estéril libre de endotoxinas y al filtrarse asépticamente a través de un filtro de 0.2 micrómetros en un contenedor estéril en un gabinete de bioseguridad de clase II.

[0070] *Ácido acético*. Ácido acético (17.4 M) utilizado para la preparación de soluciones almacenadas de IL-2 es obtenido de Sigma Corporation y almacenado a la temperatura del cuarto antes de su uso.

[0071] *FICOLL-PAQUE[®] Plus*. Después del aislamiento de las células CD8⁺ T y de las células CD8⁻ T con el sistema selector de células Isolex 300i, las células mononucleares de la fracción que no es CD8⁺ son fraccionadas aún más utilizando a FICOLL-PAQUE[®] Plus (una concentración de 1X), un reactivo gradiente de Ficoll sin ningún componente animal disponible de Amersham Pharmacia Biotech utilizado para remover a células muertas, a neutrófilos, y a glóbulos rojos. El reactivo es almacenado a la temperatura del cuarto antes de su uso.

[0072] *PENTASPAN[®]*. PENTASPAN (B. Braun Medical Inc) es una solución estéril de un 10% de penta-almidón en un 0.9 por ciento de cloruro de sodio para su uso clínico (NDC 0264-1972-10), y es almacenada a la temperatura del cuarto antes de su uso. Es utilizada (a una concentración de 1X) como un protector criogénico en la conservación criogénica de células CD8⁻ T y células CD8⁺ T aisladas.

[0073] *Sulfóxido de dimetilo (DMSO - Dimethyl Sulfoxide)*. El DMSO es utilizado como un protector criogénico en la conservación criogénica de células CD8⁻ T y células CD8⁺ T aisladas. La solución DMSO (a una concentración de 1X), disponible de Sigma-Aldrich, es almacenada a la temperatura del cuarto antes de su uso.

[0074] *L-glutamina*. L-glutamina (USP), 200 mM (una concentración de 100X), disponible de Invitrogen Corporation,

es utilizada como un suplemento de medio de cultivo de RPMI, y es almacenada a -80 °C antes de su uso.

[0075] *Solución de piruvato de sodio de MEM.* La solución de piruvato de sodio de MEM (100 mM, a una concentración de 100X), disponible de Invitrogen Corporation, es utilizada para suplementar a un medio RPMI, y es almacenado a desde 2 a 6 °C antes de su uso.

[0076] *Aminoácidos no esenciales.* Los aminoácidos no esenciales (10 mM; a una concentración de 100X) de Invitrogen Corporation, utilizada para suplementar al medio RPMI, son almacenados entre 2 a 6 °C antes de su uso.

[0077] *Solución HEPES.* 1 M (a una concentración de 200X) de solución de amortiguamiento HEPES (Invitrogen Corporation), utilizada para suplementar al medio RPMI, es almacenada a entre 2 °C a 6 °C antes de su uso.

[0078] *Medio celular 10 X-vivo.* El medio de cultivo celular 10 X-vivo, suministrado por BioWhittaker, es almacenado entre 2 y 6 °C antes de su uso. Éste medio (a una concentración de 1X), que es suero-, fenol rojo-, y libre de antibióticos, es utilizada durante la fase de expansión no específica de las células T activada por la exposición a xAPCs cargados por péptidos.

[0079] *Inyección de cloruro de sodio.* Una solución de un 0.9 por ciento de cloruro de sodio, USP, disponible de Baxter Fenwal Laboratories, es utilizada para procedimientos de lavado celular durante la cosecha de las células T. La solución, la cual es estéril, no pirogénica y libre de componentes animales, es almacenada a la temperatura del cuarto antes de su uso.

[0080] *Solución de dextrosa más cloruro de sodio.* Una solución inyectable de un 5% de dextrosa y un 0.9 por ciento de cloruro de sodio, USP (Baxter Fenwal Laboratories), es obtenida en forma de una solución estéril no pirogénica y libre de componentes animales. La solución, que es utilizada como un amortiguador de almacenamiento para las células T activadas, es almacenada a la temperatura del cuarto antes de su uso.

[0081] *La solución láctica de Ringer.* Un 0.9 por ciento de una solución láctica de Ringer, USP (Baxter Healthcare Laboratories), que es una solución estéril de bajas endotoxinas de cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro de sodio y lactato de sodio en agua para su inyección (libre de componentes animales), es almacenada a la temperatura del cuarto antes de su uso en la cosecha y suspensión de células T.

[0082] *Agua destilada.* Agua destilada de tipo para cultivos celulares, que es obtenida por medio de filtración de membranas y de examinación de endotoxinas (Invitrogen Corporation), es utilizada como un solvente para la preparación de soluciones almacenadas de sulfato de cobre, cloruro de calcio e interleucina-2 (IL-2) y es almacenada a la temperatura del cuarto antes de su uso.

Otros materiales

[0083] Productos de linfótesis son recaudados de sujetos humanos signos mezclados con melanoma y son almacenados a la temperatura del cuarto antes de su uso para la generación de un producto celular autólogo específico de cada paciente.

[0084] El suero humano autólogo es utilizado como una fuente proteínica para el cultivo de células T aisladas. El plasma humano autólogo es preparado a partir del producto de la linfótesis al agregar cloruro de calcio para conseguir un aglutinamiento de fibrina y entonces recaudar a la fase sérica líquida. La fase sérica líquida recaudada es almacenada a 4 °C para un almacenamiento de corto plazo y a -80 °C para un almacenamiento a largo plazo.

[0085] Una línea de xAPCs de Drosophila, derivada del clon B xenogénico de Drosophila, que es utilizado como inventario de semillas para crear un cultivo continuo xAPC de Drosophila, se obtiene como se describe más adelante.

Procedimientos

Aislamiento de células CD8⁺ humanas

[0086] Las células CD8⁺ son aisladas de muestras de leucoféresis usando una máquina Isolex 300i (Baxter) por medio de una selección positiva con un anticuerpo monoclonal (anticuerpo 1) seguido por un procedimiento de aislamiento de Dynabeads™ (Dynal) utilizando IgGs de oveja anti-ratón (anticuerpo 2) cubierto con micropartículas magnéticas (SAM beads). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano CD8 es agregado a células lavadas re-suspendidas en PBS de Dulbecco suplementada con 1% de HSA (Baxter-Hyland) y un 0.2 por ciento de citrato de sodio. Las micropartículas magnéticas Dynal (Dynabeads™) son agregadas a unas micropartículas a una tasa celular de 1:1 a 1:2 dependiendo del número de PBMCs. Las células CD8⁺ aisladas son removidas por medio de separación magnética. La fracción remanente que no contienen CD8 es recolectada y conservada criogénicamente para usos futuros durante los pasos de re-estimulación y expansión no específica. La disociación del complejo célula-anticuerpo 1-anticuerpo 2-micropartículas de CD8 se logra por medio de una incubación a 37 °C durante 45

minutos en la presencia de un péptido⁵⁹⁻⁷⁰ de CD8 (AAEGLDTQRFSG (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 76)), el péptido para el cual se generó el anticuerpo 1. Las micropartículas liberadas son removidas magnéticamente y las células CD8⁺ son contadas y analizadas por medio de citometría de flujo para evaluar su pureza. La recuperación de las células CD8⁺ es comúnmente superior al 80%. Un suero desactivado por el calor es preparado al recaudar al plasma autólogo en el momento del paso inicial de lavado celular. La fibrina es aglutinada utilizando CaCl₂ y la aglutinación de fibrina es removida. El suero es desactivado con calor, filtrado, dividido y congelado a -80° C. Las células que no son CD8⁺ son retenidas por medio de un procedimiento de selección positiva y purificadas utilizando un gradiente de Ficoll. Estas células son conservadas criogénicamente en DMSO, Pentaspan, y suero autólogo desactivado por el calor y almacenadas en nitrógeno líquido (LN₂). Estas células son utilizadas como la fuente de células adherentes en el momento de las re-estimulaciones y son pulsadas con péptidos antes de su uso como células que contienen antígenos.

Inmunización in vitro de células CD8⁺ humanas purificadas

[0087] Estimulación primaria. Las células transfectadas de Drosophila S2 son incubadas en un medio de Schneider (10⁶ células/mililitro) suplementado con un 10% de suero fetal de ternero y un sulfato de cobre a 27 °C durante 24 a 72 horas. Las células S2 (clon 1120-3-9) son cultivadas, lavadas y re-suspendidas en un medio de insectos HYQ SFX (Hyclone) que contiene 0.1 µg/mililitro de cada uno de los péptidos humanos gp100154-162, gp100209-217, gp100280-288, MART-127-35, tirosinasa-N369-377 y tirosinasa-D369-377 y 5 µg/mililitro de proteínas recombinantes de microglobulina humana β2 purificadas de E. Coli. Después de la incubación a la temperatura del cuarto (23-25 °C) durante 4 horas, las células S2 son mezcladas con células CD8⁺ a una tasa de 1:10 (células de Drosophila:células T) en un medio (Gibco) del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con un 5-10% de suero autólogo. La mezcla celular es incubada a 37 °C, tiempo durante el cual las células de Drosophila mueren (para las 48 horas). En el día 4, se agregan IL-2 (20 U/mililitros) e IL-7 (30 U/mililitro) para expandir selectivamente la población de CTL específica de melanoma.

[0088] Re-estimulaciones. PBMCs autólogas reducidas por CD8 obtenidas en el momento de la linfóresis y congeladas para su uso futuro, son descongeladas, lavadas y re-suspendidas a 10⁷ células/mililitro en un medio RPMI que contiene un 10% de suero autólogo, 5 µg/mililitro de microglobulina humana recombinante β2 y 5 µg/mililitro de péptidos gp100154-162, gp100209-217, gp100280-288, MART-127-35, tirosinasa-N369-377 y tirosinasa-D369-377. Después de la irradiación γ (5000 rads), las células son incubadas a 37 °C durante 2 horas en los matraces utilizados para la re-estimulación. Las células no adherentes son removidas por medio de un lavado con PBS de Dulbecco. Monocitos adherentes son cargados con los epítopes de péptidos e incubados durante 90 minutos en un medio de Leibovitz que contiene 5 µg/mililitro de microglobulina humana β2 en 1% de HSA y 5 µg/mililitros de cada péptido. El sobrenadante removido y la suspensión de células CD8⁺ activadas por Drosophila (2.5 x 10⁶ células/mililitro en un medio RPMI con un 10% de suero autólogo) es agregada a una tasa de alrededor 10 células CD8⁺ a un monocito adherente. Después de 3 a 4 días de cultivo a 37 °C se agregan IL-2 (20 U/mililitro) e IL-7 (30 U/mililitro) con un cambio de medio para expandir selectivamente a la población de CTLs específicos de melanoma.

[0089] Expansión no específica. Las células ejecutoras de CD8⁺ que han experimentado 2 rondas de re-estimulación son expandidas en bolsas de cultivos celulares junto con las células suministradoras (células autólogas irradiadas seleccionadas que no son CD8⁺) después de ser estimuladas con el anticuerpo OKT3. Las células seleccionadas congeladas que no son CD8⁺ son descongeladas, lavadas e irradiadas entonces con gama (3500 rads). Una tasa de 4:1 (suministradora:ejecutora) es colocada en los matraces T-225 que han sido cubiertos con anticuerpos OKT3. La estimulación del OKT3 es realizada en un medio completo de RPMI que contiene a un 10% de suero autólogo suplementado con 20 U/mililitro de IL-2. 2 días después, las células T estimuladas son diluidas con un medio fresco (medio X-vivo 10) y transferidas a bolsas de cultivos celulares para su expansión. El medio fresco y el IL-2 son suplementados aproximadamente cada 2 a 3 días para suministrar a las células T de expansión rápida.

Preparación y liberación de CTLs

[0090] Formulación de la cosecha celular y del producto final. La cosecha del producto celular final es realizada por medio de centrifugación para remover el medio de cultivo y para concentrar a las células. Después de la centrifugación, las células son lavadas en una sustancia salina que contiene un 1% de albúmina sérica humana (HSA – human serum albumin), filtradas a través de un filtro de 70 µm, y luego diluidas en un medio de infusión. El producto celular para la infusión contiene CTLs autólogos en 300 ml de una inyección láctica de Ringer, USP (76% v/v), 5% de dextrosa en un 0.9% de cloruro de sodio (4% volumen/volumen) y un 25% de HSA (20% volumen/volumen). Las células del producto final son empacadas en una bolsa de transferencia de 1000 ml en un contenedor refrigerado aislado de transporte con un registrador de la información de la temperatura.

[0091] Pruebas de los productos. Las pruebas que se realizaron antes de la liberación del producto CTL son listadas más adelante. La actividad específica dirigida en contra de los péptidos individuales es evaluada al medir a la actividad citotóxica de las células ejecutoras en contra de las células T2 marcadas con cromo cargadas con cada uno de los péptidos individuales utilizados para la estimulación. La actividad citotóxica también es medida en contra de objetivos de melanoma marcados con cromo (Malme 3M, M14), utilizando fibroblastos normales (Malme 3) o una

línea celular de melanoma (01-KN) que resultó negativa para tirosinasa, gp 100 y MART-1 como controles.

Fenotipo: Una porción de la cosecha celular es utilizada para probar el fenotipo del producto CD8 antes del embarque. La especificación del producto final es la expresión de CD3, CD8 y TCR. Una evaluación fenotípica adicional para marcadores consistentes con la memoria, la activación, etcétera son medidos y registrados.

Identidad: El estatus HLA-A2, HLA-C y HLA-DR de la muestra es determinada por medio del análisis de una preparación de ADN aislada proveniente de una muestra de PBMC preparada en el momento de la recepción de la leucoféresis inicial y de las células CD8⁺ T recaudadas al final del cultivo, tomadas del producto celular cultivado. Un análisis PCR de muestras de ADN es realizado con oligos cebadores específicos de HLA suministrados por Genovision. La especificación final del producto es la identidad de la muestra del día cero.

Cuentas de células: La dosis deseada de células para su difusión es de 10¹⁰ células CD8⁺ T. El límite de infusión del producto final es 10¹⁰ células. El número total de células generadas depende del paciente. Las dosis celulares promediaron 9 X 10⁹ en un estudio previo en el cual las células fueron generadas bajo el mismo protocolo ex vivo. La cuenta celular final es hecha al determinar el número de células viables.

Viabilidad: La viabilidad de la dosis celular final es superior al 70%. El número de células viables se establece mediante el conteo microscópico de las células que excluyen a la coloración de tripano azul.

Pruebas de mycoplasma: Pruebas de las células para detectar mycoplasma son realizadas antes de que las células sean administradas al paciente para confirmar una detección negativa de mycoplasma. El botiquín de PCR de Roche es utilizado el cual incluye además un ensayo ELISA. Adicionalmente, las muestras de los cultivos de células T son recolectadas en el primer suministro de citoquina (día 6) y enviados a BioReliance para completar el procedimiento de cultivo de 28 días. Los resultados del cultivo son recibidos después de la infusión de las células T.

Pruebas de endotoxinas: La prueba de endotoxinas en el producto celular final es realizada utilizando un ensayo de lisado de amebocitos de Limulus (BioWhittaker, Walkersville, MD). El límite del nivel de endotoxinas es menor que 5 EU/kilogramos infundidos a los pacientes. La especificación del producto celular final es menor que 1EU/mililitro.

Pruebas de esterilidad del producto que está siendo procesado: Pruebas durante el proceso para detectar esterilidad son realizadas utilizando el sistema BacT/Alerta. Las muestras son tomadas durante los momentos en los que ocurren cambios de medios. Una muestra de la dosis final también es examinada por el sistema BacT/Alerta, y la especificación final del producto no debe tener crecimiento.

Detección de ADN de Drosophila y de ARN viral de insectos: El ADN es aislado del producto final de células CD8⁺ T y utilizado como una plantilla para un ensayo PCR del ADN de Drosophila, que utiliza a cebadores específicos para el vector de insectos utilizado para preparar a las APCs recombinantes de Drosophila. Esta muestra es comparada con la muestra nativa de CD8⁺ que actúa como el control negativo y el ADN de las células de Drosophila es utilizado como un control positivo. El ARN total también es aislado de las mismas muestras de células CD8⁺ T y se puede realizar un RT-PCR cuantitativo en tiempo real, que puede detectar a 20 copias/microgramo de ADNc de 3 virus diferentes conocidos de ARN virales de insectos. La especificación del producto para ambos ensayos es la detección negativa de ácidos nucleicos genómicos y virales de insectos.

Actividad lítica: La actividad lítica es evaluada para el producto final de células CD8⁺ T por medio de un ensayo de liberación de cromo en los objetivos de células T2 cargados por péptidos, para medir la actividad anti peptídica, y a los objetivos HLA-A2 establecidos o autólogos de células de melanoma y tumores emparejados con donantes y líneas no tumorales (Malme 3 y Malme 3M) para evaluar la eliminación específica de melanoma. La especificación del producto es de la eliminación específica de las células objetivo.

[0092] Además, para facilitar el monitoreo, las siguientes pruebas también pueden ser realizadas adicionalmente a las pruebas de liberación que se describieron anteriormente:

Coloración tetramérica: Las células CD8⁺ T para la muestra nativa derivada de leucoféresis es evaluada para detectar la presencia de células T de antígenos específicos con moléculas tetraméricas que han sido diseñadas para enumerar a células T con una especificidad para los epítopes de péptidos utilizados para generar a los CTLs ex vivo. Esto permite el monitoreo de células T de antígenos específicos después del tratamiento.

Células tumorales de melanoma en muestras sanguíneas periféricas: Ensayos PCR sensibles, cuantitativos y en tiempo real permiten el monitoreo de células circulantes de melanoma en muestras sanguíneas de pacientes, antes, durante y después del tratamiento de medicamentos. Aunque no todos los pacientes de melanoma de las etapas III/IV demuestran células humores circulantes, la detección de estas células puede utilizarse como un marcador sustituto para la respuesta a la terapia.

[0093] Los productos CTL preparados tal como se describe anteriormente pueden ser utilizados en regímenes combinatorios de tratamientos terapéuticos del invento tal como se ilustró por las secciones preferidas descritas en los siguientes ejemplos.

Tratamiento de pacientes con melanoma metastásico usando linfocitos CD8⁺ autólogos estimulados ex vivo con células de Drosophila cargadas con péptidos asociados con el melanoma (MART-1, gp100, y Tirosinasa) y la

administración subcutánea de IFN α -2b e IL-2, con y sin la administración de 2-CdA o DAB IL-2

[0094] Estos ejemplos ilustran tratamientos que comprenden a la administración de linfocitos T citotóxicos autólogos (CTLs - cytotoxic T lymphocytes) que son específicos para epítopes de péptidos derivados de antígenos asociados con el melanoma en combinación con un agente linfo-reductor seleccionado de cladribina y DAB IL2, así como las citoquinas IL-2 e IFN- α -2b, así como un tratamiento de control. El agente de terapia celular, que comprende a CTLs autólogos que han sido activados para que usen como objetivo a células específicas de melanoma que expresan a MART-1, gp100, y tirosinasa al contactar a las xAPCs de *Drosophila* cargadas con péptidos antigénicos derivados de MART-1-, gp100-, y tirosinasa, es diseñada para mejorar y mantener la dirección inmunológica del paciente hacia las células de melanoma que expresan a MART-1, gp100, y tirosinasa. La adición de los inmunomoduladores IFN- α -2b e IL-2 es incluida para aumentar la respuesta de los CTLs. Un régimen preparativo no mieloblástico, pero reductor de linfocitos (cladribina) o un denileukin diflitox de reducción de un subconjunto específico de células T (DAB IL-2) es administrado antes de la infusión de CTLs para mejorar el injerto de los CTLs. El tratamiento es diseñado para causar una regresión tumoral y un beneficio clínico a través de la persistencia de los CTLs específicamente para el melanoma.

[0095] Más específicamente, pacientes clínicos con un melanoma maligno avanzado que mostraron resultados positivos de HLA-A2 se les administra un régimen preparativo no mieloblástico pero que reduce a los linfocitos que consiste de ya sea cladribina (0.12 miligramos/kilogramo/día durante 5 días) o DAB IL-2 (una sola inyección de 18 μ g/kilogramo). Adicionalmente, un régimen concomitante de interferón- α -2b (IFN- α -2b; 10MIU/m²) es administrado diariamente, durante 5 días consecutivos, por medio de inyecciones subcutáneas antes de la infusión de CTLs. Subsiguientemente, los pacientes reciben una sola dosis de células CD8⁺ T autólogas generadas ex vivo estimuladas por xAPCs de *Drosophila*, que muestran al fenotipo CTL. La infusión celular es seguida inmediatamente por una administración diaria subcutánea de una dosis baja de IL-2 (por ejemplo, 3 MIU), durante veintiocho (28) días, seguido por una evaluación tumoral. La administración subcutánea diaria de una dosis baja (por ejemplo, 3 MIU) de IL-2 es continuada en pacientes que no tengan evidencias de progreso de la enfermedad.

[0096] Los CTLs son generados por un método en el cual células CD8⁺ T nativas purificadas son estimuladas con xAPCs de *Drosophila* que presentan a 6 diferentes epítopes de péptidos de células T asociadas con melanoma en el contexto de una restricción de clase I de MHC humana, que resulta en CTLs que muestran varias especificidades para MART-1, gp100, y tirosinasa, después de aproximadamente 34 días en el cultivo.

[0097] La sangre es recolectada en el momento de examinar a pacientes para determinar si son aptos para el estudio y el procedimiento preparativo de leucoféresis ocurre en el día cero o en el día uno. Los pacientes son expuestos a una leucoféresis estándar 2.0-3.0X del volumen de sangre para obtener suficientes glóbulos blancos requeridos para preparar al agente terapéutico celular. En momentos indicados, los procedimientos adicionales de leucoféresis (menor o igual que el 3^{er} monto utilizado para obtener a la muestra inicial de CD8) son realizados para obtener a células sanguíneas periféricas para su análisis. Éstas muestras son utilizadas para monitorear la presencia de células T de antígenos específicos y posibles células circulantes tumorales de melanoma. El plasma y las células sanguíneas también son recolectadas para cumplir el requerimiento de xenotrasplante para obtener las muestras antes y después del tratamiento. Los productos de leucoféresis son transportados a instalaciones en las cuales las células CD8⁺ T son aisladas, estimuladas y cultivadas durante aproximadamente 34 días.

[0098] Una evaluación de las lesiones medibles es realizada en las semanas 4 y 8 después de la infusión de CTLs. Un objetivo del estudio es determinar si la administración de un agente completo no mieloblástico reductor de linfocitos (cladribina) o un agente de reducción selectiva de un subconjunto de células T (DAB IL-2), antes de la infusión de células T y en conjunto con un régimen establecido de citoquinas que mejoran al sistema inmunológico, resultará en una persistencia de células T específicas en relación a un antígeno con una regresión acompañante del tumor objetivo.

Preparación de linfocitos citotóxicos

[0099] Las células CD8⁺ aisladas de muestras de leucoféresis por medio de una selección positiva con un anticuerpo anti-CD8 son estimuladas con péptidos antigénicos asociadas con el melanoma humano (tirosinasa369-377(nativa), tirosinasa369-377(D371 modificada), MART-127-35, gp100154-163, gp100209-217 y gp100280-288) presentados por las xAPCs de *Drosophila* que expresan a moléculas humanas de clase I y co-estimuladoras (HLA-A2.1, microglobulina β 2, B7.1, CD70, ICAM-1 y LFA-3). Estas mismas células CD8⁺ son re-estimuladas por medio de 2 rondas de células autólogas mononucleares pulsadas por péptidos, en la presencia de IL-2 e IL-7. Un paso no específico de expansión con mAb anti-CD3 (OKT3) también es incluido para incrementar el número total de células: generalmente 25 veces mayor que aquel obtenido al final del 2^o paso de re-estimulación. La actividad citolítica de las células T es medida en contraste con las células T2 cargadas por péptidos y un panel de células de melanoma A2⁺, mientras que la pureza de las células CD8⁺ estimuladas in vitro es evaluada por medio de citometría de flujo. Adicionalmente, la producción de interferones-gama, en respuesta a la estimulación de antígenos específicos y el análisis tetramérico de péptidos específicos, confirma la función ejecutora y la especificidad de los CTLs generados, respectivamente.

Potencia de los CTLs generados a partir de células CD⁸⁺ T nativas aisladas de pacientes con cáncer de melanoma

[0100] Se ha demostrado en pacientes con melanoma que los CTLs de antígenos específicos, aislados a partir de muestras sanguíneas periféricas, son parte de una población heterogénea de células que varían desde una avidéz baja a alta para el complejo péptidos específicos/MHC al cual se dirige el TCR. Sin embargo, la gran mayoría de estos CTLs son de una avidéz baja, y únicamente los CTLs con una avidéz alta muestran una lisis significativa de células tumorales.²¹ Adicionalmente, linfocitos que se infiltran en tumores (TILs - tumor-infiltrating lymphocytes) han sido aislados de masas tumorales en pacientes con melanoma. La expansión ex vivo de estos TILs en la presencia de una dosis alta de IL-2 ha resultado en respuestas objetivas en pacientes de melanoma; sin embargo, estas respuestas fueron de duración corta y las células T clonadas y altamente reactivas que se originaron de los TILs no generaron ninguna respuesta completa.¹⁶

[0101] En contraste, los CTLs generados ex vivo con xAPCs de *Drosophila* son células T potentes de antígenos específicos con una alta avidéz capaces de una lisis de péptidos específicos (refiérase a, por ejemplo, la figura 1) y una eliminación celular fuerte de tumores de melanoma. La generación reproducible de los CTLs, con una actividad citolítica fuerte para células tumorales, se cree que se puede atribuir a varios factores contribuyentes. Primero, la purificación de CD8⁺ con un anticuerpo monoclonal anti-CD8 de péptidos específicos con una alta densidad de CD8, mientras que la liberación de anticuerpos en la presencia de péptidos específicos, evitó la estimulación no específica de las células T. Segundo, las células CD8⁺ T altamente purificadas (tabla I) son estimuladas con xAPCs que presentan a epítopes específicos de células T en el contexto de las moléculas MHC, donde una alta densidad de presentación de antígenos resulta en una respuesta inmunológica potente primaria de células T. La inclusión de varias moléculas de co-estimulación en las APCs optimiza la estimulación de las células T. Tercero, los pasos de re-estimulación incorporan a células mononucleares autólogas que han sido cargadas con los mismos epítopes de células T asociados con el melanoma utilizados en la estimulación primaria y suministran un impulso a la proliferación de las células T. Finalmente, un sólo paso de expansión no específico con OKT3, células suministradoras autólogas y una dosis baja de IL-2 mantiene el mismo porcentaje de células T de antígenos específicos que al final del 2º paso de re-estimulación, mientras se incrementa el número total de células T en aproximadamente 25 veces.

Tabla I: Purificación de las células CD8⁺ por medio de una selección positiva y un análisis por citometría de flujos (los datos representan el resumen de un total de 28 pacientes)

	PBMC		Pos-selección	
Tipo de células	(%)	(Rango)	(%)	(Rango)
Células CD3 ⁺ T	45	(29-64)	83	(59-98)
Células CD4 ⁺ T	27	(16-46)	2	(0.5-4)
Células CD8 ⁺ T	17	(8-31)	84	(60-96)
Monocitos CD14 ⁺	27	(11-43)	5	(0.5-17)
Neutrófilos CD15 ⁺ /CD16 ⁺	2	(0.5-9)	0.5	(0.5-1)
Células CD16 ⁺ /CD15 ⁻ NK	15	(8-47)	8	(2-20)
Células CD19 B	1	(0.5-2)	1	(0.5-3)

[0102] Este protocolo de estimulación ex vivo de células CD8⁺ T de xAPC resultó en CTLs con una lisis potente de células tumorales, una alta avidéz para el complejo péptido/MHC, y una especificidad de antígenos tal como fue evaluado por la enumeración con moléculas tetraméricas de péptidos específicos, una liberación de interferones-gama de respuesta al estímulo antigénico específico y a la lisis tumoral específica.

Evaluación de la terapia CTL en el melanoma metastásico maligno de estudios previos

[0103] 2 ensayos de la fase I y un ensayo de la fase II han sido realizados, que involucran a un total de 55 sujetos con melanoma de etapa III o de etapa IV. El estudio uno, "Autologous Cytotoxic T Lymphocytes (CD8⁺) Serially Cultured Ex Vivo with *Drosophila* Antigen Presenting Cells, Interleukin-2, Interleukin-7, then Adherent Monocytes, and Tyrosinase Peptide" ("linfocitos citotóxicos T autólogos (CD8⁺) cultivados en serie ex vivo con células que presentan a antígenos de *Drosophila*, interleucina-2, interleucina-7, y monocitos adherentes y péptidos de tirosinasa"), fue un estudio de marcación abierta en 10 pacientes con melanomas en la etapa IV. Los puntos finales clínicos fueron: 1) seguridad y tolerancia de CTLs autólogos después de inmunizaciones in vitro; 2) la determinación de la cinética de los CTLs infundidas en la circulación sistémica para limitar el análisis de dilución; 3) la disposición del cuerpo completo de CTLs marcados con ¹¹¹Indio por medio de radio-gamagrafía; 4) la composición celular de nódulos que fueron expuestos a biopsias por medio de un análisis inmunohistoquímico (CTLs, TH, NK, células B) y 5) la regresión de lesiones medibles y la duración de la respuesta a lo largo de 2 meses.²²

[0104] En el estudio 2, "Pilot Study of Subcutaneous Interferon-Alpha with Infusion of *Drosophila* Cell Stimulated Autologous

CD8+ Lymphocytes for the Treatment of Advanced Melanoma" ("estudio piloto de interferones-alfa subcutáneas con la infusión de linfocitos CD8⁺ autólogos estimulados por células de *Drosophila* para el tratamiento de melanomas avanzados"), un total de 15 pacientes con melanoma de etapa III/IV recibieron infusiones de células CD8⁺ T autólogas en terapias de mantenimiento de fondo con IFN α -2b. La terapia CTL fue evaluada al: 1) monitorear la seguridad y tolerancia de las CTLs re-infundidas; 2) la composición celular de los módulos a los que se aplicaron biopsias; 3) la regresión de lesiones medibles y 4) la duración de la respuesta a lo largo de 3 meses. A los sujetos que tuvieron enfermedades estables o que demostraron una respuesta clínica en la evaluación de seguimiento (4 semanas después de la primera infusión) se les ofreció un 2º ciclo del tratamiento. Ocho (8) de los quince (15) sujetos experimentaron un 2º ciclo de terapia CTL, cuatro (4) sujetos ingresaron a un 3º ciclo y un (1) sujeto fue tratado con 4 ciclos de la terapia de las células T.²³

[0105] En el estudio 3, "Randomized Phase II Trial of Subcutaneous Interferon- α -2b (IFN) and Interleukin-2 (IL-2) with or without Infusion of *Drosophila* Cell-stimulated Autologous CD8 Lymphocytes for the Treatment of Advanced Melanoma" ("ensayo aleatorio de la fase II de Interferón- α -2b (IFN) e interleucina-2 (IL-2) subcutáneas con o sin la infusión de linfocitos CD8 autólogo estimulados por la célula de la *Drosophila* para el tratamiento de melanomas avanzados"), un total de 30 pacientes con melanoma de etapas III/IV fueron tratados con solamente citoquinas (IFN α e IL-2) o citoquinas junto con células T. Fue un estudio aleatorio en el cual los pacientes ingresaron a la rama de solamente citoquinas (la rama A) o la rama de citoquinas junto con células T (rama B). A los pacientes que ingresaron y progresaron en la rama A se les ofreció una oportunidad para cruzar a la rama de citoquinas junto con células T (rama C). El punto final principal de este estudio fue el comparar el tiempo de progresión (TTP) de la enfermedad entre los 2 grupos (la rama A versus la rama B). Una significancia estadística fue alcanzada en el TTP en pacientes que ingresaron a la rama B vs. aquellos que ingresaron a la rama A (figura 11). En pacientes que cruzaron desde la rama A la rama C, la significancia estadística en el TTP también fue detectada en pacientes que recibieron a las células T. La seguridad y tolerancia de IFN α e IL-2 a las dosis y en el cronograma prescrito también fueron monitoreadas.²⁴

Base lógica del uso de interferones- α -2b (IFN- α -2b)

[0106] El interferón-alfa (IFN- α) tiene un espectro amplio de efectos inmunomoduladores y anti proliferativos en una variedad de enfermedades. Se cree que un mecanismo de acción del IFN- α es la regulación/incremento de la expresión de antígenos tumorales en las células del melanoma. Tiene la capacidad de mejorar la expresión de moléculas inmunológicamente importantes en la superficie del tumor. Estas incluyen a antígenos MHC, moléculas accesorias, así como antígenos asociados con tumores.²⁵⁻²⁷ Estos efectos inmunomoduladores podrían mejorar la actividad del sistema inmunológico, incluyendo a los anticuerpos y a los linfocitos, para reconocer y atacar a las células tumorales in vivo. Una inmunoterapia activa y específica ha demostrado respuestas clínicas significativas en el tratamiento de melanoma diseminado. Los resultados de los estudios de la función inmunológica mencionados anteriormente han demostrado que el tratamiento de la vacuna del melanoma incrementa la frecuencia de CTLs anti melanoma. Se cree que estas 2 modalidades de inmunoterapia podrían actuar sinérgicamente. Un curso de cinco (5) días de IFN- α (10MU/m²; subcutáneamente) fue incluido en el estudio 2, y los resultados de las coloraciones IHC del tejido demostraron que el tiempo y dosis fueron suficientes para regular/incrementar a la expresión de antígenos de clase I y aquellos asociados con el melanoma en muestras de biopsias en serie obtenidas de un sólo paciente en los marcos referenciales de tiempo especificados. La misma modalidad de 5 días en el estudio clínico fue incluida en el estudio 3.

Base lógica para el uso de la interleucina-2

[0107] La interleucina-2 (IL-2) recombinante humana es una linfoquina producida por medio de tecnología de ADN recombinante que ha demostrado tener una variedad de actividades biológicas. El IL-2 estimula el sistema inmunológico y ejerce sus efectos biológicos después de enlazarse a receptores específicos en la superficie de las células objetivo. In vitro, ha demostrado mejorar la proliferación de las células T e inducir la producción de interferones-gama. La administración de dosis altas de IL-2 a 283 pacientes produjo una tasa de remisión del 7% con 9 respuestas completas, y los pacientes permanecieron libres de la enfermedad durante desde 9 a más de 91 meses.²⁸ Aunque dosis altas de IL-2 parecieron ser más efectivas que infusiones continuas de dosis bajas, las dosis altas de IL-2 son también más tóxicas. Los efectos colaterales más comunes fueron síntomas similares a la gripe. Los efectos colaterales más severos fueron hipotensión, el síndrome de fuga capilar, y una perfusión reducida de órganos. La administración subcutánea de dosis bajas de IL-2 (a 3 MIU/día durante 28 días) fue utilizada en parte del estudio 3, para mejorar y mantener el nivel de células T autólogas transferidas altivamente. Se agregó después de un corto periodo de tiempo a IFN- α e inmediatamente después de la infusión de CTLs para mejorar la mitogénesis de linfocitos, la citotoxicidad de linfocitos, y la producción de interferones-gama en un esfuerzo para mantener a las células T de antígenos específicos in vivo.

Transferencia adoptiva de linfocitos después de un régimen no mieloblástico de quimioterapia inmunosupresora

[0108] Estudios de ratones demostraron que la inducción de inmunosupresión con quimioterapia antes de la administración de las células T fue esencialmente para permitir la transferencia adoptiva de linfocitos para mediar

una regresión tumoral máxima^{29, 30}. Basándose en estos estudios, se iniciaron protocolos clínicos para tratar a pacientes con la transferencia adoptiva de linfocitos después de la aplicación de un régimen quimioterapéutico no mieloblato^{16, 31}. Regímenes preparativos no mieloblato han sido utilizados para tratar a pacientes que reciben trasplantes alogénicos de médula ósea, y estos regímenes parecen ser idealmente adecuados para inducir la inmunosupresión pasajera que podría mejorar el efecto de los linfocitos T transferidos adoptivamente. Un régimen de ciclofosfámidas y fludarabina usado originalmente en pacientes con cáncer a las células renales que reciben alotransplantes³² se han utilizado recientemente en pacientes de melanoma metastático^{16, 31}. La base lógica para la incorporación de un régimen linfo-reductor antes de la transferencia adoptiva de las células T fue posiblemente el destruir a células regulatorias, interrumpir la regulación homeostática de las células T ("abrir espacio") o derogar otros mecanismos tolerogénicos normales que potencialmente podrían mejorar el injerto de las células T transferidas. Ninguna mortalidad relacionada con el tratamiento fue observada, y, por lo tanto, una quimioterapia no mieloblato en combinación con linfocitos antitumorales junto con una dosis alta de IL-2 podría ser segura. La no mieloblato fue inducida con fludarabina (25 mg/metro cuadrado) y ciclofosfamida (60 mg/kilogramo) y fue seguida por una infusión de linfocitos y una dosis alta de IL-2 (720,000 IU/kilogramo).

[0109] La combinación de los agentes quimioterapéuticos, la ciclofosfamida y la fludarabina, aunque no es completamente mieloblato, se ha demostrado ser mielosupresora, afectando a neutrófilos, a linfocitos, a plaquetas y a glóbulos rojos. Los niveles de neutrófilos, que cayeron a un punto más bajo en el día 10 después de la iniciación de la quimioterapia, fueron registrados a 6/milímetro cúbico y se recuperaron a por sobre los 500/milímetro cúbico en el día 14 con la ayuda de filgrastim (G-CSF). Los niveles de linfocitos tuvieron un punto más bajo de 6/milímetro cúbico y se recuperaron por sobre los 200/milímetro cúbico durante el mismo período de tiempo. Los pacientes mostraron usualmente cuentas de neutrófilos por sobre los 500/milímetro cúbico las cuentas de plaquetas por sobre los 20,000/milímetro cúbico, 2-3 semanas después de la iniciación de la quimioterapia. Ningún paciente necesitó una transfusión de células madre para rescatar la función medular, y, por lo tanto, el tratamiento en general parece ser seguro. Sin embargo, cuentas de CD4 permanecieron persistentemente bajas (la cuenta media de CD4 en aproximadamente el día 200 fue de 156/milímetro cúbico, con un rango entre 46/milímetro cúbico y 320/milímetro cúbico), que es un efecto colateral conocido de la inmunosupresión inducida con fludarabina. El desarrollo de infecciones oportunistas ocurrió (es decir, brotes de herpes zoster pasajeros), que se resolvió después de la terminación del tratamiento.

[0110] La cladribina (2-CdA, Leustatin®), un análogo de la purina similar a la fludarabina, es aprobada para su uso en el tratamiento de leucemia de células peludas y ha sido evaluada también en pacientes de esclerosis múltiple (MS - multiple sclerosis) en un esfuerzo para reducir a linfocitos T auto-reactivos. En los pacientes con MS una reducción específica de subconjuntos de células T fue correlacionada con diferentes dosis de cladribina³³⁻³⁵. Fue un perfil de toxicidad muy favorable en relación a otros medicamentos linfocitolíticos, mientras se induce una linfopenia a largo plazo. Los niveles de linfocitos se reducen dramáticamente inmediatamente después de la primera infusión de cladribina, alcanzando el punto bajo a los 5 meses y se empiezan a recuperar a los 6 meses cuando se administra durante 4 transcurso mensuales^{33, 34}. La linfopenia fue observada en todos los pacientes, y complicaciones infecciosas no fueron un problema serio. El medicamento podría ser entregado por una ruta subcutánea conveniente sin causar irritaciones locales y con resultados farmacocinéticos y terapéuticos que parecen enteramente equivalentes a los de la ruta intravenosa^{36, 37}.

[0111] Un estudio reciente en células regulatorias T de identificación humanas (Treg) en calidad de inmunosupresores en una configuración de vacuna demostró una respuesta mejorada inmunológica antitumoral después de la reducción del subconjunto de Treg que muestra un fenotipo CD4⁺/CD25^{hi} junto con CD28, CTLA-4 y GITR³⁸. Este subconjunto de células T puede ser reducido selectivamente (aproximadamente 3 semanas) después de una sola dosis de denileucina difitix (DAB389IL-2, ONTAK®). 4 días después de la dosis individual, el 37-77% de reducción de las células Treg fue notado en ocho (8) pacientes con carcinoma de células renales. Después de la reducción de células T, una vacuna ARN-DC fue administrada y una mejora de 10 veces en la respuesta inmunológica a los antígenos de la vacuna fue notada en los pacientes que recibían a DAB IL-2 y a la vacuna versus solamente la vacuna. Por lo tanto, la misma dosis (18 µg/kilogramo) 6 días antes de una transferencia adoptiva de los CTLs de antígenos específicos es una dosis preferida para su uso en regímenes de acuerdo con el invento.

Selección de pacientes

[0112] Sujetos para el estudio son pacientes humanos diagnosticados con melanoma metastático que se mostraron positivos para HLA-A2. Un anticuerpo monoclonal (BB7.2) es utilizado para analizar a las muestras de PBMC por medio de un análisis FACS y un análisis adicional es realizado utilizando la prueba de PCR Olerup SSP™ (GenoVision) para determinar el subtipo de HLA-A*0201.

Esquema del tratamiento

[0113] La figura 2 muestra los regímenes de tratamiento descritos en más detalle más adelante. Los pacientes son divididos en 3 grupos de sujetos, con 10 en cada grupo. El régimen del grupo A, un control para el régimen de linfo-reducción, se administran CTLs junto con citoquinas. En el régimen del grupo B, que es una sección preferida del invento, los pacientes reciben cladribina (los días 0-4) junto con CTLs (el día 36) junto con citoquinas. En el régimen

del grupo C, los pacientes reciben DAB IL-2 (el día 30) junto con CTLs (el día 36) junto con citoquinas. Los regímenes experimentales son descritos en mayor detalle más adelante.

CTLs específicos para antígenos asociados con el melanoma

[0114] La terapia de linfocitos T citotóxicos para melanomas malignos utiliza a células CD8⁺ T autólogas activadas in vitro que portan a epítopes anti-génicos asociados con el melanoma. Los CTLs son preparados de muestras de leucoféresis generadas en instalaciones clínicas y transferidas a un lugar donde los CTLs son generados bajo las guías GMP y son regresados para su infusión.

[0115] En el día cero, los pacientes con melanoma metastásico experimentan una leucoféresis (aproximadamente una ejecución de 10-15 l, dependiendo de la masa y de la condición del paciente). Las células obtenidas son enviadas durante la noche a la temperatura del cuarto para ser procesadas en las instalaciones de fabricación de GMP. En momentos apropiados, la leucoféresis es realizada para obtener a linfocitos sanguíneos periféricos para su análisis. Estas muestras son utilizadas para monitorear la presencia de células T de antígenos específicos y la presencia de células circulantes tumorales de melanoma. El procedimiento de monitoreo de leucoféresis procesa a aproximadamente 5 l de sangre periférica (o un tercio del volumen recaudado en la leucoféresis inicial para obtener a las células CD8 para su subsiguiente infusión) en el lugar clínico y son transportadas a las instalaciones de fabricación de GMP. Un ensayo PCR es utilizado para determinar una reducción en el nivel de células circulantes de melanoma después de la terapia. La detección de células circulantes de melanoma puede medirse por medio de un ensayo PCR cuantitativo sensible en tiempo real³⁹⁻⁴¹. La presencia de células T de antígenos específicos es evaluada con tetrámeros de péptidos específicos/HLA-A2.

[0116] La preparación final de CTL para su infusión contiene a 1×10^{10} CTLs autólogos en 300 ml, que contenía un 76% (volumen/volumen) de la solución láctica de Ringer, un 4% (volumen/volumen) de D5NS y un 20% (volumen/volumen) de un 25% de albúmina sérica humana (HSA - human serum albumin). El producto CTL es preparado en una bolsa estéril, adecuada para su infusión, mantenida e hielo e infundida durante 30 minutos, en las primeras cuarenta y dos (42) horas de la preparación.

[0117] Antes de la infusión, las CTLs son monitoreadas para detectar actividad lítica (células objetivo cargadas por péptidos y lisis de células tumorales de melanoma), la viabilidad y la pureza por medio de un análisis FACS. La ausencia de ADN de células de *Drosophila* y de ARN viral de insectos es revisada con ensayos PCR cuantitativos y sensibles en tiempo real. La esterilidad es determinada por medio de un análisis BacT/Alert®, pruebas de mycoplasma y un análisis de coloración de Gram.

[0118] Los pacientes reciben una infusión CTL de aproximadamente 10^{10} células T autólogas que han sido estimuladas y expandidas ex vivo para volverse linfocitos T citotóxicos capaces de dirigirse a células in vivo que expresan a los antígenos a los cuales las CTLs están dirigidas. Las células son infundidas después del final del tratamiento con IFN-alfa e inmediatamente precede el inicio del régimen de IL-2.

Citoquinas

[0119] La interleucina-2 (IL-2) es obtenida de Chiron Corporation (Emeryville, CA). Es suministrada en la modalidad de frascos desechables que contienen 22 millones de IU (aproximadamente 1.3 miligramos) de IL-2 en forma de un pastel liofilizado estéril de color blanco a blanquecino junto con 50 mg de manitol y 0.18 miligramos de sulfato de dodecilo de sodio, amortiguado con aproximadamente 0.17 miligramos monobásicos y 0.89 miligramos dibásicos de fosfato de sodio con un pH de 7.5 (rango 7.2 a 7.8). El polvo es reconstituido con 1.2 mililitros de agua estéril para su inyección, USP, y la concentración resultante es 18 millones de IU/mililitro o 1.1 miligramos/mililitro. Matraces intactos son almacenados en el refrigerador (2°-8 °C) y protegidos de la luz. Los IL-2 reconstituidos son diluidos aún más con 2.4 mililitros de agua D5%. La concentración final (6MU/mililitro), una vez que se saca a las jeringas de plástico, es buena durante 14 días después de la reconstitución, si se mantiene refrigerada a 2-8 °C. La dilución final de IL-2 es auto administrada subcutáneamente para los pacientes ambulatorios a una dosis de 3 millones de unidades (3MIU), iniciando inmediatamente después de la infusión CTL y diariamente hasta el progreso de la enfermedad.

[0120] INTRON-A® es obtenido de Schering-Plough Corporation (Kenilworth, NJ). Este product IFN-alfa-2b es suministrado en forma de un polvo liofilizado o en forma de una solución para inyección en frascos estériles de 5 ml. Un frasco contiene aproximadamente 3×10^6 de U o 18×10^6 U de IFN. El polvo liofilizado es reconstituido preferiblemente justo antes de su uso, puesto que no existe ningún agente bacteriostático incluido; el polvo liofilizado que no es utilizado es almacenado en un refrigerador o en un congelador (-4 °C a -20 °C). Cuando el agente es suministrado como una solución inyectable, es almacenado en el refrigerador (2°-8 °C o 36°-46 °F). La dilución final del IFN-α es auto administrada en un paciente ambulatorio a 10 MU/metro cuadrado en los días 31-35 en forma de una inyección subcutánea.

DAB₃₈₉IL-2

[0121] DAB389ILg-2 (denileucina diftitox, ONTAK®) es una proteína citotóxica recombinante derivada de ADN

compuesta de las secuencias de aminoácidos para los fragmentos A y B de la toxina de la difteria seguido por las secuencias para la interleucina-2 que es expresada en el E. Coli. Es un medicamento dirigido, que se enlaza a células que expresan a CD25 (IL-2R) en su superficie. Interactúa con el receptor IL-2 de alta afinidad en la superficie de células regulatorias T (Treg) malignas o normales para inhibir la síntesis proteínica intracelular, conllevando rápidamente a la muerte celular. DAB389IL-2 es suministrada en frascos desechables en forma de una solución estéril congelada que tiene el propósito de una administración intravenosa (IV). Cada frasco de 2 ml de ONTAK contiene 300 mcg de DAB-IL2 recombinante en una solución estéril de ácido cítrico (20 nM), EDTA (0.05mM) y polisorbato 20 (superior al 1%) en agua para su inyección, USP. La solución tiene un pH de 6.9-7.2. Frascos intactos son almacenados congelados o a -10 °C, pero no se vuelven a congelar. El material es calentado a la temperatura del cuarto (25 °C o 77 °F) antes de preparar la dosis al descongelarlo en un refrigerador por no más de 24 horas o a la temperatura del cuarto durante 1-2 horas, y diluido con NS a una concentración de ≥ 15 mcg/mL. El DAB389IL-2 es administrado por medio de inyecciones intravenosas, preferiblemente por medio de infusiones durante por lo menos 15 minutos. Los pacientes asignados al grupo C reciben una sola inyección subcutánea de DAB IL-2 en el día 30, que es un día antes de la iniciación de IFN- α y 6 días antes de la inyección de los CTLs. La dosis es de 18 μ g/kilogramo.

Cladribina

[0122] La Leustatin® (2-cloro-2'-deoxi- β -D-adenosina) es un agente sintético antineoplástico. Es un análogo de los nucleósidos de purina resistente a la acción de la deaminasa de adenosina, que resulta en una infocitotoxicidad preferencial. En células con un alto índice de quinasas de deoxicitidina en relación a la deoxinucleotidasa (por ejemplo, linfocitos y monocitos), la cladribina es fosforilada al deoxinucleótido de trifosfato, 2-CdATP, que se acumula causando una interrupción del metabolismo celular, un daño al ADN, y una subsiguiente muerte celular. El medicamento es una solución transparente, incolora, estéril y libre de conservantes suministrada en frascos desechables que contienen 10 mg (1 mg/mililitro) de cladribina. Cada mililitro de cladribina contiene 1 mg del ingrediente activo y 9 mg (0.15 mEq) de cloruro de sodio como un ingrediente inactivo. La solución tiene un pH que varía desde 5.5 a 8.0. Se podría agregar ácido fosfórico y/o fosfato dibásico de sodio para ajustar el pH a 6.3 ± 0.3 . Los frascos intactos son almacenados y refrigerados (2-8 °C). La dosis de cladribina para el grupo B es de 0.12 miligramos/kilogramo/día durante un total de 5 días, divididos en 3-4 lugares donde un máximo de 3. 0 cm³ son administrados en un solo lugar. La dosis total de cladribina es de 0.6 miligramos/kilogramo. Existen reportes de que la administración subcutánea de cladribina en ese mismo cronograma (5 días consecutivos) y con una dosis de 0.14 miligramos/kilogramos/día (dosis total = 0.7 miligramos/kilogramo) es segura en pacientes de leucemia de células peludas ³⁷. Adicionalmente, la cladribina administrada con este cronograma y dosis a 60 pacientes produjo aproximadamente un 70% de linfo-reducción después de un sólo ciclo con una mielo-supresión clínicamente segura. Como resultado de un cambio en la normativa, Leustatin ha demostrado ser un 12% más alto que lo que se reportó en estudios clínicos previos en comparación a un inventario de cladribina sintetizado en un laboratorio. La dosis que fue reportada como 0.1 mg/kilogramo ahora se estima que realmente fue únicamente 0.087 miligramos/kilogramo ³³. En relación a la seguridad de la administración subcutánea con la formulación de Leustatin® dividida en 2-3 lugares, un estudio de pacientes de esclerosis múltiple que tienen relapsos-remisiones utilizaron 0.07 miligramos/kilogramo/día durante 5 días, mensualmente durante 6 meses con una dosis acumulada total de 2.1 mg/kilogramo ³⁶. Un total de 27 pacientes fueron mezclados aleatoriamente a una de las ramas de tratamientos del medicamento. Las infecciones fueron limitadas a un episodio de herpes zoster segmentario moderado que ocurrió en 2 pacientes tratados con cladribina y un paciente que recibió un placebo. No existen casos individuales significativos de trombocitopenia, granulocitopenia de anemia o una supresión generalizada medular.

Cuidado opcional de apoyo

[0123] Los pacientes podrían recibir cualquiera de lo siguiente para derogar a la toxicidad de IFN-alfa e IL-2 durante el tratamiento y después del tratamiento: acetaminofén (650 mg por PO q4h prn), difenhidramina (50 mg por IM o PO q4h prn), indometacina (25 mg por PO TID o 75 mg por SR qd), trifluoperazine (10 mg por IV o PO q4h prn nausea), Zantac® (150 mg por BID gastritis). Otros agentes anti-inflamatorios y antieméticos no prescritos específicamente podrían ser sustituidos para cualquiera de los medicamentos de apoyo mencionados.

[0124] Aunque él invento ha sido descrito en detalle en partes previas de este documento en referencia a ejemplos ilustrativos y a secciones preferidas, la persona con conocimiento en la industria entenderá que el enfoque de este invento no se define únicamente por la descripción anterior, pero en vez de eso, por las reivindicaciones adjuntas tal como se considera apropiadamente bajo los principios de la ley de patentes.

Referencias

[0125]

1. Hryniuk W, Bush H. The importance of dose intensity in chemotherapy of metastatic breast cancer (La importancia de la intensidad de las dosis en la quimioterapia de cáncer metastásico de mama). J Clin Oncol 4:1162-1170, 1986.

2. Herzig, RH. Dose-intensive therapy for advanced melanoma (Terapia de dosis intensivas para melanoma avanzado). In: J.O. Armitage, K.H. Antman (eds.), High-Dose Cancer Therapy. Pharmacology, Hematopoietins, Stem Cells (Terapia contra el cáncer con dosis altas: Farmacología, hematopoyetinas, células madre); Baltimore: Williams y Wilkins pp750-754, 1992.
3. Mitchell MS, Harel W, Kan-Mitchell J, et al. Active specific immunotherapy of melanoma with allogeneic cell lysates: rationale, results and possible mechanisms of action (Inmunoterapia activa específica de melanoma con lisados celulares alogénicos: Base lógica, resultados y mecanismos posibles de acción). En: J.-C. Bystry, S. Ferrone y P. Livingston (eds.), Specific Immunotherapy of Cancer with Vaccines (Inmunoterapia específica de cáncer con vacunas); Ann. N.Y. Acad. Sci. pp153-166, 1993.
4. Quan WDY Jr, Mitchell MS. Principles of biologic therapy (Principios de terapia biológica). En: C.M. Haskell, ed. Cancer Treatment (Tratamiento contra el cáncer); Philadelphia: W.B. Saunders pp57-69, 1995.
5. Mitchell MS, Jakowatz J, Harel W, et al. Increased effectiveness of interferon-alfa 2b following active specific immunotherapy for melanoma (Efectividad incrementada de interferones-alfa 2b después de inmunoterapias activas específicas para el melanoma). J Clin Oncol 12:402-411, 1994.
6. Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma (Un gen que codifica a un antígeno reconocido por los linfocitos T citolíticos en un melanoma humano). Science (Ciencia) 254:1643-1647, 1991.
7. Gaugler B, Van der Eynde B, Van der Bruggen P, et al. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes (Códigos MAGE-3 genéticos humanos para un antígeno reconocido en un melanoma por linfocitos citolíticos T autólogos). J Exp Med 179:921-930, 1994.
8. Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, et al. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes (Identificación de los péptidos inmuno dominantes de los antígenos MART-1 de melanoma humano reconocidos por la mayoría de linfocitos que se infiltran a tumores restringidos por HLA-A2) J Exp Med 180:347-352, 1994.
9. Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, et al. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas (Los códigos genéticos de tirosinasa para un antígeno reconocido por linfocitos T citolíticos autólogos en melanomas de HLA-A2). J Exp Med 178:489-495, 1993.
10. Robbins PF, el-Gamil M, Kawakami Y, Stevens E, Yannelli JR, Rosenberg SA. Recognition of tyrosinase by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient responding to immunotherapy (Reconocimiento de la tirosinasa por linfocitos que se infiltran a tumores de un paciente respondiendo a inmunoterapia). Cancer (Cáncer) Res 54:3124-3126, 1994.
11. Bakker AB, Schreurs MW, de Boer AJ, et al. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes (El antígeno gp100 de linaje específico de melanocitos es reconocido por linfocitos que se infiltran a tumores derivados del melanoma). J Exp Med 179:1005-1009, 1994.
12. Wolfel T, Van Pel A, Brichard V, et al. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes (Dos nonapéptidos de tirosinasa reconocidos en el melanoma HLA-A2 por linfocitos T citolíticos autólogos). Eur J Immunol 24:759-764, 1994.
13. Visseren MJW, Van Elsas A, Van der Voort EIH, et al. CTL specific for the tyrosinase autoantigen can be induced from healthy donor blood to lyse melanoma cells (Un CTL específico para el antígeno de tirosinasa puede ser introducido de sangre de donantes saludables para lisar las células de melanoma). J Immunol 154:3991-3998, 1995.
14. Rubin JT, Lotze MT. Adoptive cellular immunotherapy of cancer (Inmunoterapia celular adoptiva de cáncer). En: M.S. Mitchell (ed.), Biological Approaches to Cancer Treatment. Biomodulation (Métodos biológicos para tratamiento del cáncer. Bio - modulación); Nueva York: McGraw-Hill pp379-410, 1993.
15. Yee, C, Thompson, JA, Byrd, D, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones from the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration and antitumor effect of transferred T cells (Terapia adoptiva de células T que usa a clones de células CD8+ T de antígenos específicos del tratamiento de pacientes con melanoma metastásico: Persistencia, migración y efectos antitumoral in vivo de células T transfectadas). PNAS 99:16168-16173, 2002.
16. Dudley ME, Wunderlich, JR, Robbins PF, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after

clonal

repopulation with antitumor lymphocytes (Regresión cancerígena y autoinmunidad en pacientes después de una re-población clónica con linfocitos antitumorales). *Science (Ciencia)* 298:850-854, 2002.

17. Oelke M, Maus MV, Didiano, D et al. Ex vivo induction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Ig-coated artificial antigen-presenting cells (Inducción ex vivo y expansión de células citotóxicas T de antígenos específicos por células que contienen antígenos artificiales cubiertos por HLA-Ig). *Nat Med* 9:619-624, 2003.

18. Leturcq DL, Richards JM, Jackson MR, Peterson PA y Moriarty AM. Ex Vivo Generation of Potent Cytotoxic T Lymphocytes for the Treatment of Cancer: A Novel Antigen Presentation System (Generación ex vivo de linfocitos potentes citotóxicos T del tratamiento del cáncer: Un sistema nuevo de presentación de antígenos). *Society of Biological Therapy (Sociedad de terapia biológica)* 17ª reunión anual; abstracto #40, 2002.

19. Jackson MR, Song ES, Yang Y, et al. Empty and peptide-containing conformers of class I major histocompatibility complex molecules expressed in *Drosophila melanogaster* cells (Conformadores vacíos y que contienen a péptidos de moléculas complejas de histocompatibilidad importante de clase I expresadas en células de *Drosophila melanogaster*). *Proc Natl Acad Sci, Estados Unidos de América* 89:12117-12121, 1992.

20. Cai Z, Brunmark A, Luxembourg AT, et al. Probing the activation requirements for naive CD8⁺ T cells with *Drosophila* cell transfectants as antigen presenting cells (Sondeo de los requerimientos de activación para células CD8⁺ T nativas con transfectantes de células de *Drosophila* en calidad de células que contienen antígenos). *Immunol Rev* 165:249-265, 1998.

21. Yee, C., Savage, P.A., Lee, P.P et al. Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramer (Aislamiento de CTLs de alta avidez que son reactivos al melanoma provenientes de poblaciones heterogéneas que usan a tetrámeros de péptidos-MHC). *J Immunol* 162:227-2234, 1999.

22. Mitchell MS, Darrah D, Yeung D et al. Phase I trial of adoptive immunotherapy with cytolytic T lymphocytes immunized against a tyrosinase epitope (Ensayo de la fase I de inmunoterapia adoptiva con linfocitos citolíticos T inmunizados en contra de un epítipo de tirosinasa). *J Clin Oncol* 20:1075-1086, 2002.

23. Richards JM, Moriarty AM, Leturcq DL, Jackson MR y Peterson PA. Treatment of advanced malignant melanoma with ex vivo-generated autologous T cells with specificity for melanoma-associated target antigens (Tratamiento de melanoma maligno avanzado con células T autólogas generadas ex vivo con especificidad para antígenos objetivos asociados con el melanoma). Reunión anual de ASCO, San Francisco, CA, mayo de 2001.

24. Richards JM, Moriarty AM, Leturcq DL et al. Treatment of advanced malignant melanoma with autologous, ex vivo-generated T cells with specificity for melanoma-associated target antigens (Tratamiento de melanoma avanzado maligno con células T autólogas generadas ex vivo para antígenos objetivos asociados con el melanoma). Reunión anual de ASCO, Chicago, IL, junio de 2003.

25. Dorval, T, Palangies, T, Jouve M et al. Clinical phase II trial of recombinant DNA interferon (interferon alpha 2b) in patients with metastatic malignant melanoma (Ensayo clínico de la fase II de interferones de ADN recombinante (interferón alfa 2b) en pacientes con melanoma metastásico maligno). *Cancer (Cáncer)* 58:215-218, 1986.

26. Sertoli MR, Bernengo MG, Ardizzoni A, et al. Phase II trial of recombinant alpha-2b interferon in the treatment of metastatic skin melanoma (Ensayo de la fase 2 de interferones alfa-2b recombinantes en el tratamiento de melanoma metastásico de la piel). *Oncology (Oncología)* 46:96-98, 1989.

27. Robincon WA, Mughal TI, Thomas MR, et al. Treatment of metastatic malignant melanoma with recombinant interferon alpha 2 (Tratamiento de melanoma metastásico maligno con interferones alfa 2 recombinantes). *Immunobiology (Inmunobiología)* 172:275-282, 1986.

28. Rosenberg, SA, Yang JC, Topalian SL, et al. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin-2 (Tratamiento de 283 pacientes consecutivos con melanoma metastásico o cáncer de células renales utilizando dosis altas de interleucina-2). *JAMA* 271:907-9113, 1994.

29. North, RJ. Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on the elimination of tumor induced suppressor cells (La inmunoterapia adoptiva facilitada por la ciclofosfamida de un tumor establecido depende de la eliminación de células opresoras inducidas por tumores). *J Exp Med*

155:1063-1074.

30. Mills, C.D., and North, R.J.: Expression of passively transferred immunity against an established tumor depends on generation of cytolytic T cells in recipient (La expresión de inmunidad transferida pasivamente en contra de un tumor establecido depende de la generación de células T citolíticas en el receptor). *J Exp Med* 157:1448-1460, 1983.

31. Dudley, M., J. Wunderlich, J. C. Yang, et al. A Phase I study of non-myeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma (Un estudio de la fase I de quimioterapia no mieloblástica y la transferencia adoptiva de linfocitos T de antígenos específicos de tumores en pacientes con melanoma metastásico). *J Immunother* 25:243-251, 2002.

32. Childs, Chemoff, A., Contentin, N. et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation (Regresión de carcinoma metastásico de células renales después de trasplantes de células madres de sangre periférica alogénica no mieloblástica). *NEJM* 343:750-758, 2000.

33. Beutler, E. et al. Marrow suppression produced by repeated doses of cladribine (Supresión medular producida por dosis repetidas de cladribina). *Acta Haematol* 91:10-15, 1994.

34. Beutler, E. et al. The treatment of chronic progressive multiple sclerosis with cladribine (Tratamiento de esclerosis múltiple progresiva crónica con cladribina). *Proc Natl Acad Sci, Estados Unidos de América* 93:1716-1720, 1996.

35. Rice, GPA et al. Cladribine and progressive MS: Clinical and MRI outcomes of a multicenter controlled trial (Cladribina y MS progresiva: Resultados clínicos y de resonancia magnética de un ensayo controlado de varios centros). *Neurology (Neurología)* 54:1145-1155, 2000.

36. Romine, JS, Sipe, JC, Koziol, JA et al. A double-blind, placebo-controlled, reandomized trial of cladribine in relapsing-remitting multiple sclerosis (Un ensayo aleatorio de placebos controlados de doble enlace de cladribina en esclerosis múltiple con relapsos-remisiones). *Proc Assoc Amer Physicians (Médicos)* 111:35-44, 1999.

37. von Rohr, A, Schmitz, S-FH, Tichelli, A et al. Treatment of hairy cell leukemia with cladribine (2-chlorodeoxyadenosine) by subcutaneous bolus injection: a phase II study (Tratamiento de leucemia de células peludas con cladribina (2-clorodeoxiadenosina) por medio de la inyección de dosis subcutánea: Un estudio de la fase II). *Annals of Oncology (Anales Oncológicos)* 13:1641-1649, 2002.

38. View, J, Su, Z, y Dannull, J. Enhancement of antitumor immunity following depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells (Mejora de la inmunidad antitumoral después de la reducción de células T regulatorias de CD4+CD25+). *Actas de la reunión anual de ASCO Abst* 2506, 2004.

39. Keilholz, U., Goldin-Lang, P, Bechrakis, NE et al. Quantitative detection of circulating tumor cells in cutaneous and ocular melanoma and quality assessment by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Detección cuantitativa de células circulantes tumorales en melanomas cutáneos y oculares y evaluación de la calidad por medio de reacciones en cadena de transcriptasas-polimerasas en reversa en tiempo real). *Clinical Cancer Research (Investigación Clínica del Cáncer)* 10:1605-1612, 2004.

40. Hoon, DSB, Bostick, P, Kuo, C et al. Molecular markers in blood as surrogate prognostic indicators of melanoma recurrence (Marcadores moleculares en la sangre en calidad de indicadores pronósticos sustitutos de la recurrencia del melanoma). *Cancer Research (Investigación sobre el Cáncer)* 60:2253-2257, 2000.

41. Goydos, JS and Reintgen, DS. A molecular technique useful in the detection of occult metastases in patients with melanoma (Una técnica molecular útil para la detección de metástasis oculta en pacientes con melanoma). En: B.J. Nickoloff (ed.) *Methods in Molecular Medicine, Vol 61: Melanoma: Methods and Protocols (Métodos en medicina molecular, volumen 61: Melanoma: Métodos y protocolos)*; Totowa, NJ:Humana Press pp.301-320.

Reivindicaciones

1. Cladribina para su uso como un agente linfo-reductor en un método para tratar a un sujeto que tenga la necesidad del tratamiento para el cáncer, donde dicho método comprende:

- (a) obtener células CD8+ T nativas del sujeto;
- (b) contactar a las células CD8+ T nativas con células que contienen antígenos xenogénicos cargadas con uno o más antígenos de péptidos, generando, por lo tanto, a CTLs activados que están dirigidos a células que expresan al uno o más antígenos de péptidos mencionados;
- (c) administrar al sujeto a los CTLs activados;
- (d) administrar al sujeto por lo menos 2 citoquinas que efectúen una persistencia CTL; y
- (e) administrar al sujeto cladribina.

donde la administración de cladribina empieza antes de la administración de las CTLs activadas.

2. El uso de cladribina en calidad de un agente linfo-reductor para la fabricación del medicamento para tratamiento de un sujeto que necesite un tratamiento para el cáncer, donde dicho método comprende:

- (a) obtener células CD8+ T nativas del sujeto;
- (b) contactar a las células CD8+ T nativas con células que contienen antígenos xenogénicos cargadas con uno o más antígenos de péptidos, generando, por lo tanto, a CTLs activadas dirigidas a células que expresan al uno o más antígenos de péptidos mencionados;
- (c) administrar al sujeto las CTLs activadas;
- (d) administrar al sujeto a por lo menos 2 citoquinas que efectúan una persistencia CTL; y
- (e) administrar al sujeto cladribina.

donde la administración de cladribina empieza antes de la administración de las CTLs activadas.

3. Cladribina para su uso de acuerdo a la reivindicación 1, o el uso de acuerdo a la reivindicación 2, donde dicho mínimo de 2 citoquinas comprende a interferón- α -2b y a interleucina-2.

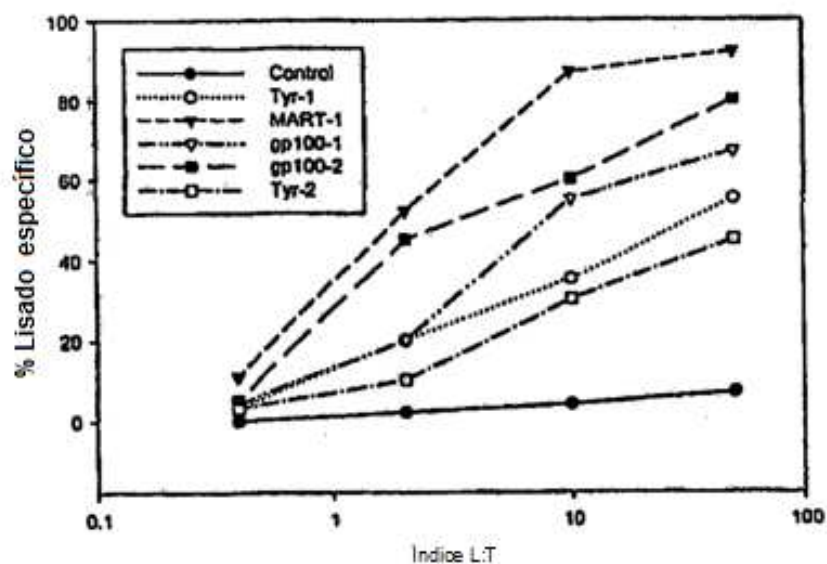
4. Cladribina para su uso de acuerdo a la reivindicación 3, o un uso de acuerdo a la reivindicación 3, donde dicho mínimo de un antígeno de péptidos comprende a una secuencia de aminoácidos derivada de una proteína seleccionada de gp100, tirosinasa, y MART-1.

5. Cladribina para su uso de acuerdo a la reivindicación 1, o el uso de acuerdo a la reivindicación 2, donde dicho mínimo de uno o más antígenos de péptidos consiste de los antígenos de péptidos derivados de las proteínas humanas gp100, tirosinasa, y MART-1

6. Cladribina para su uso de acuerdo a la reivindicación 1, o el uso de acuerdo a la reivindicación 2, donde cada uno de dicho mínimo de uno o más antígenos de péptidos es seleccionado de un grupo que consiste de YMNGTMSQV (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1), YMDGTMSQV (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2), AAGIGILTV (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 3), ITDQVPFSV (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 4), YLEPGPVTA (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 5), y KTWGQYWQV (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 6).

7. Cladribina para su uso de acuerdo a la reivindicación 6, o un uso de acuerdo a la reivindicación 6, donde dicho cáncer es un melanoma.

Figura 1: actividad citolítica de CTLs generados ex vivo versus células objetivo cargadas por péptidos



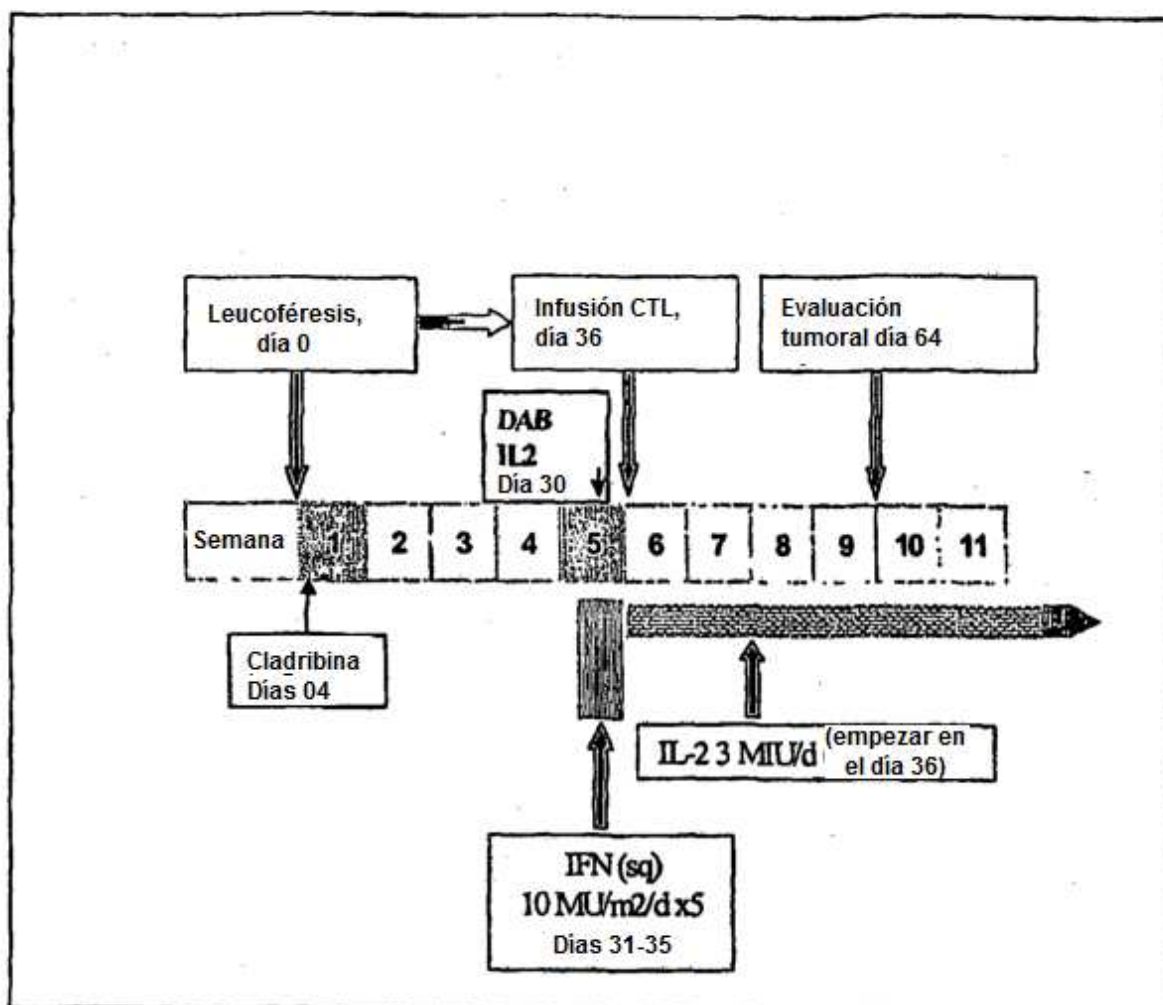


Figura 2