

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 145**

51 Int. Cl.:

A01N 25/00	(2006.01)
A01N 63/00	(2006.01)
A61K 35/26	(2006.01)
A61K 35/28	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A61K 31/66	(2006.01)
A61K 38/20	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)
A61K 35/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2003 PCT/US2003/027873**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2004 WO04021995**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2003 E 03794636 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 1545204**

54 Título: **Inmunoterapia con linfocitos específicos de antígeno seleccionados in vitro después de quimioterapia supresora de linfocitos no mieloablativa**

30 Prioridad:

06.09.2002 US 408681 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2017

73 Titular/es:

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)
The National Institute of Health, Office of Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard, Suite 325
Rockville, MD 20852, US

72 Inventor/es:

DUDLEY, MARK E.;
ROSENBERG, STEVEN A. y
WUNDERLICH, JOHN R.

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

Observaciones:

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

ES 2 602 145 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).

DESCRIPCIÓN

Immunoterapia con linfocitos específicos de antígeno seleccionados *in vitro* después de quimioterapia supresora de linfocitos no mieloablativa

5

Campo técnico de la invención

[0001] La presente invención se refiere al uso combinado de inmunoterapia y quimioterapia para promover la regresión de un cáncer en un mamífero.

10

Antecedentes de la invención

[0002] La inmunoterapia de pacientes con cáncer requiere la generación *in vivo* de grandes números de linfocitos antitumorales altamente ávidos que puedan vencer la tolerancia normal y sufrir un ataque contra un tumor sólido. La inmunización de pacientes con melanoma con antígenos del cáncer puede aumentar el número de células precursoras de linfocitos T citotóxicos CD8+ (pCTL) circulantes, pero esto no se ha correlacionado con regresión tumoral clínica, sugiriendo un defecto en la función o activación de pCTL (Rosenberg et al., Nat. Med 4: 321 (1998)).

15

[0003] La terapia de transferencia adoptiva de células proporciona la oportunidad de vencer mecanismos tolerogénicos, permitiendo la selección y activación *ex vivo* de subpoblaciones de linfocitos T altamente seleccionadas y manipulando el entorno del huésped dentro del que se introducen los linfocitos T. Ensayos clínicos previos, que incluyen la transferencia de linfocitos T antitumorales clonados altamente activos, dejaron de demostrar injerto funcionante y persistencia de las células transferidas (Rosenberg et al., J. Nat'l. Cancer Inst. 86(15): 1159 (1994); Yee et al., J. Exp. Med. 192: 1637 (2000); Dudley et al., J. Immunother. 24(4): 363 (2001); Dudley et al., J. Immunother. 25(3): 243 (2002)). La supresión de linfocitos puede tener un marcado efecto sobre la eficacia de la terapia de transferencia de linfocitos T en modelos murinos (Berenson et al., J. Immunol. 115: 234 (1975); Eberlein et al., J. Exp. Med. 156: 385 (1982); North, J. Exp. Med. 155: 1063 (1982); y Rosenberg et al., Science 233: 1318 (1986)) y puede depender de la destrucción de células supresoras, alteración de la regulación de linfocitos T homeostáticos, o anulación de otros mecanismos tolerogénicos normales.

20

[0004] La presente invención busca vencer las deficiencias en la materia proporcionando un método combinado de quimioterapia supresora de linfocitos no mieloablativa e inmunoterapia en el que las células transferidas se injertan y persisten y promueven la regresión de un cáncer. Estos y otros objetivos y ventajas de la presente invención, además de características inventivas adicionales, serán evidentes a partir de la descripción detallada proporcionada en el presente documento.

25

Breve resumen de la invención

[0005] La presente invención proporciona las siguientes realizaciones como se exponen brevemente en los puntos 1 a 28.

30

1. Uso de (a) un agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, y (b1) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, y expandidos *in vitro* solo una vez, y (b2) un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos, en la preparación de un medicamento para promover la regresión de un cáncer en un mamífero, en el que (b1) y (b2) son para administración posterior a la administración de (a), y en el que (b2) va a administrarse tanto concomitantemente con (b1) como posteriormente a (b1), por la misma vía o una vía diferente.

45

2. Uso de (a) un agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y, (b) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, modificados para expresar un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos, y expandidos *in vitro* solo una vez, en la preparación de un medicamento para promover la regresión de un cáncer en un mamífero, en el que (b) va a administrarse posteriormente a la administración de (a).

50

3. El uso del punto 1 ó 2, en el que el factor de crecimiento de linfocitos T es interleucina-2 (IL-2), interleucina-7 (IL-7), interleucina-15 (IL-15), o una combinación de dos o todas de las anteriores.

55

4. El uso de uno cualquiera de los puntos 1-3, en el que (a) comprende ciclofosfamida y fludarabina, y en el que van a administrarse preferentemente aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida durante dos días después de los cuales van a administrarse aproximadamente 25 mg/m² de fludarabina durante cinco días.

60

5. El uso del punto 4, en el que la ciclofosfamida y la fludarabina van a administrarse por vía intravenosa.

6. El uso de uno cualquiera de los puntos 1, 3, 4 ó 5, en el que va a administrarse una dosis de aproximadamente 720.000 UI/kg de IL-2 tres veces al día hasta la tolerancia, preferentemente como una inyección en bolo, por el cual van a administrarse preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 dosis de IL-2 y más preferentemente aproximadamente 9 dosis de IL-2.

65

7. El uso de uno cualquiera de los puntos 1-6, en el que van a administrarse de aproximadamente $2,3 \times 10^{10}$

linfocitos T a aproximadamente $13,7 \times 10^{10}$ linfocitos T, preferentemente aproximadamente $7,8 \times 10^{10}$ linfocitos T, preferentemente como una infusión intravenosa, y en el que la infusión intravenosa dura preferentemente aproximadamente 30-60 min.

8. El uso de uno cualquiera de los puntos 1-7, en el que el cáncer es melanoma.

5 9. El uso de uno cualquiera de los puntos 1-8, en el que los linfocitos T se unen al antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T-1 (MART-1).

10. El uso de uno cualquiera de los puntos 1-9, en el que el cáncer es metastásico.

11. El uso de uno cualquiera de los puntos 1-10, en el que el mamífero es un ser humano.

10 12. Uso de (a) ciclofosfamida y fludarabina, y (b1) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz porMART-1, y expandidos *in vitro* solo una vez, y (b2) IL-2 en la preparación de un medicamento para promover la regresión de melanoma metastásico en un ser humano, en el que van a administrarse aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida por vía intravenosa durante dos días seguido de administración intravenosa de aproximadamente 25 mg/m^2 de fludarabina durante cinco días, y en el que van a administrarse aproximadamente $2,3 \times 10^{10} - 13,7 \times 10^{10}$ linfocitos T autólogos como una infusión, y en el que va a administrarse un bolo de aproximadamente 720.000 UI/kg de IL-2 tres veces al día hasta la tolerancia, por el cual el bolo va a administrarse tanto concomitantemente con los linfocitos T autólogos como posteriormente a los linfocitos T autólogos, y en el que (b1) y (b2) van a administrarse por vía intravenosa posterior a la administración de (a).

20 13. Uso de (a) ciclofosfamida y fludarabina, y (b) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz porMART-1, modificados para expresar IL-2, y expandidos *in vitro* solo una vez, en la preparación de un medicamento para promover la regresión de melanoma metastásico en un ser humano, en el que van a administrarse aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida por vía intravenosa durante dos días seguido de administración intravenosa de aproximadamente 25 mg/m^2 de fludarabina durante cinco días, y en el que van a administrarse aproximadamente $2,3 \times 10^{10} - 13,7 \times 10^{10}$ linfocitos T autólogos como una infusión, y en el que (b) es para administración intravenosa posterior a la administración de (a).

25 14. El uso del punto 12 ó 13, en el que van a administrarse aproximadamente $7,8 \times 10^{10}$ linfocitos T.

15. El uso del punto 12 ó 14, en el que van a administrarse de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 dosis de IL-2, preferentemente aproximadamente 9 dosis de IL-2.

30 16. El uso de uno cualquiera de los puntos 12-15, en el que la infusión intravenosa dura aproximadamente 30-60 min.

35 17. (a) Un agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, y (b1) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, por estimulación de los linfocitos T *in vitro* con el antígeno del cáncer, y expandidos *in vitro* solo una vez por estimulación adicional con el antígeno del cáncer, y (b2) un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos, para su uso en promover la regresión de un cáncer en un mamífero, en el que (b1) y (b2) van a administrarse posteriormente a la administración de (a), y en el que (b2) va a administrarse tanto concomitantemente con (b1) como posteriormente a (b1), por la misma vía o una vía diferente.

40 18. (a) Un agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, y (b) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, por estimulación de los linfocitos T *in vitro* con el antígeno del cáncer, modificados para expresar un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos, y expandidos *in vitro* solo una vez por estimulación adicional con el antígeno del cáncer, para su uso en promover la regresión de un cáncer en un mamífero, en el que (b) va a administrarse posteriormente a la administración de (a).

45 19. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos del punto 17 o 18 para el uso según el punto 17 ó 18, en el que el factor de crecimiento de linfocitos T es IL-2, IL-7, IL-15, o una combinación de dos o todas de las anteriores.

50 20. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos de uno cualquiera de los puntos 17-19 para el uso según uno cualquiera de los puntos 17-19, en el que (a) comprende ciclofosfamida y fludarabina, y en el que preferentemente van a administrarse aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida durante dos días después de la cual van a administrarse aproximadamente 25 mg/m^2 de fludarabina durante cinco días.

55 21. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos del punto 20 para el uso según el punto 20, en el que la ciclofosfamida y la fludarabina van a administrarse por vía intravenosa.

60 22. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos de uno cualquiera de los puntos 17, 19, 20 y 21 para el uso según uno cualquiera de los puntos 17, 19, 20 y 21, en el que va a administrarse una dosis de aproximadamente 720.000 UI/kg de IL-2 tres veces al día hasta la tolerancia, preferentemente como una inyección intravenosa en bolo, por el cual preferentemente van a administrarse de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 dosis de IL-2, y más

preferentemente van a administrarse aproximadamente 9 dosis de IL-2.

23. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos de uno cualquiera de los puntos 17-22 para el uso según uno cualquiera de los puntos 17-22, en el que van a administrarse de aproximadamente $1,2 \times 10^{10}$ linfocitos T a aproximadamente $4,3 \times 10^{10}$ linfocitos T, preferentemente los linfocitos T van a administrarse como una infusión intravenosa, y preferentemente la infusión intravenosa dura aproximadamente 30-60 min.

24. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos de uno cualquiera de los puntos 17-23 para el uso según uno cualquiera de los puntos 17-23, en el que el cáncer es melanoma.

25. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos del punto 24 para el uso según el punto 24, en el que los linfocitos T se unen a MART-1.

26. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos de uno cualquiera de los puntos 17-25 para el uso según uno cualquiera de los puntos 17-25, en el que el cáncer es metastásico.

27. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos de uno cualquiera de los puntos 17-26 para el uso según uno cualquiera de los puntos 17-26, en el que el mamífero es un ser humano.

28. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos de uno cualquiera de los puntos 17-27 para el uso según uno cualquiera de los puntos 17-27, en el que el antígeno del cáncer consiste en los aminoácidos 26-35 de MART-1, en el que el aminoácido 27 se ha sustituido con leucina, y/o el antígeno del cáncer consiste en los aminoácidos 209-217 de gp 100, en el que el aminoácido 210 se ha sustituido con metionina.

En el presente documento se desvela un método de promover la regresión de un cáncer en un mamífero. El método comprende (i) administrar al mamífero quimioterapia supresora de linfocitos no mieloablativa y (ii) posteriormente administrar (a) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, y rápidamente expandidos *in vitro* solo una vez, y, tanto concomitantemente con los linfocitos T autólogos como posteriormente a los linfocitos T autólogos, por la misma vía o una vía diferente, un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos, o (b) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, modificados para expresar un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos, y rápidamente expandidos *in vitro* solo una vez, tras lo cual se promueve la regresión del cáncer en el mamífero.

[0006] También se desvela en el presente documento un método de promover la regresión de melanoma metastásico en un ser humano. El método comprende (i) administrar por vía intravenosa aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida durante dos días seguido de aproximadamente 25 mg/m² de fludarabina durante cinco días y (ii) posteriormente administrar por vía intravenosa (a) una infusión de aproximadamente $2,3 \times 10^{10}$ - $13,7 \times 10^{10}$ linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por MART-1, y rápidamente expandidos *in vitro* solo una vez, y, tanto concomitantemente con los linfocitos T autólogos como posteriormente a los linfocitos T autólogos, un bolo de aproximadamente 720.000 UI/kg de IL-2 tres veces al día hasta la tolerancia, o (b) una infusión de aproximadamente $2,3 \times 10^{10}$ - $13,7 \times 10^{10}$ linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por MART-1, modificados para expresar IL-2, y rápidamente expandidos *in vitro* solo una vez, tras lo cual se promueve la regresión del melanoma metastásico en el ser humano.

[0007] También se desvela otro método de promover la regresión de un cáncer en un mamífero. El método comprende (i) administrar al mamífero quimioterapia supresora de linfocitos no mieloablativa, y (ii) posteriormente administrar (a) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, por estimulación de los linfocitos T *in vitro* con el antígeno del cáncer, y, opcionalmente, rápidamente expandidos *in vitro* al menos una vez por estimulación adicional con el antígeno del cáncer, y, tanto concomitantemente con los linfocitos T autólogos como posteriormente a los linfocitos T autólogos, por la misma vía o una vía diferente, un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos, o (b) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, por estimulación de los linfocitos T *in vitro* con el antígeno del cáncer, modificados para expresar un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos, y, opcionalmente, rápidamente expandidos al menos una vez *in vitro* por estimulación adicional con el antígeno del cáncer, tras lo cual se promueve la regresión del cáncer en el mamífero.

Descripción detallada de la invención

[0008] La presente divulgación proporciona un método de promover la regresión de un cáncer en un mamífero. Deseablemente, la regresión es completa, aunque un experto habitual en la materia apreciará que puede ser
5 beneficioso cualquier grado de regresión.

[0009] El método puede usarse para promover la regresión de cualquier cáncer que expresa un antígeno que puede reconocerse por linfocitos T autólogos seleccionados *in vitro*. Ejemplos de tales cánceres incluyen melanoma, carcinoma de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, y similares. El método es
10 particularmente útil para promover la regresión de melanoma, que incluye melanoma metastásico, en un mamífero.

[0010] El mamífero puede ser cualquier mamífero. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

[0011] El método comprende (i) administrar al mamífero quimioterapia supresora de linfocitos no mieloablativa y (ii)
15 (a) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, y rápidamente expandidos *in vitro* solo una vez, y, tanto concomitantemente con los linfocitos T autólogos como posteriormente a los linfocitos T autólogos, por la misma vía o una vía diferente, un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos, o (b) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada
20 avidéz por un antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, modificados para expresar un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos, y rápidamente expandidos *in vitro* solo una vez. Los linfocitos T autólogos pueden ser heterogéneos, es decir, fenotípicamente diversos, por ejemplo, incluyen linfocitos T CD4+, entre otros, y/o pueden reconocer más de un antígeno del cáncer, tal como dos, tres, cuatro, o más antígenos. El (Los) antígeno(s) no necesitan ser únicos para el cáncer.

[0012] Alternativamente, el método (denominado en el presente documento “el método alternativo”) comprende (i)
25 administrar al mamífero quimioterapia supresora de linfocitos no mieloablativa, y (ii) posteriormente administrar (a) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, por estimulación de los linfocitos T *in vitro* con el antígeno del cáncer, y, opcionalmente, rápidamente expandidos *in vitro* al menos una vez por estimulación adicional con el antígeno del cáncer, y, tanto concomitantemente con los linfocitos T autólogos como posteriormente a los linfocitos T autólogos, por la misma vía o una vía diferente, un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos, o (b) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, por estimulación
35 de los linfocitos T *in vitro* con el antígeno del cáncer, modificados para expresar un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos, y, opcionalmente, rápidamente expandidos *in vitro* al menos una vez por estimulación adicional con el antígeno del cáncer, tras lo cual se promueve la regresión del cáncer en el mamífero. Los linfocitos T autólogos pueden ser heterogéneos, es decir, fenotípicamente diversos, por ejemplo, incluyen linfocitos T CD4+, entre otros, y/o pueden reconocer más de un
40 antígeno del cáncer, que no necesitan ser únicos para el cáncer, tal como MART-1, en particular un péptido que consiste en los aminoácidos 26-35 de MART-1, en el que el aminoácido 27 se ha sustituido con leucina, o gp100, en particular un péptido que consiste en los aminoácidos 209-217 de gp100, en el que el aminoácido 210 se ha sustituido con metionina.

[0013] La quimioterapia supresora de linfocitos no mieloablativa puede ser cualquier terapia adecuada tal, que pueda administrarse por cualquier vía adecuada. La quimioterapia supresora de linfocitos no mieloablativa puede comprender la administración de ciclofosfamida y fludarabina, particularmente si el cáncer es melanoma, que puede ser metastásico. Una vía preferida de administración de ciclofosfamida y fludarabina es por vía intravenosa. Asimismo, puede administrarse cualquier dosis adecuada de ciclofosfamida y fludarabina. Preferentemente, se
50 administran aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida durante dos días después de los cuales se administran aproximadamente 25 mg/m² de fludarabina durante cinco días, particularmente si el cáncer es melanoma.

[0014] Los linfocitos T autólogos pueden aislarse del mamífero por cualquier medio adecuado como se conoce en la técnica y se ejemplifica en el presente documento en los Ejemplos 1 y 3. Similarmente, métodos de selección para
55 el reconocimiento altamente ávido de un antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, se conocen en la técnica y se ejemplifican en el presente documento en los Ejemplos 1 y 3. Los linfocitos T autólogos deben ser rápidamente expandidos *in vitro* solo una vez, según métodos conocidos en la técnica y ejemplificados en el presente documento en el Ejemplo 1, o, opcionalmente, al menos una vez (por ejemplo, una vez, dos veces o tres veces), según métodos conocidos en la técnica y ejemplificados en el presente documento en el Ejemplo 3 (el método alternativo). Por “reconocimiento altamente ávido” se indica reconocimiento limitado por HLA y específico de antígeno de un antígeno de un cáncer como se demuestra, por ejemplo, por la función de linfocitos T, tal como liberación de citocinas o citólisis.

[0015] La expansión rápida (como se usa en el presente documento, “expansión rápida” significa un aumento en el
60 número de linfocitos T específicos de antígeno de al menos aproximadamente 3 veces (ó 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 veces)

durante un periodo de una semana, más preferentemente al menos aproximadamente 10 veces (o 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 veces) durante un periodo de una semana, o lo más preferentemente al menos aproximadamente 100 veces durante un periodo de una semana) de cultivos de linfocitos T puede llevarse a cabo por cualquiera de varios métodos como se conocen en la técnica. Por ejemplo, el método del Ejemplo 1 utiliza estimulación de receptores de linfocitos T no específicos en presencia de linfocitos nodriza y tanto IL-2 o IL-15, prefiriéndose IL-2. El estímulo de receptores de linfocitos T no específicos puede consistir en aproximadamente 30 ng/ml de OKT3, un anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón disponible de Ortho, Raritan, NJ.

[0016] La expansión rápida opcional (como se han definido anteriormente) de cultivos de linfocitos T según el método alternativo también puede llevarse a cabo por cualquiera de varios métodos como se conocen en la técnica. Por ejemplo, el método del Ejemplo 3 implica la estimulación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) *in vitro* con un antígeno (uno o más, que incluyen porciones antigénicas del mismo, tales como epítipo(s), o una célula) del cáncer, que puede expresarse opcionalmente a partir de un vector, tal como un péptido de unión a HLA-A2, por ejemplo, MART-1:26-35 (27L) 0,3 μ M o gp 100:209-217 (210M), en presencia de un factor de crecimiento de linfocitos T, tal como 300 U/ml de IL-2 o IL-15, prefiriéndose IL-2. Los linfocitos T inducidos *in vitro* se expanden rápidamente expandidos por re-estimulación con el (los) mismo(s) antígeno(s) del cáncer pulsados sobre células presentadoras de antígenos que expresan HLA-A2. Alternativamente, los linfocitos T pueden re-estimularse con linfocitos autólogos irradiados, o con linfocitos alogenos HLA-A2+ irradiados y IL-2, por ejemplo.

[0017] Si los linfocitos T autólogos se modifican para expresar un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos, puede usarse cualquier método adecuado de modificación como se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, Molecular Cloning, 3ª ed., SCHL Press (2001). Deseablemente, los linfocitos T autólogos modificados expresan el factor de crecimiento de linfocitos T a altos niveles. Secuencias codificantes del factor de crecimiento de linfocitos T, tales como la de IL-2, están fácilmente disponibles en la materia, ya que son promotores, cuyo enlace operable a una secuencia codificante del factor de crecimiento de linfocitos T promueve expresión de alto nivel.

[0018] Los linfocitos T pueden seleccionarse para reconocimiento altamente ávido de cualquiera de los antígenos únicos producidos como resultado de las 10.000 mutaciones genéticas estimadas codificadas por cada genoma de células tumorales. El antígeno, sin embargo, no necesita ser único. Los linfocitos T pueden seleccionarse para reconocimiento altamente ávido de uno o más antígenos de un cáncer, que incluyen una porción antigénica de uno o más antígenos, tales como un epítipo, o una célula del cáncer. Un "antígeno de un cáncer" y un "antígeno del cáncer" pretenden englobar todos los antígenos anteriormente mencionados. Si el cáncer es melanoma, tal como melanoma metastásico, preferentemente los linfocitos T están seleccionados por la elevada avidéz por MART-1 (tal como MART-1:26-35 (27L)), gp100 (tal como ge100:209-217 (210M)), o un antígeno "único" o específico de paciente derivado de una mutación codificada por tumor. Otros antígenos de melanoma adecuados para los que puede seleccionarse reconocimiento altamente ávido por linfocitos T incluyen, pero no se limitan a, tirosinasa, proteína relacionada con tirosinasa (TRP)1, TRP2 y MAGE. Pueden usarse antígenos, tales como NY-ESO-1, telomerasa, p53, HER2/neu, antígeno carcinoembrionario, o antígeno prostático específico, para seleccionar para el reconocimiento altamente ávido por linfocitos T para el tratamiento de carcinoma de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, y similares.

[0019] Los linfocitos T pueden administrarse por cualquier vía adecuada como se conoce en la técnica. Preferentemente, los linfocitos T se administran como una infusión intrarterial o intravenosa, que preferentemente dura aproximadamente 30-60 min. Otros ejemplos de vías de administración incluyen intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

[0020] Asimismo, puede administrarse cualquier dosis adecuada de linfocitos T. Preferentemente, se administran de aproximadamente $2,3 \times 10^{10}$ linfocitos T a aproximadamente $13,7 \times 10^{10}$ linfocitos T, con un promedio de aproximadamente $7,8 \times 10^{10}$ linfocitos T, particularmente si el cáncer es melanoma. Con respecto al método alternativo, preferentemente, se administran de aproximadamente $1,2 \times 10^{10}$ a aproximadamente $4,3 \times 10^{10}$ linfocitos T.

[0021] El factor de crecimiento de linfocitos T puede ser cualquier factor de crecimiento adecuado que promueva el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos administrados. Ejemplos de factores de crecimiento de linfocitos T adecuados incluyen IL-2, IL-7 e IL-15, que pueden usarse solos o en diversas combinaciones, tales como IL-2 e IL-7, IL-2 e IL-15, IL-7 e IL-15, o IL-2, IL-7 e IL-15. IL-2 es un factor de crecimiento de linfocitos T preferido. Una fuente preferida de IL-2 es Chiron, Emeryville, CA, mientras que una fuente preferida de IL-7 es Cytheris, Vanves, Frances. IL-15 puede obtenerse de PeproTech, Inc., Rocky Hill, NJ.

[0022] Estudios con ratones en los que se han inyectado células de melanoma murino B16 por vía subcutánea y que, después de 12 días, habían sido irradiados con una dosis subletal (500 rads) de radiación e inyectado con linfocitos T específicos de tumor (Pmel, derivado de ratón transgénico de linfocitos T), gp 100 humana del virus de la viruela aviar, y tanto IL-2, IL-7 y/o IL-15, indicaron que IL-2, IL-7 e IL-15 retrasan individualmente el crecimiento tumoral aproximadamente de la misma forma. Similarmente, IL-2 e IL-7, IL-2 e IL-15, e IL-7 e IL-15 retrasan el

crecimiento tumoral aproximadamente de la misma forma. Sin embargo, dos citocinas son más eficaces que una única citocina y tres citocinas, por ejemplo, IL-2, IL-7 e IL-15, son mejores que dos citocinas cualquiera. Datos preliminares sugieren que IL-15 potencia una respuesta de linfocitos T CD8+ específicos de tumor. A este respecto, la administración de células cultivadas en IL-15 con IL-2 (tal como una inyección en bolo) puede ser particularmente eficaz.

[0023] El factor de crecimiento de linfocitos T puede administrarse por cualquier vía adecuada. Si se administra más de un factor de crecimiento de linfocitos T, pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, y por la misma vía o vías diferentes. Preferentemente, el factor de crecimiento de linfocitos T, tal como IL-2, se administra por vía intravenosa como una inyección en bolo. Deseablemente, la dosificación del factor de crecimiento de linfocitos T, tal como IL-2, es lo que se considera por aquellos expertos habituales en la materia que es alta. Preferentemente, una dosis de aproximadamente 720.000 UI/kg de IL-2 se administra tres veces al día hasta la tolerancia, particularmente cuando el cáncer es melanoma. Preferentemente, se administran aproximadamente 5 a aproximadamente 12 dosis de IL-2, con un promedio de aproximadamente 9 dosis.

[0024] En vista de lo anterior, la presente divulgación proporciona un método de promover la regresión de melanoma metastásico en un ser humano. El método comprende (i) administrar por vía intravenosa aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida durante dos días seguido de aproximadamente 25 mg/m² de fludarabina durante cinco días y (ii) posteriormente administrar por vía intravenosa (a) una infusión de aproximadamente $2,3 \times 10^{10}$ - $13,7 \times 10^{10}$ linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz porMART-1, y rápidamente expandidos *in vitro* solo una vez, y, tanto concomitantemente con los linfocitos T autólogos como posteriormente a los linfocitos T autólogos, un bolo de aproximadamente 720.000 UI/kg de IL-2 tres veces al día hasta la tolerancia, o (b) una infusión de aproximadamente $2,3 \times 10^{10}$ - $13,7 \times 10^{10}$ linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz porMART-1, modificados para expresar IL-2, y rápidamente expandidos *in vitro* solo una vez, tras lo cual se promueve la regresión del melanoma metastásico en el ser humano. Preferentemente, se administran aproximadamente $7,8 \times 10^{10}$ linfocitos T. Preferentemente, se administran de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 dosis de IL-2, con un promedio de aproximadamente 9 dosis. Preferentemente, la infusión intravenosa dura aproximadamente 30-60 min.

[0025] El método anterior puede adaptarse para enfermedades de inmunodeficiencia y enfermedades autoinmunitarias, tales como el SIDA, además de enfermedades infecciosas, tales como infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

35 Ejemplos

[0026] Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención y no pretenden limitar su alcance de ningún modo.

40 Ejemplo 1

[0027] Este ejemplo describe el efecto de la supresión de linfocitos previa sobre la persistencia y la función de células adoptivamente transferidas.

[0028] Trece pacientes positivos para HLA-A2 con melanoma metastásico recibieron quimioterapia inmunosupresora con ciclofosfamida (60 mg/kg) durante dos días seguido de fludarabina (25 mg/m²) durante cinco días. El día siguiente a la dosis final de fludarabina, cuando los linfocitos y neutrófilos circulantes habían disminuido a menos de 20/mm³, cultivos de linfocitos T (derivados de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) obtenidos sembrando 1×10^6 células viables de una suspensión de células individuales de explante enzimáticamente digerido de melanoma metastásico en 2 ml de medio que contenía 6.000 UI/ml de IL-2 (Rosenberg et al. (1994), arriba; Dudley et al. (2002), arriba) y mantenidos a 5×10^5 - 2×10^6 células/ml hasta varios millones de linfocitos T, luego cribados para el reconocimiento de células tumorales por secreción de citocinas; los cultivos más activos se expandieron adicionalmente en IL-2 a un número total de células superior a 1×10^8 ; seguido de un ciclo de expansión rápida, usando células nodrizas alógenas irradiadas, anticuerpo para OKT3 e IL-2 (Riddell et al., J. Immunol. Methods 128: 189 (1990)), antes de uso) rápidamente expandidos, altamente seleccionados, autólogos, reactivos con tumor (liberación de IFN- γ superior a 100 pg/ml y al menos dos veces superior al control cuando se estimulan con un melanoma del mismo HLA-A2 o una línea de células de melanoma autólogas) se recogieron y se reunieron para la infusión intravenosa del paciente (promedio de $7,8 \times 10^{10}$ células; intervalo de $2,3 - 13,7 \times 10^{10}$ células) durante aproximadamente 30-60 min y terapia de IL-2 de alta dosis (720.000 UI/kg por infusión intravenosa en bolo cada ocho horas hasta la tolerancia; promedio de 9 dosis; intervalo de 5-12 dosis). Todos los pacientes tuvieron enfermedad progresiva resistente a las terapias convencionales, que incluyen IL-2 de dosis alta, y ocho pacientes también progresaron a quimioterapia agresiva.

[0029] La respuesta se evaluó por mediciones radiográficas y examen físico. Una respuesta completa se definió como la desaparición completa de toda enfermedad evaluable. Una respuesta parcial se definió como una

disminución igual o superior al 50 % en la suma de los productos de diámetros perpendiculares de todas las lesiones sin el crecimiento de ninguna lesión o la aparición de cualquier lesión nueva. Una respuesta mixta se definió como una disminución en el área de algunas lesiones con crecimiento simultáneo de otras lesiones o la aparición de nuevas lesiones. Seis de los 13 pacientes tuvieron respuestas clínicas objetivas al tratamiento y cuatro otros
 5 demostraron respuestas mixtas con encogimiento significativo de uno o más depósitos metastásicos. Se observó regresión tumoral objetiva en el pulmón, hígado, ganglios linfáticos y masas intraperitoneales, y en sitios cutáneos y subcutáneos. Cinco pacientes, todos con evidencia simultánea de regresión del cáncer, demostraron signos de destrucción autoinmunitaria de melanocitos. Todos los pacientes se recuperaron del tratamiento con cifras absolutas de neutrófilos superiores a $500/\text{mm}^3$ en el día 11, pero recuperación más lenta de células CD4 de la esperada tras la
 10 terapia con fludarabina (Cheson, J. Clin. Oncol. 13: 2431 (1995)). Un paciente tuvo una neumonía transitoria por el virus respiratorio sincitial durante el tratamiento que se curó en el plazo de una semana.

Ejemplo 2

15 **[0030]** Este ejemplo describe la función y el destino de los linfocitos T adoptivamente transferidos.

[0031] Se examinó la expresión de receptores de linfocitos T (TCR) en los seis pacientes para los que estuvieron disponibles muestras de sangre periférica una semana y aproximadamente un mes después de la transferencia de células, usando FACS de dos colores con un anticuerpo específico de CD8 conjugado con FITC y un panel de
 20 anticuerpos específicos de la región variable de la cadena β ($V\beta$) conjugados con PE. La expresión de $V\beta$ fue altamente distorsionada en cinco de los seis TIL administrados, y estas mismas familias de $V\beta$ también fueron expresadas en exceso en la sangre periférica de los pacientes una semana después de la transferencia de células. Dos pacientes presentaron persistencia prolongada de familias de $V\beta$ de receptores de linfocitos T individuales que predominaron en el repertorio de linfocitos T. En el plazo de algunos días desde el cese de la terapia de IL-2 tras la
 25 transferencia de TIL, estos dos pacientes presentaron una linfocitosis pronunciada, teniendo un paciente un recuento linfocítico absoluto (ALC) que llegaba a los niveles pico en sangre periférica de más de 21.000 células/ mm^3 en el día 7 después de la infusión de células, y teniendo el otro paciente un ALC que llegaba a los niveles pico en sangre periférica de más de 16.000 células/ mm^3 en el día 8 después de la infusión de células. Solo algunas familias de $V\beta$ dominaron el repertorio de linfocitos T de la sangre periférica cuando se analizaron con el panel de anticuerpos. Los
 30 linfocitos de sangre periférica (PBL) de un paciente (ALC de 21.000 células/ mm^3) muestreados en el pico de la linfocitosis fueron 94 % de CD8+, de los que el 63 % expresaron $V\beta 12$. Se observó una distorsión incluso más pronunciada del repertorio de linfocitos T en la sangre periférica del otro paciente (ALC de 16.000 células/ mm^3) muestreada en el pico de linfocitosis, cuando el 96 % de los linfocitos fueron CD8+, de los que el 97 % expresó $V\beta 7$.

35 **[0032]** Se realizaron análisis adicionales del uso de TCR en PBL usando RT-PCR con cebadores de PCR que se diseñaron para amplificar todas las familias de genes de $V\beta$ (McKee et al., J. Immunother. 23: 419 (2000)). Siete días después de la transferencia de células, se observaron fuertes productos de RT-PCR en PBL de un paciente (ALC de 21.000 células/ mm^3) para las reacciones con los cebadores $V\beta 12$ y $V\beta 14$ y bandas borrosas de las reacciones con los cebadores $V\beta 4$, $V\beta 6$ y $V\beta 13$. PBL del otro paciente (ALC de 16.000 células/ mm^3) ocho días
 40 después de la transferencia de TIL demostró un fuerte producto solo en la reacción usando los cebadores de $V\beta 7$. Así, a los niveles de ARN y de proteína, familias de $V\beta$ de TCR individuales constituyeron una mayoría de los linfocitos de sangre periférica de ambos pacientes una semana después de la transferencia de TIL.

[0033] Con el fin de evaluar la diversidad de TCR en las familias de $V\beta$ expresadas en exceso, se determinó la
 45 secuencia de nucleótidos de las regiones V-D-J de la cadena β . Se clonaron los productos de RT-PCR específicos de $V\beta 12$ de un paciente (ALC de 21.000 células/ mm^3), y se encontró que seis clones cada uno de PBL y TIL tenía secuencia idéntica y era idéntica a la secuencia de V-D-J del clon de linfocitos T reactivo con MART-1 derivado de TIL. MART-1 es un antígeno de diferenciación no mutado normal expresado en melanomas y melanocitos normales (Kawakami et al., PNAS USA 91: 3515 (1994)). La secuencia de los productos de RT-PCR específicos de $V\beta 7$ del
 50 otro paciente (ALC de 16.000 células/ mm^3) también tuvo secuencias de V-D-J idénticas, tanto derivadas de PBL, TIL, como de un clon de linfocitos T reactivo con MART-1 derivado de TIL. Estos resultados demuestran que las poblaciones de linfocitos T reactivos con MART-1 clonales en el TIL infundido en estos dos pacientes repoblaron los sistemas inmunitarios de estos pacientes. Además, estos resultados sugirieron que los clones individuales experimentaron una gran expansión numérica *in vivo*. Suponiendo un volumen de sangre promedio de 4 litros, un
 55 paciente (ALC de 21.000 células/ mm^3) tuvo más de $5,0 \times 10^{10}$ linfocitos $V\beta 12$ circulantes, mientras que fue infundido con solo aproximadamente $1,2 \times 10^{10}$ TIL $V\beta 12$. El otro paciente (ALC de 16.000 células/ mm^3) tuvo al menos $5,6 \times 10^{10}$ linfocitos $V\beta 7$ circulantes, mientras que fue infundido con $9,5 \times 10^{10}$ TIL $V\beta 7$. Incluso sin representar células adicionales en tejidos linfoides o infiltrar en tejidos sólidos, el predominio de solo un único clon en la sangre periférica de estos dos pacientes durante sus episodios linfocíticos fue sorprendente.

60 **[0034]** Los clones reactivos con MART-1 predominaron a los PBL CD8+ de estos dos pacientes durante más de cuatro meses. Se resolvió la linfocitosis y los números de leucocitos volvieron a los niveles homeostáticos durante el transcurso de varias semanas. Como se mide por anticuerpos para $V\beta 12$ y por análisis de FACS de tetrámeros A2/MART-1, el clon reactivo con MART-1 en el paciente con un ALC de 21.000 células/ mm^3 siguió estando por
 65 encima del 60 % de los linfocitos CD8+ durante más de 123 días. El paciente con un ALC de 16.000 células/ mm^3

retuvo el linfocito T de V β 7 reactivo con MART-1 a más del 75 % de las células CD8+ durante más de 159 días desde la fecha de la transferencia.

[0035] El estado funcional de las células reactivas con MART-1 se probó después de la transferencia comparando la actividad lítica de PBL durante el pico de linfocitosis con PBL antes de la infusión y con los TIL infundidos por ensayo de linfólisis mediada por células. Se observaron altos niveles de lisis específica de dianas pulsadas con el péptido MART-1:27-35 y líneas de células tumorales HLA-A2+ que expresan MART-1 en los TIL infundidos y los PBL después de la infusión. Extensiones sanguíneas de PBL de ambos pacientes demostraron que los linfocitos circulantes presentaron una morfología atípica, blástica y altamente activa, de acuerdo con su función lítica *ex vivo* directa. Adicionalmente, los PBL de ambos pacientes secretaron pocas o ninguna citocina inflamatoria cuando se estimularon por líneas de células tumorales; sin embargo, la activación durante la noche de PBL después de la transferencia en IL-2 restauró la secreción específica de citocinas inflamatorias, que incluyen IFN- γ , GM-CSF y TNF- α . Estos resultados sugieren que las células persistentes pueden estar en un estado de activación intermedio, y que señales de activación apropiadas en el sitio tumoral *in situ* podrían inducir la secreción de citocinas proinflamatorias específicas de antígeno, además de la actividad lítica de los clones de linfocitos T persistentes.

[0036] Se investigó la capacidad de células transferidas para circular a depósitos tumorales por el análisis de especímenes tumorales de los dos pacientes obtenidos por biopsia por escisión antes del tratamiento y múltiples veces después del tratamiento. Después del tratamiento, los especímenes de biopsia contuvieron grandes áreas de tumor necrótico, y áreas de infiltrados linfocíticos difusos densos. La tinción inmunohistoquímica reveló que los infiltrados linfocíticos consistieron predominantemente en células CD8+. Los linfocitos T infiltrantes del paciente con un ALC de 21.000 células/mm³ fueron predominantemente V β 12, pero no V β 7, mientras que los linfocitos T que infiltran el tejido tumoral del paciente con un ALC de 16.000 células/mm³ fueron predominantemente V β 7, pero no V β 12. El ARN de los especímenes de biopsia del paciente con un ALC de 21.000 células/mm³ obtenidos 20 días después de la transferencia de células se analizó por RT-PCR usando el panel de cebadores específicos de V β y V β 12 fue un producto predominante en dos especímenes de tumor independientes (V β 14 no fue evidente en ninguna muestra). El análisis de secuencias de la región V-D-J de V β 12 de tejido tumoral reveló que la secuencia de la cadena β era idéntica a la secuencia derivada de V β 12 de los TIL, los PBL después del tratamiento, y el clon específico de MART-1. Tanto los antígenos de clase I del MHC como de clase II del MHC se expresaron altamente en depósitos tumorales después de la terapia, pero se expresaron solo a bajos niveles o en absoluto en tumores antes del tratamiento con TIL. La expresión del antígeno de clase I y de clase II del MHC en células tumorales es indicativa de una reacción inmunitaria inflamatoria en curso, y se sabe que IFN- γ induce la expresión de estos antígenos (Boehm et al., Ann. Rev. Immunol. 15: 749 (1997)). Tomados conjuntamente, estos resultados están de acuerdo con la circulación al tumor de los TIL V β 12 expandidos *in vivo* (paciente con ALC de 21.000 células/mm³) o V β 7 (paciente con ALC de 16.000 células/mm³), reconocimiento del antígeno de MART-1 de las células tumorales, secreción de IFN- γ y otras citocinas por los linfocitos activados, y establecimiento de una respuesta inmunitaria antitumoral inflamatoria en los nódulos del tumor.

[0037] Ambos pacientes presentaron regresión significativa del melanoma metastásico y la aparición de auto-inmunidad anti-melanocitos. Un paciente (ALC de 21.000 células/mm³) presentó la regresión de más del 95 % de su melanoma cutáneo y subcutáneo, y desarrolló vitiligo en sus antebrazos. Su melanoma metastásico no ha mostrado signo de reaparición ocho meses después del tratamiento. Cuatro meses después de la infusión de células, desarrolló una enfermedad linfo-proliferativa relacionada con el VEB (era sero-negativo para el VEB antes del tratamiento) que ha sido informada en pacientes sero-negativos para el VEB que reciben trasplantes alogénos (O'Reilly et al., Important Adv. Oncol. 149 (1996)) y está recibiendo tratamiento para este problema. El otro paciente (ALC de 16.000 células/mm³) presentó el 99 % de desaparición de su melanoma nodal, cutáneo y subcutáneo. Catorce días después de la infusión de células, durante la regresión activa del melanoma, desarrolló uveítis anterior aguda bilateral caracterizada por una membrana pupilar fibrinosa. Esta manifestación autoinmunitaria no ha sido detectada en más de 600 pacientes que se trataron con IL-2 de dosis alta, que incluye muchos que presentaron respuesta clínica objetiva al tratamiento (Rosenberg et al., Ann. Surg. 228: 307 (1998)). Ha respondido a colirios esteroideos para suprimir la inflamación, y sigue sano con visión normal y sin signos de melanoma recurrente durante siete meses después del tratamiento. Aunque los recuentos de linfocitos absolutos disminuyeron a niveles normales después de 3-4 semanas en ambos pacientes, la composición del conjunto de linfocitos resultante siguió estando altamente distorsionada.

Ejemplo 3

[0038] Este ejemplo describe el efecto de la supresión de linfocitos previa sobre la persistencia y la función de células adoptivamente transferidas.

[0039] Dos pacientes positivos para HLA-A2 con melanoma metastásico recibieron quimioterapia inmunosupresora con ciclofosfamida (60 mg/kg) durante dos días seguido de fludarabina (25 mg/m²) durante cinco días. El día siguiente a la dosis final de fludarabina, cuando los linfocitos y neutrófilos circulantes habían disminuido a menos de 20/mm³, cultivos de linfocitos T (derivados de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidos por cultivo *in vitro* de múltiples matraces, conteniendo cada uno 6 x 10⁷ células viables de una linfóferesis

enriquecida en Ficoll-hypaque con péptido MART-1:26-35(27L) 0,3 μ M o péptido gp100:209-217(210M) 0,3 μ M en 100 ml de medio que contenía 300 UI/ml de IL-2 y mantenidos a 5×10^5 - 2×10^6 células/ml durante 11 días; seguido de un ciclo de expansión rápida mediada por péptido, usando CMSP autólogas irradiadas pulsadas con 1,0 μ M de péptido MART-1:26-35(27L) o 1,0 μ M de péptido gp100:209-217(210M) e IL-2) inducidos *in vitro*, autólogos, reactivos con tumor (liberación de IFN- γ superior a 100 pg/ml y al menos dos veces superior al control cuando se estimulan con un melanoma del mismo HLA-A2 o una línea de células de melanoma autólogas) se recogieron y se reunieron para la infusión intravenosa del paciente (el paciente 1 recibió $1,2 \times 10^{10}$ células; el paciente 2 recibió $4,3 \times 10^{10}$ células) durante aproximadamente 30-60 min y terapia de IL-2 de dosis alta (720.000 UI/kg por infusión intravenosa en bolo cada ocho horas hasta la tolerancia). Ambos pacientes tuvieron enfermedad progresiva resistente a las terapias convencionales, que incluyen IL-2 de dosis alta, y quimioterapia agresiva.

[0040] Un paciente presentó una respuesta mixta que incluye una respuesta parcial de su enfermedad pulmonar, con una disminución en cientos de depósitos metastásicos del pulmón igual o superior al 50 % en la suma de los productos de diámetros perpendiculares de todas las lesiones medidas sin el crecimiento de ninguna lesión o la aparición de cualquier lesión nueva. El otro paciente presentó una enfermedad estable que está en curso con una disminución de menos del 50 % en el área de todas sus lesiones subcutáneas. Un paciente también demostró vitiligo, o destrucción autoinmunitaria de melanocitos de la piel. Ningún paciente presentó ninguna reacción adversa inesperada atribuible al tratamiento. Ambos pacientes demostraron la persistencia en la sangre periférica de altos niveles de linfocitos T específicos de antígeno después del tratamiento, como se mide por análisis de FACS de tetrámeros de A2/gp100 o A2/MART-1, de acuerdo con la repoblación inmunitaria satisfactoria con antígeno de linfocitos T reactivos con tumor.

[0041] Debe interpretarse que el uso de los términos “un”, “una”, “el” y “la” y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” van a interpretarse como términos de extremos abiertos (es decir, que significan “que incluye, pero no se limitan a,”) a menos que se indique lo contrario. La recitación de intervalos de valores en el presente documento prevé simplemente servir de un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora dentro de la memoria descriptiva como si se citara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o el lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en el presente documento, está previsto simplemente para iluminar mejor la invención y no plantea una limitación al alcance de la invención, a menos que se reivindique de otro modo. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

[0042] Realizaciones preferidas de la presente invención se describen en el presente documento, que incluyen el mejor modo conocido para los inventores para llevar a cabo la invención. Variaciones de aquellas realizaciones preferidas pueden llegar a ser evidentes para aquellos expertos habituales en la materia tras la lectura de la anterior descripción. Los inventores esperan que los expertos en la materia empleen tales variaciones según convenga, y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de otro modo distinto al específicamente descrito en el presente documento.

45

REIVINDICACIONES

1. Uso de

- 5 (a) un agente quimioterápico no mieloablativo supresor de linfocitos, y
 (b1) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un
 antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, y expandidos *in vitro* solo una vez, y
 (b2) un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T
 10 autólogos, en la preparación de un medicamento para promover la regresión de un cáncer en un mamífero, en el
 que (b1) y (b2) se administran posteriormente a la administración de (a), y en el que (b2) se administra
 concomitantemente con (b1) o posteriormente a (b1), por la misma vía o una vía diferente.

2. Uso de

- 15 (a) un agente quimioterápico no mieloablativo supresor de linfocitos y,
 (b) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un
 antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, modificados para expresar un factor de crecimiento de
 linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T autólogos, y expandidos *in vitro* solo
 una vez,
 20 en la preparación de un medicamento para promover la regresión de un cáncer en un mamífero, en el que (b) se
 administra posteriormente a la administración de (a).

3. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el factor de crecimiento de linfocitos T es interleucina-2 (IL-2),
 25 interleucina-7 (IL-7), interleucina-15 (IL-15), o una combinación de dos o todas las anteriores.

4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que (a) comprende ciclofosfamida y fludarabina, y en el
 que preferentemente van a administrarse aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida durante dos días después
 de lo cual se administran aproximadamente 25 mg/m² de fludarabina durante cinco días.
 30

5. El uso de la reivindicación 4, en el que la ciclofosfamida y la fludarabina se administran por vía intravenosa.

6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 ó 5, en el que se administra una dosis de aproximadamente
 720.000 UI/kg de IL-2 tres veces al día hasta tolerancia, preferentemente como una inyección en bolo, por el cual se
 35 administran preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 dosis de IL-2 y más preferentemente
 aproximadamente 9 dosis de IL-2.

7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que se administran de aproximadamente $2,3 \times 10^{10}$
 linfocitos T a aproximadamente $13,7 \times 10^{10}$ linfocitos T, preferentemente aproximadamente $7,8 \times 10^{10}$ linfocitos T,
 40 preferentemente como una infusión intravenosa, y en el que la infusión intravenosa dura preferentemente
 aproximadamente 30-60 min.

8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el cáncer es un melanoma.

- 45 9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que los linfocitos T se unen al antígeno de melanoma
 reconocido por linfocitos T-1 (MART-1).

10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el cáncer es metastásico.

- 50 11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el mamífero es un ser humano.

12. Uso de

- (a) ciclofosfamida y fludarabina, y
 55 (b1) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por MART-1
 y expandidos *in vitro* solo una vez, y
 (b2) IL-2 en la preparación de un medicamento para promover la regresión de melanoma metastásico en un ser
 humano, en el que se administran aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida por vía intravenosa durante dos
 días seguido de administración intravenosa de aproximadamente 25 mg/m² de fludarabina durante cinco días, y
 60

- en el que se administran aproximadamente $2,3 \times 10^{10}$ - $13,7 \times 10^{10}$ linfocitos T autólogos como una infusión, y
 en el que se administra un bolo de aproximadamente 720.000 UI/kg de IL-2 tres veces al día hasta tolerancia, en
 donde el bolo se administra concomitantemente con los linfocitos T autólogos o posteriormente a los linfocitos T
 autólogos, y
 65 en el que (b1) y (b2) se administran por vía intravenosa posterior a la administración de (a).

13. Uso de

- (a) ciclofosfamida y fludarabina, y
 5 (b) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por MART-1, modificados para expresar IL-2, y expandidos *in vitro* solo una vez, en la preparación de un medicamento para promover la regresión de un melanoma metastásico en un ser humano,
- en el que se administran aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida por vía intravenosa durante dos días seguido
 10 de administración intravenosa de aproximadamente 25 mg/m² de fludarabina durante cinco días, y en el que se administran aproximadamente 2,3 x 10¹⁰ - 13,7 x 10¹⁰ linfocitos T autólogos como una infusión, y en el que (b) es para administración intravenosa posterior a la administración de (a).
14. El uso de la reivindicación 12 ó 13, en el que se administran aproximadamente 7,8 x 10¹⁰ linfocitos T.
 15
15. El uso de la reivindicación 12 ó 14, en el que se administran de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 dosis de IL-2, preferentemente aproximadamente 9 dosis de IL-2.
16. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en el que la infusión intravenosa dura aproximadamente
 20 30-60 min.
17. (a) Un agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, y
 (b1) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un
 antígeno del cáncer, cuya regresión se promueve, por estimulación de los linfocitos T *in vitro* con el antígeno del
 25 cáncer, y expandidos *in vitro* solo una vez por estimulación adicional con el antígeno del cáncer, y
 (b2) un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la activación de los linfocitos T
 autólogos, para su uso en promover la regresión de un cáncer en un mamífero, en el que (b1) y (b2) se administran
 posteriormente a la administración de (a), y en el que (b2) se administra concomitantemente con (b1) o
 posteriormente a (b1), por la misma vía o una vía diferente.
 30
18. (a) Un agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, y
 (b) linfocitos T autólogos, que han sido previamente aislados, seleccionados por la elevada avidéz por un
 antígeno del cáncer, cuya regresión va a promoverse, por estimulación de los linfocitos T *in vitro* con el antígeno del
 cáncer, modificados para expresar un factor de crecimiento de linfocitos T que promueve el crecimiento y la
 35 activación de los linfocitos T autólogos, y expandidos *in vitro* solo una vez por estimulación adicional con el antígeno
 del cáncer,
 para su uso en promover la regresión de un cáncer en un mamífero, en el que (b) se administra
 posteriormente a la administración de (a).
- 40 19. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor
 de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos
 T autólogos de la reivindicación 17 ó 18 para el uso según la reivindicación 17 ó 18, en el que el factor de
 crecimiento de linfocitos T es IL-2, IL-7, IL-15, o una combinación de dos o todas de las anteriores.
- 45 20. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor
 de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos
 T autólogos de cualquiera de las reivindicaciones 17-19 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 17-19,
 en el que (a) comprende ciclofosfamida y fludarabina, y en el que preferentemente se administran aproximadamente
 60 mg/kg de ciclofosfamida durante dos días después de lo cual se administran aproximadamente 25 mg/m² de
 50 fludarabina durante cinco días.
21. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor
 de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos
 T autólogos de la reivindicación 20 para el uso según la reivindicación 20, en el que la ciclofosfamida y la fludarabina
 55 se administran por vía intravenosa.
22. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor
 de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos
 T autólogos de una cualquiera de las reivindicaciones 17, 19, 20 y 21 para el uso según cualquiera de las
 60 reivindicaciones 17, 19, 20 y 21, en el que se administra una dosis de aproximadamente 720.000 UI/kg de IL-2 tres
 veces al día hasta la tolerancia, preferentemente como una inyección intravenosa en bolo, a través del cual
 preferentemente se administran de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 dosis de IL-2, y más
 preferentemente se administran aproximadamente 9 dosis de IL-2.
- 65 23. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor

de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos de cualquiera de las reivindicaciones 17-22 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 17-22, en el que se administran de aproximadamente $1,2 \times 10^{10}$ linfocitos T a aproximadamente $4,3 \times 10^{10}$ linfocitos T, preferentemente los linfocitos T se administran como una infusión intravenosa, y preferentemente la infusión intravenosa dura aproximadamente 30-60 min.

24. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos de una cualquiera de las reivindicaciones 17-23 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 17-23, en el que el cáncer es melanoma.

25. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos de la reivindicación 24 para el uso según la reivindicación 24, en el que los linfocitos T se unen a MART-1.

26. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos de una cualquiera de las reivindicaciones 17-25 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 17-25, en el que el cáncer es metastásico.

27. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos de cualquiera de las reivindicaciones 17-26 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 17-26, en el que el mamífero es un ser humano.

28. El (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos, (b1) linfocitos T autólogos, y (b2) factor de crecimiento de linfocitos T o el (a) agente quimioterapéutico no mieloablativo supresor de linfocitos y (b) linfocitos T autólogos de cualquiera de las reivindicaciones 17-27 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 17-27, en el que el antígeno del cáncer consiste en los aminoácidos 26-35 de MART-1, en el que el aminoácido 27 se ha sustituido por leucina, y/o el antígeno del cáncer consiste en los aminoácidos 209-217 de gp100, en el que el aminoácido 210 se ha sustituido por metionina.