



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019028024-3 A2



(22) Data do Depósito: 02/07/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 07/07/2020

(54) **Título:** MÉTODO PARA CONTROLAR O NÍVEL DE UMA SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEOS, RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO, PROTEÍNA DE FUSÃO, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODO PARA ENGENHEIRAR UMA CÉLULA IMUNOMODULATÓRIA.

(51) **Int. Cl.:** C07K 14/725.

(30) **Prioridade Unionista:** 03/07/2017 GB 1710620.4.

(71) **Depositante(es):** GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED.

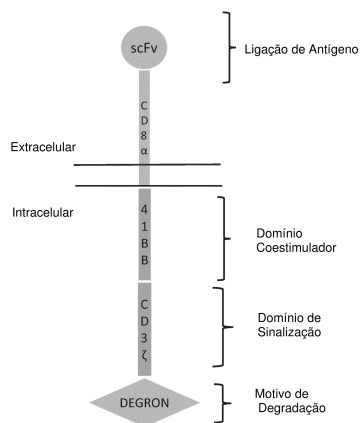
(72) **Inventor(es):** LEWIS LEE BRAYSHAW; MICHAEL MENTEITH HANN; CHRISTOPHER HERRING; CARLOS MARTINEZ FLEITES; MARKUS ALEXANDER QUEISSER.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2018067741 de 02/07/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/007869 de 10/01/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 27/12/2019

(57) **Resumo:** A invenção se refere a um método para controlar o nível de uma sequência de polipeptídeos compreendendo administrar uma sequência de polipeptídeos fundida a uma proteína de alvejamento de ubiquitina que compreende um motivo estrutural mínimo de degron. Em particular, a sequência de polipeptídeos compreende um receptor de antígeno quimérico portanto a presente invenção é útil nos métodos de terapia de célula e gene onde a atividade do receptor de antígeno quimérico precisa ser controlada.



MÉTODO PARA CONTROLAR O NÍVEL DE UMA SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEOS, RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO, PROTEÍNA DE FUSÃO, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODO PARA ENGENHEIRAR UMA CÉLULA IMUNOMODULATÓRIA
CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A invenção se refere a métodos para controlar o nível e/ou atividade de uma proteína heteróloga que foi introduzida dentro de uma célula hospedeira.

FUNDAMENTOS PARA A INVENÇÃO

[002] A degradação alvejada de proteínas foi anteriormente obtida através de estratégias explorando o sistema de proteassoma da ubiquitina (UPS). Em particular, as moléculas Quiméricas Alvejando Proteólise (PROTACs) foram descritas na técnica que são compostos heterobifuncionais compostos de um ligando de ligação de proteína alvo e um ligando da E3 ubiquitina ligase que induz a degradação mediada por proteassoma da proteína alvo por intermédio de seu recrutamento de E3 ubiquitina ligase e ubiquitinação subsequente. Tais compostos são capazes de induzir a inativação de uma proteína alvo na adição às células ou administração a um animal ou ser humano e, portanto, foram propostos para o tratamento de doença pela remoção de proteínas alvos patogênica ou oncogênica.

[003] Os receptores antigênicos quiméricos (CARs) são receptores de célula T artificiais que estão na vanguarda das terapias modernas personalizadas (Lee *et al.* (2012) *Clin. Cancer Res.*, 18(10): 2780-90). Eles estão sendo desenvolvidos para tratar cânceres em pacientes que sejam resistentes às terapias convencionalmente disponíveis e usam uma das células imunes do próprio paciente para combater a doença. As células imunes são geneticamente engenheiradas *ex vivo* para expressar um CAR (CAR-células T) específico para um antígeno de tumor e as células são subsequentemente

transferidas de volta para o paciente. CARs residem nas superfícies de células T e consistem de domínios intracelulares e extracelulares que são separados por um domínio de transmembrana. O domínio extracelular abriga uma região de ligação alvo (por exemplo um fragmento variável de cadeia única) que é direcionado para um antígeno unicamente expresso nas células doentes. O domínio intracelular (usualmente CD3ζ-CD28 ou CD3ζ-41BB) volta-se para o citossol e transmite um sinal de ativação para a célula T depois o antígeno é ligado à região de ligação alvo na superfície da célula. A sinalização ativa de CAR-células T leva adicionalmente à matança das células doentes.

[004] O desenvolvimento de CARs compreendeu três gerações até agora. Os CARs da primeira geração compreenderam domínios de ligação alvo acoplados a um domínio de sinalização derivado da região citoplásmica do CD3zeta ou das cadeias gama do receptor de Fc. Os CARs da primeira geração foram mostrados realvejar com êxito a matança de célula T para o alvo selecionado, entretanto, eles falharam em prover expansão e atividade antitumor *in vivo* prolongada. Os CARs da segunda e terceira gerações têm focalizado no realce da sobrevivência e proliferação aumentada da célula T modificada pela inclusão dos domínios de sinalização adicionais das moléculas coestimulatórias, tais como CD28, OX-40 (CD134) e 4-1BB (CD137).

[005] Entretanto, um problema de segurança desta terapia promissora tem surgido através da reatividade cruzada potencial para órgãos vitais tais como o pulmão. De fato, durante os testes clínicos, as toxicidades fora do tumor tanto no alvo assim como fora do alvo foram observadas em pacientes tratados com CAR-células T e fatalidades foram relatadas com os estudos de CAR (Morgan *et al.* (2010) *Mol. Ther.*, 18(4): 843-51). Estas toxicidades são difíceis de prever nos modelos de animal ou não primata e ao contrário das moléculas pequenas e produtos biológicos, os CAR-células T são fármacos vivos que têm perfis farmacocinéticos (PK) únicos e efeitos

farmacodinâmicos. Portanto, mudanças na segurança estão sendo desenvolvidos para desligar ou suavizar a matança por CAR-célula T e permitir terapias mais controladas e seguras.

[006] As mudanças suicidas são um exemplo de uma mudança segura onde os CAR-células T são adicionalmente engenheiradas para expressar “genes suicidas” ou “genes de eliminação” que permitem a destruição seletiva de CAR-células T na administração de um agente externo. Por exemplo, incorporando a timidina cinase do vírus simples do herpes (HSV-TK) significa que a administração do profármaco ganciclovir resulta na morte de célula pela incorporação de GCV-trifosfato no DNA replicante. Entretanto, os elementos envolvidos nesta mudança são imunogênicos e há evidências emergentes de que as respostas imunes contra HSV-TK limitam a persistência de células transduzidas Berger *et al.*, (2006) Blood Mar 15: 107(6): 2294-302).

[007] A WO2017024318 descreve composições e métodos para regular as terapias com receptor de antígeno quimérico e célula efetora imune acoplando-se um dTAG que liga um composto heterobifuncional que, por sua vez, leva à ubiquitinação.

[008] Para que as terapias celulares se tornem mais amplamente adotadas, existe ainda uma necessidade na técnica para desenvolver métodos para controlar estas terapias para garantir que quaisquer eventos adversos possam ser prevenidos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[009] De acordo com um primeiro aspecto da invenção é provido um método para controlar o nível de uma sequência de polipeptídeos compreendendo:

a) administrar uma proteína de fusão compreendendo a dita sequência de polipeptídeos e uma proteína de alvejamento de ubiquitina consistindo em menos do que 135 aminoácidos no comprimento que

compreende o motivo de grampo de cabelo de um sítio de ligação de cereblon, e

b) controlar o nível da sequência de polipeptídeos pela administração de um composto que medeia a ligação da proteína de alvejamento de ubiquitina e cereblon.

[0010] Em um outro aspecto da invenção é provido um método para controlar o nível de uma sequência de polipeptídeos compreendendo:

a) administrar uma proteína de fusão compreendendo:

A – B

em que A é uma sequência de polipeptídeos; e

em que B é uma proteína de alvejamento de ubiquitina consistindo em menos do que 135 aminoácidos no comprimento compreendendo um motivo estrutural que quando alinhado tem um conjunto de coordenadas estruturais dentro de cerca de 6,0 Å do rmsd dos átomos da espinha dorsal entre cada um dos resíduos de aminoácido como listado na Tabela 1 e em que o motivo estrutural compreende um resíduo de glicina na posição que corresponde a GLY56 da Tabela 1; e

b) controlar o nível da sequência de polipeptídeos pela administração de um composto que medeia a ligação de a) a proteína de alvejamento de ubiquitina e b) uma ubiquitina ligase em uma maneira que leva a sequência de polipeptídeos em proximidade da ubiquitina ligase, em que a sequência de polipeptídeos, na presença do composto é capaz de ser ubiquitinada.

[0011] De acordo com um outro aspecto da invenção é provido um receptor de antígeno quimérico (CAR) compreendendo:

um domínio de ligação do ligando extracelular;

um domínio de transmembrana;

um domínio de sinalização intracelular; e,

uma proteína de alvejamento de ubiquitina como aqui descrita,

que é capaz de ser ligada pela ubiquitina ligase na presença de um composto.

[0012] De acordo com um outro aspecto da invenção é provida uma proteína de fusão compreendendo uma sequência de polipeptídeos consistindo em menos do que 135 aminoácidos no comprimento, que compreende o motivo de grampo de cabelo de um sítio de ligação de cereblon.

[0013] Em um outro aspecto da invenção é provida uma proteína de fusão compreendendo

A – B

em que A é uma sequência de polipeptídeos; e

em que B é uma proteína de alvejamento de ubiquitina que consiste de uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 6 a 14.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0014] **FIGURA 1.** Organização esquemática de receptor de construto de antígeno quimérico que incorpora um elemento de degron

[0015] **FIGURA 2.** Mapa plasmídico codificando GFP fundido ao sinal de degron derivado da proteína Ikaros 1 humana (Uniprot Q13422).

[0016] **FIGURA 3.** efeito do tratamento com lenalidomida sobre os níveis de expressão de Proteína Fluorescente Verde (GFP) fundida com degrons em células T HEK293. (A) Tabela com os valores de intensidade de fluorescência média de células positivas em GFP tratados com quantidade crescente de lenalidomida. As construções incluídas na figura diferem apenas no comprimento da (Glicina-Serina) x ligador N entre GFP e a sequência de degron, com CONSTRUTO 1 N = 1, CONSTRUTO 2 N = 3 e CONSTRUTO 3 N = 5. (B) Valores de intensidade de fluorescência média (MFI) em relação aos valores não tratados (nenhuma lenalidomida).

[0017] **FIGURA 4.** Mapa plasmídico codificando o construto de receptor de antígeno quimérico (CAR) usado como um controle para a degradação de CAR induzida pela lenalidomida. ZsGreen usado como um

repórter para transfecção/transdução.

[0018] **FIGURA 5.** Efeito de tratamento com lenalidomida sobre os níveis de expressão de CARs anti-BCMA fundidos com degrons em células Jurkat. (A) Intensidade de fluorescência média dos construtos de CAR anti-BCMA em células Jurkat transfectadas (positivas em ZsGreen) depois do tratamento com DMSO ou 10 μ M de lenalidomida. O CONSTRUTO 4 representa um CAR sem um sinal de degron enquanto o CONSTRUTO 5 contém estes mesmos elementos do CONSTRUTO 4 mais as sequências derivadas da proteína Ikaros 3 humana (Uniprot Q9UKT9). (B) Histogramas de citometria de fluxo das células Jurkat em (A), mostrando o efeito de DMSO e 10 μ M de lenalidomida sobre a expressão de CAR anti-BCMA.

[0019] **FIGURA 6.** Efeito do tratamento com lenalidomida sobre os níveis de expressão de CARs anti-BCMA fundido com degrons nas células T primárias. (A) Intensidade de fluorescência média de CAR anti-BCMA em células T transduzidas (positivas em ZsGreen) depois do tratamento com DMSO ou 10 μ M de lenalidomida. O CONSTRUTO 4 representa um CAR sem um sinal de degron enquanto o CONSTRUTO 5 contém estes mesmos elementos do CONSTRUTO 4 mais as sequências derivadas da proteína Ikaros 3 humana (Uniprot Q9UKT9). Os dados são representantes de três repetições biológicas. (B) Histogramas de citometria de fluxo das células T em (A), mostrando o efeito de DMSO e 10 μ M de lenalidomida sobre a expressão de CAR anti-BCMA.

[0020] **FIGURA 7.** Efeito do tratamento com lenalidomida sobre a liberação de citocina a partir das células T primárias expressando CARs anti-BCMA fundido com degrons. As células T primárias foram transduzidas com o CONSTRUTO 4 ou 5 e cocultivadas com Células ARH-77-10B5 expressando BCMA na presença de DMSO ou 10 μ M de lenalidomida. O CONSTRUTO 4 representa um CAR sem um sinal de degron enquanto que o CONSTRUTO 5 contém estes mesmos elementos do CONSTRUTO 4 mais

as sequências derivadas da proteína Ikaros 3 humana (Uniprot Q9UKT9). Os dados são representantes de três repetições biológicas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0021] É aqui descrito um motivo estrutural essencial requerido para a ubiquitinação eficaz de uma proteína alvo. Este pode ser usado para controlar o nível e/ou atividade de uma proteína heteróloga administrada a uma célula alvo, especialmente quando a proteína heteróloga é uma proteína terapêutica que precisa ser firmemente controlada de modo a evitar o risco de quaisquer efeitos adversos. Minimizar o tamanho do motivo requerido para a ubiquitinação eficaz tem vantagens, especialmente se a proteína heteróloga for introduzida por intermédio de um vetor viral onde o espaço é um prêmio.

DEFINIÇÕES

[0022] A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado como é habitualmente entendido por uma pessoa de habilidade na técnica (por exemplo, em cultura celular, genéticas moleculares, química do ácido nucléico, técnicas de hibridização e bioquímica). As técnicas padrão são usadas para os métodos moleculares, genéticos e bioquímicos (ver geralmente, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. e Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc. que são aqui incorporadas por referência em sua totalidade) e métodos químicos. Todas as patentes e publicações aqui aludidas são incorporadas por referência em sua totalidade.

[0023] O termo “compreendendo” abrange “incluindo” ou “consistindo em” por exemplo uma composição “compreendendo” X pode consistir exclusivamente de X ou pode incluir alguma coisa adicional por exemplo X + Y.

[0024] O termo “consistindo essencialmente em” limita o escopo dos

traços para os materiais ou etapas especificados e aqueles que não afetam materialmente a(s) característica(s) básica(s) do traço reivindicado.

[0025] O termo “consistindo em” exclui a presença de qualquer componente(s) adicional(is).

[0026] O termo “cerca de” como aqui usado quando referindo-se a um valor mensurável tal como uma quantidade, uma duração temporal e similares é intencionado a abranger variações de $\pm 20\%$ ou $\pm 10\%$, incluindo $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ e $\pm 0,1\%$ do valor especificado.

[0027] O termo “mudança de segurança” se refere a um mecanismo bioquímico que pode ser ativado sob demanda de modo a controlar um processo biológico que pode causar dano. Mudanças de segurança podem ser usadas com as terapias de CAR-T de modo que elas possam ser controladas externamente (isto é, por intermédio da administração do lado de fora da célula) de modo a realçar a segurança da terapia gênica.

[0028] O termo “receptores de antígeno quimérico” (“CARs”) como aqui usado, se refere a um receptor engenheirado que consiste de um domínio de ligação alvo extracelular (que é usualmente derivado de um anticorpo monoclonal ou fragmento do mesmo), opcionalmente uma região espaçadora, uma região de transmembrana e um ou mais domínios efetores intracelulares. CARs também foi aludido como receptores quiméricos de célula T ou imunorreceptores quiméricos (CIRs). CARs são geneticamente introduzidos dentro de células hematopoiéticas, tais como células T, para redirecionar a especificidade para um antígeno de superfície celular desejado. Mais recentemente CARs também foi introduzido nas células não imunes (Kojima *et al.*, 2018 Nature Chem. Bio. Jan; 14(1): 42-49).

[0029] Referências para a “sinalização de CAR” se refere à sinalização através do domínio de sinalização do CAR que resulta em ativação de célula imunomodulatória (por exemplo deflagração da matança da célula alvo e ativação de célula T).

[0030] O termo “receptor de célula T” (“TCR”) como aqui usado, se refere ao receptor presente na superfície de células T que reconhece fragmentos de antígeno como peptídeos ligados às moléculas do complexo da histocompatibilidade maior (MHC). TCRs nativos existem nas formas $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, que são estruturalmente similares, mas existem em locais diferentes e são considerados ter funções diferentes. A porção extracelular do TCR tem dois domínios constantes e dois domínios variáveis. Os domínios variáveis contêm alças polimórficas que formam o sítio de ligação do TCR e são análogos às regiões determinadoras de complementaridade (CDRs) nos anticorpos. No contexto de terapias de gene, o TCR é usualmente geneticamente modificado para mudar ou melhorar o seu reconhecimento de antígeno, portanto em uma modalidade, o TCR é geneticamente modificado. Por exemplo, a WO01/055366 e WO2006/000830, que são aqui incorporadas por referência, descrevem métodos com base em retrovírus para transfectar células T com TCRs heterólogos.

[0031] O termo “domínio de ligação alvo” como aqui usado é definido como um oligo- ou polipeptídeo que é capaz de ligação a um alvo específico, tal como um antígeno ou ligando. Em particular, o alvo pode ser uma molécula de superfície celular. Por exemplo, o domínio de ligação alvo pode ser escolhido para reconhecer um alvo que atua como um marcador de superfície celular nas células patogênicas, incluindo células patogênicas humanas, associadas com um estado de doença particular. O domínio de ligação alvo pode ser, por exemplo, qualquer tipo de proteína que se liga a um antígeno.

[0032] O termo “região espaçadora” como aqui usado, se refere a um oligo- ou polipeptídeo que funciona para ligar o domínio de transmembrana ao domínio de ligação alvo. Esta região também pode ser aludida como uma “região de dobradiça” ou “região de haste”. O tamanho do espaçador pode ser variado dependendo da posição do epítipo alvo de modo a manter uma

distância ótima para a ativação da sinapse imune (por exemplo 14 nm) na ligação CAR:alvo.

[0033] O termo “domínio” se refere a uma estrutura de proteína dobrada que retém a sua estrutura terciária independente do resto da proteína. Geralmente, os domínios são responsáveis pelas propriedades funcionais separadas de proteínas e em muitos casos podem ser adicionados, removidos ou transferidos para outras proteínas sem a perda de função do resto da proteína e/ou do domínio.

[0034] O termo “domínio de transmembrana” como aqui usado se refere a um domínio que atravessa a membrana celular.

[0035] O termo “domínio efetor intracelular” como aqui usado se refere ao domínio no CAR que é responsável pela sinalização intracelular seguindo a ligação do domínio de ligação alvo ao alvo. O domínio efetor intracelular é responsável pela ativação de pelo menos uma das funções efetoras normais da célula imune na qual o CAR é expresso. Por exemplo, a função efetora de uma célula T pode ser uma atividade citolítica ou atividade auxiliar incluindo a secreção de citocinas.

[0036] O termo “anticorpo” é aqui usado no sentido mais amplo para se referir às moléculas com um domínio semelhante à imunoglobulina (por exemplo IgG, IgM, IgA, IgD ou IgE) e inclui anticorpos monoclonais, recombinantes, policlonais, quiméricos, humanos, humanizados, multiespecíficos, incluindo anticorpos biespecíficos e anticorpos heteroconjugados; um domínio variável único (por exemplo, VH, VHH, VL, anticorpo de domínio (dAb)), fragmentos de anticorpo de ligação a antígeno, Fab, F(ab')₂, Fv, Fv ligado a dissulfeto, Fv de cadeia única, scFv ligado a dissulfeto, diacoros, TANDABS etc. e versões modificadas de qualquer um dos precedentes.

[0037] O termo “domínio variável único” se refere a um domínio de polipeptídeo dobrado compreendendo sequências características de domínios

variáveis de anticorpo. O mesmo portanto inclui domínios variáveis de anticorpo completos tais como VH, VHH e VL e domínios variáveis de anticorpo modificados, por exemplo, em que uma ou mais alças foram substituídas pelas sequências que não são características de domínios variáveis de anticorpo ou domínios variáveis de anticorpo que foram truncados ou compreendem extensões de terminal N ou C, assim como fragmentos dobrados de domínios variáveis que retêm pelo menos a atividade e especificidade da ligação do domínio de tamanho completo. Um domínio variável único é capaz de ligação a um antígeno ou epítipo independentemente de uma região ou domínio variáveis diferentes. Um “anticorpo de domínio” ou “dAb” pode ser considerado o mesmo como um “domínio variável único”. Um domínio variável único pode ser um domínio variável único humano, mas também inclui domínios variáveis únicos de outras espécies tais como dAbs de roedor (por exemplo, como divulgado na WO 00/29004), tubarão enfermeiro e Camelídeos VHH. Camelídeo VHH são polipeptídeos de domínio variável único da imunoglobulina que são derivados das espécies de camelídeo incluindo camelos bacterianos e dromedários, lhamas, vicunhas, alpacas e guanacos, que produzem anticorpos de cadeia pesada naturalmente destituídos de cadeias leves. Tais domínios VHH podem ser humanizados de acordo com técnicas padrão disponíveis na técnica e tais domínios são considerados ser “domínios variáveis únicos”. Como aqui usado VH inclui domínios VHH de camelídeo.

[0038] Para se evitar dúvidas, será entendido que os termos “polinucleotídeo”, “nucleotídeo” e “ácido nucléico” são aqui usados intercambiavelmente.

[0039] Para se evitar dúvidas, será entendido que os termos “polipeptídeo”, “oligopeptídeo” “peptídeo” e “aminoácido” são aqui usados intercambiavelmente.

[0040] Para se evitar dúvidas, será entendido que os termos “motivo

estrutural” e “motivo grampo de cabelo” são aqui usados intercambiavelmente.

[0041] Referências à “proteína de fusão” referem-se a uma proteína traduzida a partir de um gene de fusão, que é criado pelas partes de junção de dois genes/sequências de ácido nucléico diferentes. As sequências de polipeptídeo A e a proteína de alvejamento de ubiquitina B estão associados entre si, preferivelmente pela fusão genética (isto é a proteína de fusão é gerada pela tradução de um ácido nucléico em que um polinucleotídeo codificando toda ou uma porção de A é unida na armação com um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de B) ou conjugação química entre si.

[0042] Referências aos “fragmentos funcionais” se referem aos fragmentos das sequências completas, tipo selvagem que ainda retêm a função de ligação da proteína tipo selvagem a partir da qual elas são derivadas (por exemplo fragmentos funcionais da proteína de alvejamento de ubiquitina ainda capaz de ligação ao composto que medeia a interação com a ubiquitina ligase). Os fragmentos podem adequadamente compreender pelo menos 10 aminoácidos no comprimento, por exemplo 25, 50, 75, 80, 90, 100, 110, 120 ou 130 aminoácidos no comprimento. Os fragmentos também podem compreender uma truncagem de terminal C ou uma truncagem de terminal N.

[0043] Referências às “variantes funcionais” incluem variantes com sequências de aminoácidos ou nucleotídeos similares às sequências originais (por exemplo tipo selvagem), mas com uma ou mais mudanças de aminoácido ou nucleotídeo que resultam em uma variante que ainda retém a função da proteína original a partir da qual são derivadas. Por exemplo, uma variante funcional da proteína de alvejamento de ubiquitina aqui descrita incluem variantes que ainda facilitam ligação suficiente ao composto que permite a ubiquitinação da sequência de polipeptídeos por intermédio da ubiquitina ligase.

[0044] “Afinidade” é a força de ligação de uma molécula, por exemplo a proteína de ligação alvo, a uma outra, por exemplo o seu antígeno alvo, em um sítio único de ligação. A afinidade de ligação de uma proteína de ligação alvo ao seu alvo pode ser determinado pelos métodos de equilíbrio (por exemplo ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) ou radioimunoensaio (RIA)) ou cinéticas (por exemplo análise BIACORE).

[0045] Identidade de sequência como aqui usada é o grau de relacionabilidade entre duas ou mais sequências de aminoácido ou duas ou mais sequências de ácido nucléico, como determinado comparando-se as sequências. A comparação de sequências e a determinação de identidade de sequência podem ser realizadas usando um algoritmo matemático; aqueles versados na técnica estarão cientes de programas de computador disponíveis para alinhar duas sequências e determinar a identidade percentual entre elas. A pessoa versada avaliará que algoritmos diferentes podem produzir resultados de rendimento levemente diferentes.

[0046] Assim a “identidade percentual” entre uma sequência de ácido nucléico de consulta e uma sequência de ácido nucléico objeto é o valor “Identities”, expresso como uma porcentagem, que é calculada pelo algoritmo BLASTN quando uma sequência de ácido nucléico objeto tem 100% de cobertura de consulta com uma sequência de ácido nucléico de consulta depois que um alinhamento BLASTN aos pares é realizado. Tais alinhamentos BLASTN aos pares entre uma sequência de ácido nucléico de consulta e uma sequência de ácido nucléico objeto são realizadas usando-se os ajustes de default do algoritmo BLASTN disponível no website do National Center for Biotechnology Institute com o filtro para regiões de baixa complexidade desligado. Importaneamente, uma sequência de ácido nucléico de consulta pode ser descrita por uma sequência de ácido nucléico identificada em uma ou mais reivindicações aqui.

[0047] Similarmente, a “identidade percentual” entre uma sequência

de aminoácido de consulta e uma sequência de aminoácido objeto é o valor “Identities”, expresso como uma porcentagem, que é calculada pelo algoritmo BLASTP quando uma sequência de aminoácido objeto tem 100% de cobertura de consulta com uma sequência de aminoácido de consulta depois que um alinhamento BLASTP aos pares é realizada. Tais alinhamentos BLASTP aos pares entre uma sequência de aminoácido de consulta e uma sequência de aminoácido objeto são realizadas usando-se os ajustes de default do algoritmo BLASTP disponível no website do National Center for Biotechnology Institute com o filtro para regiões de baixa complexidade desligado. Importantemente, uma sequência de aminoácido de consulta pode ser descrita por uma sequência de aminoácido aqui identificada em uma ou mais reivindicações.

[0048] A sequência consulta pode ser 100% idêntica à sequência objeto ou a mesma pode incluir até um certo número inteiro de alterações de aminoácido ou nucleotídeo quando comparada com a sequência objeto tal que a % de identidade é menor do que 100%. Por exemplo, a sequência consulta é pelo menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99% idêntica à sequência objeto. Tais alterações incluem pelo menos uma deleção, substituição (incluindo substituição conservativa e não conservativa) ou inserção de aminoácido e em que as ditas alterações podem ocorrer nas posições de terminal amino ou carboxi da sequência consulta ou em qualquer lugar entre estas posições terminais, intercaladas individualmente entre os aminoácidos ou nucleotídeos na sequência consulta ou em um ou mais grupos contíguos dentro da sequência consulta.

[0049] O termo “proteína de alvejamento de ubiquitina” se refere à proteína/domínio/fragmento que seja capaz de induzir ubiquitinação da sequência de polipeptídeos pela ligação da ubiquitina ligase na presença de um composto.

[0050] O termo “ubiquitina ligase”, também conhecido como E3

ligase, se refere a uma família de proteínas que facilitam a transferência da ubiquitina sozinha ou em complexo a uma proteína de específica de substrato, portanto alvejando a proteína de substrato para degradação. Por exemplo, cereblon é parte de um complexo da E3 ubiquitina ligase Cul4A/B que em combinação com uma enzima de conjugação da E2 ubiquitina causa a fixação da ubiquitina para uma lisina em uma proteína alvo e subsequentemente alveja a proteína específica para degradação pela proteassoma. A ubiquitina ligase pode estar envolvida na poliubiquitinação tal que mais do que uma ubiquitina esteja fixada à proteína alvo. Por exemplo, uma segunda ubiquitina é fixada à primeira ubiquitina; uma terceira é fixada à segunda e assim por diante. A poliubiquitinação pode marcar proteínas para a degradação pelo proteassoma.

[0051] O termo “sítio de ubiquitinação” se refere ao resíduo de aminoácido, em particular um resíduo de lisina, ao qual a ubiquitina é fixada. De modo a fabricar uma cadeia, a própria ubiquitina contém um sítio de ubiquitinação. As lisinas diferentes na ubiquitina podem ser alvejadas por um E3 para fabricar cadeias, mas a lisina mais comum é a Lys48. Esta lisina-48 pode ser usada para fabricar poliubiquitina, que é depois reconhecida pelo proteassoma.

[0052] O termo “autólogo” como aqui usado, se refere às células do mesmo sujeito. O termo “alogênico” como aqui usado, se refere às células da mesma espécie que difere geneticamente da célula em comparação.

[0053] Os termos “indivíduo”, “sujeito” e “paciente” são aqui usados intercambiavelmente. Em uma modalidade, o sujeito é um mamífero, tal como um primata, por exemplo um sagui ou macaco ou um ser humano. Em uma modalidade adicional, o sujeito é um ser humano.

[0054] O termo “composição farmacêutica” se refere a uma composição formulada em soluções farmacêuticamente aceitáveis ou fisiologicamente aceitáveis para a administração a uma célula ou sujeito. As

composições da invenção também podem ser administradas em combinação com outros agentes, contanto que os agentes adicionais não afetem adversamente a capacidade da composição para entregar a terapia pretendida.

[0055] O termo “câncer” (algumas vezes também aludido como “neoplasia”) se refere a uma doença causada por uma divisão descontrolada de células anormais em uma parte do corpo. A divisão descontrolada pode frequentemente resultar em uma massa, habitualmente aludida como um “tumor” ou “neoplasma”.

[0056] O termo “antígeno associado a tumor” ou “antígeno de tumor” como aqui usado, se refere a um antígeno expresso em uma célula de tumor. Este antígeno pode ser unicamente ou diferencialmente expresso em uma célula de tumor quando comparada a uma célula normal, isto é não cancerosa.

[0057] A invenção aqui descrita também pode ser usada nos métodos de tratamento de um sujeito em necessidade dos mesmos. O tratamento pode ser terapêutico, profilático ou preventivo. O tratamento abrange alívio, redução ou prevenção de pelo menos um aspecto ou sintoma de uma doença e abrange prevenção ou cura das doenças aqui descritas.

MÉTODOS PARA CONTROLAR OS NÍVEIS DE PROTEÍNA

[0058] A conservação estrutural do sítio de ligação de cereblon foi observado para CK1 e GSTP1. Para Ikaros 1 e 3, a conservação estrutural foi deduzida pela homologia para as proteínas estruturalmente distinguidas tais como Eos (Ikaros 4, PDB 2MA7) ou a proteína dedo de zinco de PDB iD2I13). Os presentes inventores propuseram fundir este motivo estrutural conservado a uma proteína heteróloga de modo a prover um método para controlar o nível e/ou a atividade da dita proteína. Ao contrário dos métodos PROTAC correntes usados na técnica, o presente método envolve fundir uma proteína de alvejamento de ubiquitina (que também pode ser aludida como um domínio alvejador de ubiquitina) diretamente à proteína a ser controlada de modo que um composto externo possa simplesmente ser adicionado de

modo a induzir a ligação à ubiquitina ligase que resulta em ubiquitinação.

[0059] Além disso, usando-se o degron mínimo requerido, existem vantagens potenciais de produção. Por exemplo, os vetores são frequentemente limitados no tamanho, portanto é útil ter uma proteína de alvejamento de ubiquitina pequena para maximizar a quantidade de espaço disponível para codificar outras sequências de polipeptídeo.

[0060] Um degron mínimo também é menos provável interferir com a atividade da proteína heteróloga.

[0061] Portanto, de acordo com um primeiro aspecto da invenção é provido um método para controlar o nível de uma sequência de polipeptídeos compreendendo:

a) administrar uma proteína de fusão compreendendo a dita sequência de polipeptídeos e uma proteína de alvejamento de ubiquitina consistindo em menos do que 135 aminoácidos no comprimento que compreende o motivo de grampo de cabelo de um sítio de ligação de cereblon, e

b) controlar o nível da sequência de polipeptídeos pela administração de um composto que medeia a ligação da proteína de alvejamento de ubiquitina e cereblon.

[0062] Em um outro aspecto da invenção é provido um método para controlar o nível e/ou atividade de uma sequência de polipeptídeos compreendendo:

a) administrar uma proteína de fusão compreendendo:

A – B

em que A é uma sequência de polipeptídeos; e

em que B é uma proteína de alvejamento de ubiquitina consistindo em menos do que 135 aminoácidos no comprimento compreendendo um motivo estrutural que quando alinhado tem um conjunto de coordenadas estruturais dentro de cerca de 6,0 Å do desvio da raiz

quadrada média (rmsd) dos átomos da espinha dorsal entre cada um dos resíduos de aminoácido como listados na Tabela 1 e em que o motivo estrutural compreende um resíduo de glicina na posição que corresponde a GLY56 da Tabela 1; e

b) controlar o nível da sequência de polipeptídeos pela administração de um composto que medeie a ligação de a) a proteína de alvejamento de ubiquitina e b) uma ubiquitina ligase em uma maneira que leve a sequência de polipeptídeos em proximidade da ubiquitina ligase, em que a sequência de polipeptídeos, na presença do composto é capaz de ser ubiquitinada.

[0063] Sem estar ligado pela teoria, uma vez que a sequência de polipeptídeos tenha sido ubiquitinada a mesma pode ser degradada por um proteassoma ou fixação da ubiquitina (em particular uma cadeia da poliubiquitina) fazendo com que a sequência de polipeptídeos seja estericamente inibida. Assim, em uma modalidade, a sequência de polipeptídeos é capaz de ser ubiquitinada e depois degradada por um proteassoma. Em uma modalidade alternativa, a sequência de polipeptídeos é capaz de ser ubiquitinada e depois estericamente inibida.

[0064] A ubiquitina é uma proteína pequena (cerca de 8,5 kDa) que foi encontrada na maioria dos tecidos de organismos eucarióticos. A adição de ubiquitina a uma proteína de substrato é chamada de ubiquitinação ou ubiquitilação. A ubiquitinação pode afetar proteínas em muitos modos, incluindo a sinalização para a sua degradação por intermédio do proteassoma. A ubiquitina é covalentemente acoplada a uma lisina de substrato pela atividade de uma cascata enzimática E1 (enzima ativadora de ubiquitina), E2 (enzima conjugadora de ubiquitina) e E3 (ubiquitina ligase). Uma E3 ubiquitina RING ligase é uma proteína que recruta uma enzima de conjugação da ubiquitina E2 que foi carregada com ubiquitina, portanto as E3 ubiquitina RING ligases interagem tanto com a proteína alvo quanto com a enzima E2.

Um exemplo de uma E3 ubiquitina ligase é cereblon (CRBN) que interage com a proteína 1 de ligação de DNA danificada (DDB1), Cullin 4 (CUL4) e proteína RING-box 1 (RBX1) para formar o complexo CUL4-RBX1-DDB1-CRBN. Este complexo depois ubiquitina o substrato de proteína que é subsequentemente degradada pelos proteassomas.

[0065] O método da invenção permite que o nível (por exemplo os níveis intracelulares, extracelular ou de membrana) e/ou atividade de uma sequência de polipeptídeos sejam controlados fundindo-a ao domínio que permite ubiquitinação alvejada na introdução de um composto mediador. A adição do composto pode fazer com que o nível da sequência de polipeptídeos seja reduzido porque o composto induz a ubiquitinação do polipeptídeo pela ubiquitina ligase e levaria à degradação subsequente. A mudança no nível e/ou atividade pode ser medida usando métodos conhecidos na técnica.

[0066] Será entendido que referências à “ubiquitina ligase” como aqui usadas incluem ubiquitina ligases e/ou uma proteína que fosse parte do complexo da ligase por exemplo cereblon. Portanto, em uma modalidade, a ubiquitina ligase é cereblon.

[0067] Certos substratos de proteína foram mostrados interagir com E3 ubiquitina ligases através de fármacos imunomoduladores (por exemplo IMiDs), tais como talidomida. Estes substratos de proteína incluem Ikaros3, Ikaros1, GSTP1 e CK1 alfa. Recentemente, ZFP91 foi mostrado ser um substrato dependente de IMiD de cereblon (ver An *et al.* (2017) *Nat. Commun.* 8: 15398).

[0068] Um degron “mínimo” é aqui descrito, na forma de um domínio de proteína pequeno (em torno de 30 aminoácidos) que pode ser adicionado a uma proteína de interesse para degradação. Na presença de um composto de IMiD, a degradação será induzida. Entretanto, o degron não é definido pela sequência de peptídeo linear, mas ao invés o arranjo geométrico de três aceitadores ligados ao hidrogênio da espinha dorsal no ápice de uma curva

(posições i , $i+1$ e $i+2$), com um resíduo de glicina em uma posição chave ($i+3$). Este arranjo geométrico forma um motivo grampo de cabelo.

[0069] Quando os motivos de grampo de cabelo de três substratos de cereblon foram sobrepostos usando os átomos da cadeia principal, o rmsd global foi descoberto estar em torno de 2,0 Å. Em particular, a sobreposição estrutural mais próxima foi observada em torno de um resíduo central de glicina que foi conservado entre todos os três motivos. Os ângulos de Ramachandran foram medidos na entrada de PDB 2I13 como um representante estrutural de Ikaros3 ZFN (com identidade percentual de 50%) e descoberto ser como segue:

TABELA 1: Ângulos de Ramachandran de motivos de ligação de cereblon de grampo de cabelo

Ikaros3 (2I13)		
Resíduo	Psi (ψ)	Phi (ϕ)
LYS 51	151,5	-102,8
CYS 52	127,8	-83,5
PRO 53	-7,5	-66
GLU 54	-52,5	-111,7
CYS 55	-16,9	-105,2
GLY 56	-4,9	91,2
LYS 57	127,9	-60,6
SER 58	148,5	-97,5
PHE 59	155,5	-131,2
SER 60	-32,1	-73,3

[0070] Em uma modalidade, as coordenadas estruturais estão dentro de cerca de 5,0 Å, tal como cerca de 4,5 Å, do rmsd dos átomos da espinha dorsal entre cada um dos resíduos de aminoácido como listados na Tabela 1.

[0071] Referências aos “Ângulos de Ramachandran” e “rmsd” são bem conhecidos para uma pessoa versada na técnica. Os ângulos de Ramachandran são usados para descrever a conformação da cadeia principal peptídica. Dois ângulos de torção na cadeia polipeptídica, também chamados de ângulos de Ramachandran, descrevem as rotações da espinha dorsal do polipeptídeo em torno das ligações entre N-C α (chamadas de Phi, ϕ) e C α -C (chamadas de Psi, ψ), ver Ramachandran *et al.* (1963) *J. Mol. Biol.*, 7:95-99. Portanto, ϕ e ψ descrevem a rotação da cadeia polipeptídica em torno das

duas ligações em ambos os lados do átomo C α . Os ângulos podem ser plotados em uma plotagem de Ramachandran para prover um modo para visualizar a distribuição de ângulos de torção em uma estrutura de proteína.

[0072] Em bioinformática, o desvio da raiz quadrada média (rmsd) das posições atômicas é a medida da distância média entre os átomos (usualmente os átomos da espinha dorsal) de proteínas sobrepostas. Tipicamente, rmsd é usado como uma medida quantitativa de similaridade entre duas ou mais estruturas de proteína. Quanto mais baixo o rmsd, mais alta a similaridade entre duas estruturas.

[0073] A determinação de se um motivo estrutural falha dentro do rmsd de 5 Å do motivo mostrado na Tabela 1 seria bem conhecido por uma pessoa versada na técnica. Tal cálculo é realizado pela otimização da sobreposição das coordenadas de átomos de carbono alfa de um dado motivo estrutural e as coordenadas destes átomos no motivo estrutural contido na Tabela 1. Tal otimização produzirá o rmsd médio mínimo dos dois motivos estruturais. Na sobreposição aludida no escopo desta reivindicação, os átomos de carbono nos resíduos em ambos os lados da glicina central devem ser considerados equivalentes e seus valores rmsd são aqueles a serem incluídos no cálculo. Os programas de computador de modelagem de proteína adequados podem ser usados nestes cálculos e são conhecidos na técnica, por exemplo *Molecular Operating Environment (MOE)*, 2013,08; Chemical Computing Group ULC.

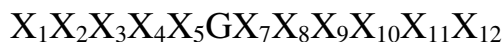
[0074] Em uma modalidade, a proteína de alvejamento de ubiquitina é derivada de uma proteína dedo de zinco.

[0075] Em uma modalidade, o motivo estrutural compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1:



em que X representa qualquer aminoácido ou é ausente. Em uma modalidade adicional, o motivo estrutural da SEQ ID NO: 1

adicionalmente compreende um, dois, três ou mais aminoácidos. Ainda em uma modalidade adicional, o motivo estrutural compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 15:



em que X representa qualquer aminoácido ou é ausente.

[0076] Em uma modalidade, um ou mais dos seguintes se aplicam:

X_1 representa valina (V), isoleucina (I) ou é ausente;

X_2 representa ácido aspártico (D), asparagina (N) ou é ausente;

X_3 representa lisina (K), isoleucina (I) ou é ausente;

X_4 representa glutamina (Q), lisina (K) ou treonina (T);

X_5 representa cisteína (C), serina (S) ou asparagina (N);

X_7 representa alanina (A) ou ácido glutâmico (E);

X_8 representa serina (S), lisina (K) ou ácido glutâmico (E);

X_9 representa fenilalanina (F), serina (S) ou valina (V);

X_{10} representa treonina (T), lisina (K) ou alanina (A);

X_{11} representa glutamina (Q), treonina (T) ou valina (V); e/ou

X_{12} representa lisina (K) ou arginina (R).

[0077] Em uma modalidade, o motivo estrutural é derivado de uma proteína de mamífero, tal como uma proteína humana.

[0078] Em uma modalidade, o motivo estrutural é derivado de Ikaros3, Ikaros1, Caseína Cinase 1 alfa (CK1 alfa), subunidade de ligação de GTP do fator de liberação de cadeia peptídica eucariótica ERF3A (GSTP1) ou Proteína dedo de zinco 91 (ZFP91). Em uma modalidade adicional, o motivo estrutural é obtido a partir do motivo 2 da Dedo de Zinco Nuclease de Ikaros3. Em uma modalidade alternativa, o motivo estrutural é obtido de CK1 alfa. A informação de sequência para estas proteínas está disponível na técnica, por exemplo ver UniProt ID números: Q9UKT9 para Ikaros3, P15170 para GSPT1, Q96JP5 para ZFP91 e P48729 para CK1 alfa. A informação estrutural para estas proteínas também está disponível na técnica, por exemplo

ver as entradas PDB: 2MA7 ou 2I13 que podem ser usadas como um representante estrutural para Ikaros3, 5HXB para GSTP1 e 5FQD para CK1 alfa.

[0079] Em uma modalidade, o motivo estrutural compreende uma sequência com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 97% de homologia/identidade a uma sequência selecionada do grupo consistindo da: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5. Em uma modalidade adicional, o motivo estrutural compreende uma sequência com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% ou 99% de identidade com uma sequência selecionada do grupo consistindo da: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4. Ainda em uma modalidade adicional, o motivo estrutural compreende uma sequência com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% ou 99% de identidade a uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2.

[0080] Em uma modalidade, o motivo estrutural compreende uma sequência selecionada da SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ou uma variante das mesmas. Por exemplo, a sequência variante pode ter até 5, 4, 3, 2 ou 1 substituição(ões), adição(ões) ou deleção(ões) de aminoácido. Tipicamente, a variação é uma substituição, particularmente uma substituição conservativa. A sequência variante pode substancialmente reter as características biológicas da proteína não modificada.

[0081] Em uma modalidade, o motivo estrutural compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo da: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5. Em uma modalidade adicional, o motivo estrutural compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo da: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4. Ainda em uma modalidade adicional, o motivo estrutural compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2.

[0082] Em uma modalidade, a proteína de alvejamento de ubiquitina é

uma sequência de polipeptídeos consistindo em menos do que 130 aminoácidos no comprimento, tal como menos do que 125, 120, 115, 110, 105, 100, 90, 80, 70, 60 ou 50 aminoácidos no comprimento. Em uma modalidade adicional, a proteína de alvejamento de ubiquitina é uma sequência de polipeptídeos consistindo em menos do que 100 aminoácidos no comprimento.

[0083] Em uma modalidade, a proteína de alvejamento de ubiquitina compreende uma isca de ubiquitinação, isto é uma sequência que compreende um resíduo de lisina que pode atuar como um sítio de ubiquitinação. Esta modalidade pode ser usada, por exemplo, quando a sequência de polipeptídeos por si só não contém um sítio adequada para ubiquitinação, portanto uma isca de ubiquitinação contendo um sítio de ubiquitinação pode ser incluída dentro da proteína de alvejamento de ubiquitina. Em uma modalidade, o sítio de ubiquitinação compreende um resíduo de lisina.

[0084] Em uma modalidade, a isca de ubiquitinação compreende uma sequência com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 97% de homologia/identidade com a SEQ ID NO: 16. Em uma modalidade, o sítio de ubiquitinação compreende a SEQ ID NO: 16 ou uma variante da mesma. Por exemplo, a variante de sequência pode ter até 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 substituição(ões), adição(ões) ou deleção(ões) de aminoácido. Tipicamente, a variação é uma substituição, particularmente uma substituição conservativa. A variante de sequência pode substancialmente retém as características biológicas da proteína não modificada.

[0085] Em uma modalidade, a proteína de alvejamento de ubiquitina consiste de uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 6 a 14 ou fragmentos funcionais ou variantes funcionais das mesmas.

[0086] Em uma modalidade, a proteína de alvejamento de ubiquitina consiste de uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 6 a 14, 27 ou fragmentos funcionais ou variantes funcionais das

mesmas.

[0087] Em uma modalidade, a proteína de alvejamento de ubiquitina consiste de uma sequência com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% ou 99% de identidade com uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 6 a 14. Em uma modalidade, a proteína de alvejamento de ubiquitina consiste de uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 6 a 14.

[0088] Em uma modalidade, o motivo estrutural é derivado de Ikaros3 e compreende as SEQ ID NOs: 6, 7, 8, 9 ou 10. Em uma modalidade alternativa, o motivo estrutural é derivado de GSTP1 e compreende as SEQ ID NOs: 11 ou 12. Em uma outra modalidade alternativa, o motivo estrutural é derivado de CK1 alfa e compreende as SEQ ID NOs: 13 ou 14.

[0089] Se os motivos estruturais de acordo com a invenção são isolados de substratos de cereblon dependente de ImiD maiores, eles podem conter resíduos de aminoácido que formam pedaços hidrofóbicos que podem induzir a agregação. Tais pedaços podem ser mutados de modo a atenuar qualquer agregação. Os aminoácidos que são considerados hidrofóbicos incluem: alanina (Ala), cisteína (Cys), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe), metionina (Met), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp). Se estes resíduos estiverem presentes no pedaço hidrofóbico eles seriam mutados para um outro tipo de resíduo de aminoácido, tal como um resíduo neutro ou hidrofílico, por exemplo serina (Ser), treonina (Thr), histidina (His), arginina (Arg), lisina (Lys), ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), asparagina (Asn), glicina (Gly) prolina (Pro) ou glutamina (Gln), de modo a minimizar a agregação.

[0090] Por exemplo, a estrutura de GSTP1 em complexo com cereblon e CC-885 (um composto modulador de cereblon) foi relatada por Matyskiela *et al.* ((2016) Nature 535(7611): 252-257) e depositada pelo PDB código 5HXB com dados para 3,6 Å de resolução. O domínio de terminal C

de GSTP1 (resíduos 388 a 499) pode ser isolado e usado como um degron visto que o mesmo contém o motivo de ligação de cereblon e um sítio de ubiquitinação. Portanto, em uma modalidade, o motivo estrutural pode compreender a SEQ ID NO: 11 (isto é, resíduos 388 a 499 de GSTP1).

[0091] A área exposta pela remoção do domínio de terminal N é de 385 \AA^2 e os resíduos envolvidos são:

TABELA 2: Resíduos expostos de GSTP1 na remoção do domínio de terminal N

Resíduo	Posição	Área Superficial no comprimento completo (\AA^2)	Área Superficial como domínio de terminal C (\AA^2)	Resíduos no Pedaco Hidrofóbico
HIS	388	53,3	91,1	
SER	389	30,1	47,9	
HIS	417	47,6	80,5	x
THR	418	21,1	75,4	
CYS	419	12	34,1	
ILE	420	75,3	76,3	
THR	462	44,7	62,5	
ILE	463	25,4	32,5	
CYS	464	9,8	62,7	
LEU	465	9,5	10,8	
GLU	466	10,4	31,3	
PHE	471	36,5	72,9	x
GLN	473	41,1	73,4	x
MET	474	16,2	67,3	x

onde os resíduos em negrito estão envolvidos em um pedaço hidrofóbico de 90 \AA^2 . Portanto, os resíduos His417, Phe471, Gln473 e/ou Met474 podem ser mutados para resíduos polares ou neutros, tal como serina, de modo a reduzir o pedaço hidrofóbico. Em uma modalidade, o motivo estrutural compreende uma variante da SEQ ID NO: 11 em que os resíduos His417, Phe471, Gln473 e/ou Met474 são mutados para um outro aminoácido, tal como um aminoácido neutro.

[0092] Em uma modalidade, o motivo estrutural pode compreender a SEQ ID NO: 12 (isto é, resíduos 388 a 499 de GSTP1 com mutações F471S e M474S). Nesta modalidade, Gly437 representa a glicina central chave e Lys493 atua como o sítio de ubiquitinação.

[0093] Em um outro exemplo, a estrutura de CK1 alfa em complexo com cereblon e lenalidomida foi relatada por Petzold *et al.* ((2016) *Nature*

532(7597): 127-130) e depositada pelo PDB código 5FQD com dados para 2,45 Å de resolução. Mais uma vez, a remoção dos domínios de terminal N e/ou terminal C exporá pedaços hidrofóbicos. Em particular, os resíduos Leu63, Leu67 e Ile73 estão envolvidos em um pedaço hidrofóbico, portanto estes seriam candidatos para mutações de modo a reduzir a área do pedaço hidrofóbico. Portanto, em uma modalidade, o motivo estrutural compreende uma variante da SEQ ID NO: 13 em que os resíduos Leu63, Leu67 e/ou Ile73 são mutados para um outro aminoácido, tal como um aminoácido neutro. Em uma modalidade adicional, o motivo estrutural pode compreender a SEQ ID NO: 14 (isto é, resíduos 8 a 94 de CK1 alfa com mutações L63H, L67Q e I73Q). Nesta modalidade, Gly40 representa a glicina central chave e Lys62 e Lys65 atuam como sítios de ubiquitinação.

[0094] Em uma modalidade, A é uma sequência de polipeptídeos que codifica uma proteína de mamífero. Em uma modalidade adicional, o mamífero é um ser humano ou um camundongo.

[0095] Em uma modalidade, A codifica uma sequência de polipeptídeos que não é naturalmente encontrada na célula (isto é uma proteína não nativa).

[0096] Em uma modalidade, A codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou um receptor de célula T (TCR).

[0097] Em uma modalidade, a sequência de polipeptídeos controlada pela administração de um composto que medeia a ligação da proteína de alvejamento de ubiquitina e cereblon codifica uma proteína de mamífero. Em uma modalidade adicional, o mamífero é um ser humano ou um camundongo.

[0098] Em uma modalidade, a sequência de polipeptídeos controlada pela administração de um composto que medeia a ligação da proteína de alvejamento de ubiquitina e cereblon codifica uma proteína não naturalmente encontrada na célula (isto é uma proteína não nativa).

[0099] Em uma modalidade, a sequência de polipeptídeos controlada

pela administração de um composto que medeia a ligação da proteína de alvejamento de ubiquitina e cereblon é uma proteína de transmembrana.

[00100] Em uma modalidade, a sequência de polipeptídeos controlada pela administração de um composto que medeia a ligação da proteína de alvejamento de ubiquitina e cereblon codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou um receptor de célula T (TCR).

[00101] As proteínas de fusão podem ser preparadas usando técnicas padrão conhecidos na técnica, incluindo conjugação química. Por exemplo, sequências de DNA codificando os componentes de polipeptídeo (A e B) podem ser montados separadamente e ligados em um vetor de expressão apropriado. A extremidade 3' da sequência de DNA codificando um componente de polipeptídeo é ligado, com ou sem um ligador de peptídeo, à extremidade 5' de uma sequência de DNA codificando o segundo componente de polipeptídeo de modo que os quadros de leitura das sequências estejam em fase. Isto permite a tradução em uma única proteína de fusão que retém a atividade biológica de ambos polipeptídeos componentes.

[00102] A proteína de fusão pode adicionalmente compreender um domínio alvejador de membrana de modo que a proteína de fusão esteja localizada na membrana celular. Em uma modalidade, a sequência de polipeptídeos adicionalmente compreende um domínio alvejador de membrana.

[00103] O domínio alvejador de membrana pode ser uma modificação química ou sequência de proteína particular que prende a molécula à membrana celular. Portanto, em uma modalidade, a região alvejadora de membrana é selecionada de: uma região alvejadora de miristoilação, uma região alvejadora de palmitoilação, uma sequência de prenilação (isto é, farnesilação, geranil-geranilação, Caixa CAAX), um motivo de interação de proteína-proteína ou uma sequência de transmembrana (por exemplo de um receptor).

[00104] Em uma modalidade, a proteína de fusão é uma fusão genética. Em uma modalidade alternativa, a proteína de fusão é gerada usando conjugação química, por exemplo usando reticuladores químicos convencionais que são usados para fundir os componentes A e B.

[00105] Em uma modalidade a proteína de fusão compreende a sequência de polipeptídeos e uma proteína de alvejamento de ubiquitina consistindo em menos do que 135 aminoácidos no comprimento que compreende o motivo de grampo de cabelo de um sítio de ligação de cereblon.

[00106] Em uma modalidade a proteína de fusão compreende a sequência de polipeptídeos e uma proteína de alvejamento de ubiquitina, em que a proteína de alvejamento de ubiquitina consiste de uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 6 a 14 e 27.

FÁRMACOS DE IMIDA IMUNOMODULADORES

[00107] Em uma modalidade, o composto é um fármaco de imida imunomodulatório (IMiD). Tais fármacos são classe de fármacos imunomodulatórios contendo um grupo imida. Correntemente, o uso primário de IMiDs no tratamento de cânceres e doenças autoimunes.

[00108] Em uma modalidade, o IMiD é talidomida, lenalidomida ou pomalidomida ou um derivado funcional ou análogo das mesmas. Em uma modalidade adicional, o IMiD é selecionado do grupo consistindo em: talidomida, lenalidomida e pomalidomida ou um derivado funcional ou análogo das mesmas.

RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICO

[00109] De acordo com um outro aspecto da invenção é provido um receptor de antígeno quimérico (CAR) compreendendo:

- um domínio de ligação do ligando extracelular;
- um domínio de transmembrana;
- um domínio de sinalização intracelular; e,

uma proteína de alvejamento de ubiquitina como aqui descrita, que é capaz de ser ligada pela ubiquitina ligase na presença de um composto.

[00110] Em uma modalidade, o domínio alvejando a ubiquitinação consiste de uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 6 a 14 ou fragmentos funcionais ou variantes funcionais das mesmas.

[00111] Em uma modalidade, o domínio alvejando a ubiquitinação consiste de uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 6 a 14, 27 ou fragmentos funcionais ou variantes funcionais das mesmas.

[00112] Como aqui descrito, o composto (por exemplo um IMiD) é capaz de ligação a uma ubiquitina ligase e possibilita que a ubiquitina ligase se ligue à proteína de alvejamento de ubiquitina, levando deste modo o receptor de antígeno quimérico em proximidade da ubiquitina ligase de modo que o receptor de antígeno quimérico fosse capaz de ser ubiquitinado. Uma vez ubiquitinado, o receptor de antígeno quimérico pode ser degradado por um proteassoma ou a sua atividade de sinalização pode ser prejudicada pela presença da cadeia da ubiquitina.

[00113] Os CARs da presente invenção incluem uma proteína de alvejamento de ubiquitina intracelular que pode ser ligada pela ubiquitina ligase na presença de um composto. Pela inclusão de uma proteína de alvejamento de ubiquitina no construto de CAR, o CAR como expresso pela célula hospedeira pode ser pronta e rapidamente degradado na exposição a um composto que medeia a ligação entre a proteína de alvejamento de ubiquitina e a ubiquitina ligase e utilize o caminho proteassômico da ubiquitina para degradar o CAR. Deste modo, administrar um composto alvejando uma proteína de alvejamento de ubiquitina dentro de um CAR permite a modulação da ativação das célula expressando CAR, visto que a degradação do CAR ou uma porção do mesmo dentro da célula expressando CAR impede o sinal de ativação de ocorrer. Esta estratégia pode ser utilizada para modular

a ativação da célula expressando CAR, por exemplo, para diminuir a ativação da célula expressando CAR de modo a reduzir respostas inflamatórias adversas. Além disso, pela utilização desta estratégia, a célula hospedeira é poupada e apenas o CAR é degradado.

[00114] Além disso, o uso do degron mínimo como aqui descrito, significa que é menos provável que o mesmo interfira com a sinalização do construto de CAR.

[00115] Receptores de antígeno quimérico padrão são conhecidos na técnica e geralmente compreendem um domínio de ligação alvo, um domínio de transmembrana e um domínio efetor intracelular.

[00116] O domínio de ligação alvo (também aludido como o domínio de ligação do ligando extracelular) se liga a um alvo, em particular em que o alvo é uma molécula específica de tumor, molécula viral ou qualquer outra molécula expressa em uma população de célula alvo que seja adequada para mediar reconhecimento e eliminação por um linfócito. Em uma modalidade, o domínio de ligação alvo compreende um anticorpo, um fragmento de ligação de antígeno ou um ligando. Em uma modalidade, o domínio de ligação alvo compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo. Em uma modalidade, o domínio de ligação alvo é um ligando (por exemplo um ligando natural do antígeno alvo). Em uma modalidade alternativa, o domínio de ligação alvo é um fragmento de ligação de antígeno. Em uma modalidade adicional, o fragmento de ligação de antígeno é um fragmento variável de cadeia única (scFv) ou um dAb. Ainda em uma modalidade adicional, o dito scFv compreende o fragmento variável leve (VL) e o pesado (VH) de um anticorpo monoclonal específico de antígeno alvo unido por um ligador flexível.

[00117] Em uma modalidade, o domínio de ligação alvo pode ligar-se a mais do que um alvo, por exemplo dois alvos diferentes. Um tal domínio de ligação alvo pode ser derivado de um anticorpo de cadeia única biespecífica. Por exemplo, Blinatumomab (também conhecido como AMG 103 ou MT103)

é um anticorpo scFv CD19 e CD3 biespecífico recombinante consistindo em quatro domínios variáveis da imunoglobulina montados em uma única cadeia polipeptídica. Dois dos domínios variáveis formam o sítio de ligação para CD19 que é um antígeno de superfície celular expresso na maioria das células B normais e malignas. Os outros dois domínios variáveis formam o sítio de ligação para CD3 que é parte do complexo receptor de célula T nas células T. Estes domínios variáveis podem estar dispostos no CAR em tandem, isto é, dois fragmentos variáveis de anticorpo de cadeia única (scFv) amarrados a um espaçador e domínios de transmembrana e sinalização. Os quatro domínios variáveis podem estar dispostos em qualquer ordem particular dentro da molécula de CAR (por exemplo VL(primeiro alvo)-VH(primeiro alvo)-VH(segundo alvo)-VL(segundo alvo) ou VL(segundo alvo)-VH(segundo alvo)-VH(primeiro alvo)-VL(primeiro alvo) etc.), unidos com quaisquer ligadores adequados que são conhecidos na técnica.

[00118] O domínio de ligação alvo pode ligar uma variedade de antígenos de superfície celular, mas em uma modalidade, o domínio de ligação alvo se liga a um antígeno associado a tumor. Em uma modalidade adicional, o antígeno associado a tumor é selecionado de: BCMA, antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno canceroso-125, CA19-9, CD5, CD13, CD19, CD20, CD22, CD27, CD30, CD33, CD34, CD45, CD52, CD70, CD117, CD138, CD160, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), proteína de ligação de foliato, gangliosídeo G2 (GD2), HER2, mesotelina, MUC-1, molécula de adesão de célula neural (NCAM), antígeno de célula tronco prostática (PSCA), antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), ácido prostático fosfatase (PAP), proteína melan-A, sinaptófise, antígeno epitelial de transmembrana seis da próstata I (STEAP1), TARP, Trp-p8, tirosinase ou vimentina. Ainda em uma modalidade adicional, o antígeno associado a tumor é BCMA.

[00119] Em uma modalidade o domínio de ligação do ligando

extracelular é uma sequência de Fv de cadeia única aminoácido do antígeno de maturação anticélula B (BCMA).

[00120] Em uma modalidade o domínio de ligação do ligando extracelular é uma sequência de aminoácido de Fv de cadeia única anti-BCMA que compreende a SEQ ID NO: 29.

[00121] Em uma modalidade, o domínio de ligação alvo tem uma afinidade de ligação de menos do que cerca de 500 nanomolares (nM), tal como menos do que cerca de 400 nM, 350 nM, 300 nM, 250 nM, 200 nM, 150 nM, 100 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM ou 0,25 nM. Em uma modalidade, o domínio de ligação alvo tem uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM a cerca de 0,25 nM. Em uma modalidade adicional, o domínio de ligação alvo tem uma afinidade de ligação de cerca de 1 nM a cerca de 0,5 nM (isto é, de cerca de 1000 pM a cerca de 500 pM).

[00122] Em uma modalidade, o CAR adicionalmente compreende um domínio espaçador entre o domínio de ligação alvo e o domínio de transmembrana. Um espaçador permite que o domínio de ligação alvo se oriente em direções diferentes para facilitar a ligação e pode ser usado para melhorar a interação da ligação alvo. Em uma modalidade, o espaçador compreende uma sequência derivada de IgG (por exemplo região Fc de IgG1 ou região de dobradiça de IgG1), CD8 ou CD4.

[00123] Em uma modalidade, o domínio de transmembrana pode ser derivado de uma fonte natural ou de uma sintética. Em uma modalidade, o domínio de transmembrana pode ser derivado de qualquer proteína ligada à membrana ou de transmembrana. alternativamente, o domínio de transmembrana pode ser sintético e pode compreender resíduos predominantemente hidrofóbicos tais como leucina e valina.

[00124] Por exemplo, o domínio de transmembrana pode ser o domínio

de transmembrana de proteínas CD, tais como CD4, CD8, CD3 ou CD28, uma subunidade do receptor de célula T, tal como α , β , γ ou δ , uma subunidade do receptor de IL-2 (cadeia α) ou uma cadeia da subunidade de receptores Fc. Em uma modalidade, o domínio de transmembrana compreende o domínio de transmembrana de CD4, CD8 ou CD28. Em uma modalidade adicional, o domínio de transmembrana compreende o domínio de transmembrana de CD4 ou CD8 (por exemplo a cadeia CD8 alfa, como descrita na NCBI Reference Sequence: NP_001139345.1, aqui incorporada por referência).

[00125] Em uma modalidade, o domínio de transmembrana compreende a SEQ ID NO: 17.

[00126] O CAR pode adicionalmente compreender uma sequência de dobradiça a seguir do domínio de transmembrana (por exemplo entre o domínio de ligação alvo e o domínio de transmembrana). Portanto, em uma modalidade, a sequência de dobradiça compreende a SEQ ID NO: 18. Em uma modalidade adicional, os domínios de dobradiça e transmembrana compreendem a sequência completa da SEQ ID NO: 19.

[00127] Em algumas modalidades, o domínio de transmembrana é composto da hélice de transmembrana CD8 α imediatamente seguido pelo domínio intracelular de comprimento completo de 4-1BB que contém um trecho de sequência compatível com a interface de membrana. Se o domínio a seguir do domínio de transmembrana não tiver uma sequência compatível com a interface de membrana depois de um ligador pode ser usado.

[00128] Os exemplos preferidos do domínio efetor intracelular para o uso em um CAR aqui descrito, pode ser as sequências citoplásmicas do receptor natural e correceptores de célula T que atuam em conjunto para iniciar a transdução de sinal a seguir da ligação de antígeno, assim como qualquer derivado ou variante destas sequências e qualquer sequência sintética que tenha a mesma capacidade funcional. Estes domínios podem ser

separados em duas classes: aqueles que iniciam a ativação primária dependente de antígeno e aqueles que atuam em uma maneira independente de antígeno para prover um sinal secundário ou coestimulador. Os domínios efetores de ativação primária podem compreender motivos de sinalização que sejam conhecidos como motivos de ativação com base na tirosina imunorreceptora (ITAMs). ITAMs são motivos de sinalização bem definidos, habitualmente encontrados na cauda intracitoplasmática de uma variedade de receptores e servem como sítios de ligação para as tirosinas cinases da classe syk/zap70. Os exemplos de ITAMs usados na invenção podem incluir, como exemplos não limitantes, aqueles derivados de CD3zeta, FcRgama, FcRbeta, FcRépsilon, CD3gama, CD3delta, CD3épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b e CD66d. Em uma modalidade, o domínio efector intracelular compreende um domínio de sinalização CD3zeta (também conhecidos como CD247). Em uma modalidade adicional, o domínio de sinalização CD3zeta compreende a SEQ ID NO: 20. Esta sequência também é encontrada na Uniprot P20963, resíduos 51 a 164. Os TCRs naturais contêm uma molécula de sinalização CD3zeta, portanto o uso deste domínio efector está mais próximo do construto de TCR que ocorre na natureza.

[00129] Em uma modalidade, o domínio efector intracelular do CAR compreende um domínio de sinalização CD3zeta que tem uma sequência de aminoácido com pelo menos 70%, preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, 90 %, 95 %, 97 % ou 99 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 20. Em uma modalidade adicional, o domínio efector intracelular do CAR compreende um domínio de sinalização CD3zeta que compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 20.

[00130] O CAR também pode prover um sinal secundário ou coestimulador. As células T adicionalmente compreendendo moléculas coestimuladoras que se ligam aos ligandos coestimuladores cognatos nas células que apresentam antígeno de modo a realçar a resposta de célula T, por

exemplo aumentando-se a ativação de proliferação, diferenciação e similares. Portanto, em uma modalidade, o CAR adicionalmente compreende um domínio coestimulador. Em uma modalidade adicional, o domínio coestimulador compreende o domínio intracelular de uma molécula coestimuladora, selecionada de CD28, CD27, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), ICOS (CD278), CD30, CD40, PD-1 (CD279), CD2, CD7, NKG2C (CD94), B7-H3 (CD276) ou qualquer combinação das mesmas. Ainda em uma modalidade adicional, o domínio coestimulador compreende o domínio intracelular de uma molécula coestimuladora, selecionada de CD28, CD27, 4-1BB, OX40, ICOS ou qualquer combinação das mesmas, em particular o domínio intracelular de 4-1BB.

[00131] Em uma modalidade, o domínio coestimulador compreende um domínio de sinalização 4-1BB que tem uma sequência de aminoácido com pelo menos 70%, preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, 90 %, 95 %, 97 % ou 99 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 21. Em uma modalidade adicional, o domínio coestimulador compreende um domínio de sinalização 4-1BB da SEQ ID NO: 21. Esta sequência também é encontrada na Uniprot Q07011, resíduos 214 a 255. A vantagem de usar este domínio coestimulador é que o mesmo contém um resíduo de lisina que atua como um sítio de ubiquitinação (Lys219), portanto a proteína de alvejamento de ubiquitina usada com um construto de CAR contendo as 4-1BB coestimuladoras não precisam conter um sítio de ubiquitinação por si só para que a ubiquitinação seja induzida.

[00132] Será entendido que os componentes intracelulares no CAR (isto é o domínio de sinalização, domínio coestimulador e proteína de alvejamento de ubiquitina) podem ser arranjados em qualquer ordem dentro do construto CAR, contanto que eles estejam intracelularmente localizados. Portanto, em uma modalidade o construto CAR compreende os domínios na seguinte ordem: domínio de ligação do ligando extracelular - domínio de

transmembrana - domínio de sinalização intracelular - proteína de alvejamento de ubiquitina; domínio de ligação do ligando extracelular - domínio de transmembrana - proteína de alvejamento de ubiquitina - domínio de sinalização intracelular; domínio de ligação do ligando extracelular - domínio de transmembrana - domínio de sinalização intracelular - proteína de alvejamento de ubiquitina - domínio coestimulador; domínio de ligação do ligando extracelular - domínio de transmembrana - domínio coestimulador - domínio de sinalização intracelular - proteína de alvejamento de ubiquitina; ou domínio de ligação do ligando extracelular - domínio de transmembrana - domínio coestimulador - proteína de alvejamento de ubiquitina - domínio de sinalização intracelular. Em uma modalidade adicional, o construto CAR compreende os domínios na seguinte ordem: domínio de ligação do ligando extracelular - domínio de transmembrana - domínio coestimulador - proteína de alvejamento de ubiquitina - domínio de sinalização intracelular.

[00133] Em uma modalidade a proteína de alvejamento de ubiquitina está no terminal C do CAR.

[00134] A sequência de ácido nucléico codificando o CAR também pode compreender sequências separadoras/ligadoras entre um ou mais dos domínios do construto de CAR. Os ligadores de acordo com a invenção podem compreender apenas ou além dos outro ligadores, um ou mais conjuntos de resíduos G, S ou GS. Em uma modalidade, o ligador compreende $(GS)_n$ e/ou $(GGGS)_p$ em que $n = 1$ a 10 e $p = 1$ a 3. Em uma modalidade, o ligador compreende GSGSGS (SEQ ID NO: 23), GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 24) ou GGGGS (SEQ ID NO: 25).

[00135] De acordo com um outro aspecto da invenção é provido um método para controlar a atividade de uma terapia de célula com receptor de antígeno quimérico compreendendo:

(a) transduzir ou transfectar uma célula imunomodulatória com um polinucleotídeo codificando o receptor de antígeno quimérico como aqui

descrito;

(b) expressar o dito polinucleotídeo na célula imunomodulatória;

(c) controlar a ativação do receptor de antígeno quimérico pela adição de um composto;

em que o composto medeia a ligação de a) a proteína de alvejamento de ubiquitina e b) uma ubiquitina ligase em uma maneira que leva o receptor de antígeno quimérico em proximidade da ubiquitina ligase, em que o receptor de antígeno quimérico, na presença do composto é capaz de ser ubiquitinado.

[00136] Sem estar ligado pela teoria, a adição do composto é considerada levar à degradação do CAR, reduzindo deste modo (isto é, desligando) o nível e atividade de CAR. Pela degradação de pelo menos uma porção do CAR, a capacidade do CAR para ativar a célula efetora imune, por exemplo uma célula T de CAR é diminuída. Como aqui considerado, a degradação suficiente do CAR ocorre em que a funcionalidade de sinalização do CAR é rompida. Alternativamente, a fixação de uma cadeia da poliubiquitina causaria impedimento estérico que leva à atividade reduzida através da inibição estérica.

PEPTÍDEOS DE SINAL

[00137] Os componentes da proteína de fusão aqui descrita podem compreender um peptídeo de sinal de modo que quando um componente é expresso em uma célula, a proteína nascente é direcionada para o retículo endoplasmático e subsequentemente para a superfície celular onde a mesma pode ser expressa.

[00138] O núcleo do peptídeo de sinal pode conter um trecho longo de aminoácidos hidrofóbicos que tem uma tendência para formar uma única hélice alfa. O peptídeo de sinal pode começar com um trecho curto positivamente carregado de aminoácidos que ajuda a reforçar a topologia

apropriada do polipeptídeo durante a translocação. No final do peptídeo de sinal existe tipicamente um trecho de aminoácidos que é reconhecido e clivado pela peptidase de sinal. A peptidase de sinal pode clivar durante ou depois da conclusão da translocação para gerar peptídeo de sinal livre e uma proteína madura. Os peptídeos de sinal livres são depois digeridos pelas proteases específicas. O peptídeo de sinal pode estar no terminal amino da molécula.

[00139] Em uma modalidade, o peptídeo de sinal é derivado de CD8 (ver UniProt P01732). Em uma modalidade adicional, o peptídeo de sinal compreende a SEQ ID NO: 22 ou uma variante da mesma tendo 5, 4, 3, 2 ou 1 mutações de aminoácido (inserções, deleções, substituições ou adições) contanto que o peptídeo de sinal ainda funcione para causar a expressão de superfície celular do componente (isto é uma variante funcional).

POLINUCLEOTÍDEOS E VETORES DE EXPRESSÃO

[00140] De acordo com um outro aspecto da invenção é provido um polinucleotídeo isolado codificando a proteína de alvejamento de ubiquitina aqui descrita. De acordo com um outro aspecto da invenção é provido um polinucleotídeo codificando a proteína de fusão aqui descrita. De acordo ainda com um outro aspecto da invenção é provido um polinucleotídeo codificando o receptor de antígeno quimérico aqui descrito.

[00141] As sequências de polinucleotídeo aqui descritas podem ser otimizadas no códon. A degenerescência encontrada no código genético permite que cada aminoácido seja codificado por entre um e seis códons sinônimos possibilitando que muitas sequências de ácido nucléico alternativas codifiquem a mesma proteína (Gustafsson *et al.* (2004) *Trends Biotechnol.* 22(7): 346-53). A otimização de códon é uma técnica usada para modificar as sequências genéticas com a intenção de aumentar a taxa de expressão de um gene em um sistema de expressão heteróloga; tipicamente a sequência de nucleotídeo codificando uma proteína de interesse é otimizada no códon tal

que o uso do códon seja mais intimamente parecido com a tendência de códon da célula hospedeira, enquanto ainda codifica a mesma sequência de aminoácido.

[00142] Os ácidos nucléicos aqui descritos podem compreender DNA ou RNA. Eles podem ser de filamento único ou de filamento duplo. Eles também podem ser polinucleotídeos que incluam dentro deles nucleotídeos sintéticos ou modificados. Vários tipos diferentes de modificação são bem conhecidos na técnica, tais como espinhas dorsais de metilfosfonato e fosforotioato ou adição de cadeias de acridina ou polilisina. Tais modificações podem ser usadas de modo a realçar a atividade *in vivo* ou vida útil dos polinucleotídeos da presente invenção.

[00143] O polinucleotídeo pode estar presente em um cassete de expressão ou vetor de expressão (por exemplo um plasmídeo para a introdução dentro de uma célula hospedeira bacteriana ou um vetor viral tal como um lentivírus para a transfecção de uma célula hospedeira de mamífero). Portanto, de acordo com um outro aspecto da invenção é provido um vetor de expressão compreendendo qualquer um dos polinucleotídeos aqui descritos.

[00144] O termo “vetor” se refere a um veículo que é capaz de artificialmente carrear material genético estranho para dentro de uma outra célula, onde o mesmo pode ser replicado e/ou expresso. Em uma modalidade, o vetor é um plasmídeo, um vetor viral, um vetor com base em transposon ou um mRNA sintético.

[00145] Em uma modalidade, o vetor de expressão é um vetor retroviral. Em uma modalidade adicional, o vetor retroviral é derivado de ou selecionado de um lentivírus, alfa-retrovírus, gama-retrovírus ou retrovírus espumante, tal como um lentivírus ou gama-retrovírus, em particular um lentivírus. Em uma modalidade adicional, a partícula de vetor retroviral é um lentivírus selecionado do grupo consistindo em HIV-1, HIV-2, SIV, FIV,

EIAV e Visna. Os lentivírus são capazes de infectar células que não se dividem (isto é, quiescentes) o que os tornam vetores atrativos para a terapia de gene. Ainda em uma modalidade adicional, a partícula de vetor retroviral é HIV-1 ou é derivado de HIV-1. A estrutura genômica de alguns retrovírus pode ser encontrada na técnica. Por exemplo, detalhes sobre HIV-1 podem ser encontrados da NCBI Genbank (Genome Accession No. AF033819). O HIV-1 é um dos retrovírus melhor entendido e é, portanto, frequentemente usado como um vetor viral.

CÉLULA HOSPEDEIRAS

[00146] De acordo com um outro aspecto da invenção é provida uma célula compreendendo a proteína de fusão aqui descrita. De acordo com um outro aspecto da invenção é provida uma célula compreendendo um polinucleotídeo ou vetor de expressão como aqui descritos.

[00147] Em uma modalidade, a célula é uma célula imunomodulatória. O termo “célula imunomodulatória” se refere a uma célula de origem hematopoiética funcionalmente envolvida na modulação (por exemplo no início e/ou execução) das repostas imunes inatas e/ou adaptativas. A dita célula imunomodulatória de acordo com a presente invenção pode ser derivada de uma célula tronco. As células tronco podem ser células tronco adultas, células tronco embrionárias não humanas, mais particularmente células tronco não humanas, células tronco do sangue do cordão umbilical, células progenitoras, células tronco da medula óssea, células tronco pluripotentes induzidas, células tronco totipotentes ou células tronco hematopoiéticas. A dita célula imunomodulatória também pode ser uma célula dendrítica, uma célula dendrítica matadora, um mastóide, uma célula NK, uma célula B ou uma célula T. A célula T pode ser selecionada do grupo consistindo em linfócitos T inflamatórios, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T reguladores ou linfócitos T auxiliares ou uma combinação dos mesmos. Portanto, em uma modalidade, a célula imunomodulatória é derivada de um

linfócito T inflamatório, linfócito T citotóxico, linfócito T regulatório ou linfócito T auxiliar. Em uma outra modalidade, a dita célula pode ser derivada do grupo consistindo em linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺.

[00148] Em uma modalidade, a célula imunomodulatória pode ser uma célula imunomodulatória humana.

[00149] Em uma modalidade, a célula imunomodulatória é alogênica ou autóloga. Será entendido que “autóloga” se refere às células obtidas dos próprios pacientes, ao passo que “alogênica” se refere às células obtidas de um doador. As células autólogas têm a vantagem de que elas são compatíveis com o paciente e, portanto, evitando quaisquer problemas de compatibilidade imunológica levando à doença do enxerto-versus-hospedeiro (GvHD). De modo a prevenir as células alogênicas de serem rejeitadas pelo paciente, elas precisariam ser derivadas de um doador compatível ou modificadas para garantir que nenhum antígeno esteja presente na superfície da célula que iniciam uma resposta imune indesejada.

[00150] Antes da expansão e modificação genética das células da invenção, uma fonte de células pode ser obtida de um sujeito através de uma variedade de métodos não limitantes. As células podem ser obtidas de várias fontes não limitantes, incluindo células mononucleares de sangue periférico, medula óssea, tecido de linfonodo, sangue do cordão umbilical, tecido de timo, tecido de um sítio de infecção, ascite, efusão pleural, tecido do baço e tumores. Em certas modalidades da presente invenção, qualquer número de linhagens de célula T disponíveis e conhecidas por aqueles versados na técnica, pode ser usado. Em uma outra modalidade, a dita célula pode ser derivada de um doador saudável ou um doador doente, tal como um paciente diagnosticado com câncer ou uma infecção. Em uma outra modalidade, a dita célula é parte de uma população mista de células que apresentam características fenotípicas diferentes.

[00151] As células imunomodulatórias podem ser ativadas e/ou

expandidas antes de serem transduzidas com polinucleotídeos ou vetores de expressão codificando a proteína de fusão aqui descrita. Por exemplo, as células podem ser tratadas com um anticorpo monoclonal anti-CD3 para causar ativação.

[00152] Será entendido que as células imunomodulatórias podem expressar a proteína de fusão aqui descrita transitoriamente ou estavelmente/permanentemente (dependendo do método de transfecção usado e se o polinucleotídeo codificando a proteína de fusão integrou-se dentro do genoma da célula imunomodulatória ou não).

[00153] Depois da introdução da proteína de fusão, as células imunomodulatórias podem ser purificadas.

USOS

[00154] A invenção aqui descrita provê o uso de uma proteína de alvejamento de ubiquitina mínima como parte de uma mudança de segurança. Portanto, de acordo com um aspecto da invenção é provido o uso da proteína de alvejamento de ubiquitina aqui descrita como uma mudança de segurança.

[00155] Em uma modalidade, a mudança de segurança é usada em uma terapia de gene (ou método do mesmo). Em uma modalidade adicional, a terapia de gene é uma terapia de gene celular.

[00156] Como aqui descrito, o termo “mudança de segurança” se refere a um mecanismo bioquímico que pode ser ativado em demanda de modo a controle um processo biológico que pode causar dano. Portanto, em uma modalidade, a mudança de segurança é usada para controle da sinalização de um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de célula T heterólogo (TCR).

[00157] Em uma modalidade, o TCR é geneticamente modificado. Em uma modalidade adicional, a afinidade dos receptores de célula T é mudada para uma afinidade e/ou especificidade normalmente não presente nos arredores naturais do receptor. Ainda em uma modalidade adicional, a

afinidade do receptor de célula T é mudada para uma afinidade para um autoantígeno, um antígeno de tumor e/ou um antígeno derivado de patógeno.

[00158] De acordo com um outro aspecto da invenção é provida a célula aqui descrita para o uso em terapia. Em uma modalidade, a terapia compreende a administração da célula a um sujeito humano em necessidade de tal terapia.

[00159] De acordo com um outro aspecto da invenção é provido o uso da proteína de fusão aqui descrita, em um método de terapia de gene.

[00160] Em uma modalidade, a terapia é a terapia celular adotiva. “Terapia celular adotiva” (ou “imunoterapia adotiva”) se refere à transferência adotiva de linfócitos T humanos que são engenheirados pela transferência de gene para expressar CARs ou TCRs específicos para moléculas de superfície expressas nas células alvo. Isto pode ser usado para tratar uma faixa de doenças dependendo do alvo escolhido, por exemplo antígenos específicos de tumor para tratar câncer. A terapia celular adotiva envolve remover uma porção das células sanguíneas brancas do paciente usando um processo chamado leucaferese. As células T podem depois ser expandidas e misturadas com vetores de expressão aqui descritos de modo a permanentemente transferir a proteína de fusão às células T. As células T são expandidas mais uma vez e no final da expansão, as células T são lavadas, concentradas e depois congeladas para permitir tempo para testar, enviar e armazenar até que o paciente esteja pronto para receber a infusão de células T engenheiradas.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

[00161] De acordo com um outro aspecto da invenção é provida uma composição farmacêutica compreendendo uma pluralidade de células como aqui definidas. Em uma modalidade as células compreendendo uma sequência de polinucleotídeo codificando a sequência de polipeptídeos e uma proteína de alvejamento de ubiquitina consistindo em menos do que 135 aminoácidos

no comprimento que compreende o motivo de grampo de cabelo de um sítio de ligação de cereblon. Em uma modalidade as células compreendendo um vetor de expressão codificando a sequência de polipeptídeos e uma proteína de alvejamento de ubiquitina consistindo em menos do que 135 aminoácidos no comprimento que compreende o motivo de grampo de cabelo de um sítio de ligação de cereblon. Em uma modalidade as células compreendendo uma sequência de polinucleotídeo ou vetor de expressão codificando a sequência de polipeptídeos e uma proteína de alvejamento de ubiquitina consistindo em menos do que 135 aminoácidos no comprimento que compreende o motivo de grampo de cabelo de um sítio de ligação de cereblon são células imunomodulatórias. Em uma modalidade as células compreendendo uma sequência de polinucleotídeo ou vetor de expressão codificando a sequência de polipeptídeos e uma proteína de alvejamento de ubiquitina consistindo em menos do que 135 aminoácidos no comprimento que compreende o motivo de grampo de cabelo de um sítio de ligação de cereblon são células T.

[00162] Os exemplos de ingredientes adicionais da composição farmacêutica incluem, sem limitação, quaisquer adjuvantes, carreadores, excipientes, glidantes, agentes adoçantes, diluentes, preservantes, pigmentos/corantes, realçadores de sabor, tensoativos, agentes de umectação, agentes de dispersão, agentes de suspensão, estabilizantes, agentes isotônicos, solventes, tensoativos, emulsificadores, tampões (tais como solução salina tamponada com fosfato (PBS)), carboidratos (tais como glicose, manose, sacarose ou dextranos), aminoácidos, antioxidantes ou agentes quelantes (tais como EDTA ou glutatona).

[00163] Em uma modalidade, a composição farmacêutica adicionalmente compreende um excipiente, carreador ou diluente farmacêuticamente aceitáveis. O carreador, excipiente ou diluente devem ser “aceitáveis” no sentido de serem compatíveis com os outros ingredientes da composição e não deletérios para o receptor do mesmo. De acordo com a

presente invenção qualquer excipiente, veículo, diluentes ou aditivos usados teriam que ser compatíveis com a proteína de fusão aqui descrita. Textos padrão conhecidos na técnica, tais como “Remington’s Pharmaceutical Science”, 17a Edição, 1985, aqui incorporada por referência, podem ser consultados para preparar preparações adequadas.

[00164] As composições farmacêuticas podem ser administradas pela injeção ou infusão contínua (os exemplos incluem, mas não são limitados a intravenosa, intratumoral, intraperitoneal, intradérmica, subcutânea, intramuscular e intraportal). Em uma modalidade, a composição é adequada para a administração intravenosa. Quando da administração de uma composição terapêutica da presente invenção (por exemplo, uma composição farmacêutica contendo uma célula geneticamente modificada como aqui descrita), a mesma geralmente será formulada em uma forma injetável de dosagem única (solução, suspensão, emulsão). As composições farmacêuticas podem ser adequadas para a administração tópica (que inclui, mas não é limitada à administração epicutânea, inalada, intranasal ou ocular) ou enteral (que inclui, mas não é limitada à administração oral ou retal).

[00165] Os métodos para a preparação de tais composições farmacêuticas são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Outros excipientes podem ser adicionados à composição como apropriado para o modo de administração e a proteína particular usada.

[00166] As doses e regimes de tratamento eficazes para administrar a composição da presente invenção podem ser dependentes de fatores tais como a idade, peso e situação de saúde do paciente e doença a ser tratada. Tais fatores estão dentro da competência do médico atendente.

[00167] De acordo com um outro aspecto da invenção é provida uma composição farmacêutica como aqui definida, para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença.

[00168] Em uma modalidade, a doença é selecionada de: um câncer,

uma resposta imune patogênica e uma infecção.

[00169] De acordo com um outro aspecto da invenção é provido o uso de uma composição farmacêutica como aqui descrita, na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de uma doença.

KITS

[00170] De acordo com um outro aspecto da invenção é provido um kit que compreende a proteína de fusão, receptor de antígeno quimérico, polinucleotídeo, vetor de expressão, célula e/ou composição farmacêutica como aqui descritos.

MÉTODOS

[00171] De acordo com um outro aspecto da invenção é provido um método para engenheirar uma célula imunomodulatória (isto é expressar a proteína de fusão aqui descrita), compreendendo:

- (a) prover uma célula imunomodulatória;
- (b) transduzir ou transfectar o polinucleotídeo ou o vetor de expressão como aqui definido, dentro da dita célula imunomodulatória; e
- (c) expressar o dito polinucleotídeo ou o dito vetor de expressão na célula imunomodulatória.

[00172] Em uma modalidade, a célula imunomodulatória é obtida a partir de uma amostra isolada de um paciente (isto é autólogo). Em uma modalidade alternativa, a célula imunomodulatória é obtida de um doador (isto é, alogênica).

[00173] Como um exemplo não limitante, a proteína de fusão pode ser introduzida como um transgene codificado por um vetor de expressão como aqui descrito. O vetor de expressão também pode conter um marcador de seleção que provê a identificação e/ou seleção das células que receberam o dito vetor.

[00174] Os polipeptídeos podem ser sintetizados *in situ* na célula como um resultado da introdução de polinucleotídeos codificando a dita proteína de

fusão dentro da célula. alternativamente, os ditos polipeptídeos poderiam ser produzidos fora da célula e depois introduzidos na mesma. Os métodos para introduzir um construto de polinucleotídeo dentro das células são conhecidos na técnica e incluindo, como exemplos não limitantes, métodos de transformação estável em que o construto de polinucleotídeo é integrado dentro do genoma da célula ou métodos de transformação transitória em que o construto de polinucleotídeo não é integrado dentro do genoma da célula e métodos mediados por vírus. Os ditos polinucleotídeos podem ser introduzidos dentro de uma célula, por exemplo, pelos vetores virais recombinantes (por exemplo retrovírus, adenovírus), lipossomas e similares. Por exemplo, os métodos de transformação transitória incluem por exemplo microinjeção, eletroporação ou bombardeamento de partícula. Os polinucleotídeos podem ser incluídos em vetores, mais particularmente plasmídeos ou vírus, em vista de serem expressos nas células.

[00175] Os termos “transfecção”, “transformação” e “transdução” como aqui usados, podem ser usados para descrever a inserção do vetor de expressão dentro da célula alvo. A inserção de um vetor é usualmente chamada de transformação para as células bacterianas e transfecção para as células eucarióticas, embora a inserção de um vetor viral também possa ser chamada de transdução. A pessoa versada também estará ciente dos diferentes métodos de transfecção não viral habitualmente usados, que incluem, mas não são limitados ao uso de métodos físicos (por exemplo eletroporação, prensagem de célula, sonoporação, transfecção óptica, fusão de protoplasto, impalefecção, magnetofecção, pistola de gene ou bombardeamento de partícula), reagentes químicos (por exemplo fosfato de cálcio, compostos orgânicos altamente ramificados ou polímeros catiônicos) ou lipídeos catiônicos (por exemplo lipofecção). Muitos métodos de transfecção requerem o contato de soluções de DNA plasmídico com as células, que são depois cultivadas e selecionadas quanto a uma expressão de gene marcador.

[00176] Uma vez que a proteína de fusão tenha sido introduzida dentro da célula imunomodulatória, a dita célula pode ser aludida como uma “célula transduzida”. Portanto, de acordo com um outro aspecto da invenção é provida uma célula obtida pelo método aqui descrito. Também dentro do escopo da presente invenção está uma linhagem de célula obtida a partir de uma célula transduzida de acordo com o método aqui descrito.

[00177] De acordo com um outro aspecto da invenção é provido um método de inibir um sistema de CAR em um sujeito que compreende as células imunomodulatórias aqui definidas, que compreende administrar ao sujeito um composto que medeia a ligação entre a proteína de alvejamento de ubiquitina e uma ubiquitina ligase. Um tal composto levaria o CAR em proximidade da ubiquitina ligase de modo que o CAR fosse capaz de ser ubiquitinado. O CAR ubiquitinado pode depois ser degradado por um proteassoma.

[00178] O nível de sinalização de CAR pelo sistema aqui descrito, pode ser ajustado alterando-se a quantidade de composto presente ou da quantidade de tempo que o composto está presente. Portanto, em uma modalidade, o nível de ativação da célula de CAR pode ser aumentado diminuindo-se a dose de composto administrado ao sujeito ou diminuição da frequência da sua administração. Em uma modalidade alternativa, o nível de ativação da célula de CAR pode ser reduzido aumentando-se a dose do composto ou a frequência de administração ao sujeito.

[00179] Sem estar ligado pela teoria, níveis mais altos de sinalização de CAR são prováveis de estarem associados com a progressão de doença reduzida, mas atividades tóxicas potencialmente aumentadas, enquanto níveis mais baixos de sinalização de CAR são prováveis de estarem associados com a progressão de doença aumentada, mas atividades tóxicas potencialmente reduzidas.

[00180] De acordo com um outro aspecto da invenção é provido um

método de tratar e/ou prevenir uma doença, que compreende administrar a um sujeito a célula ou a composição farmacêutica como aqui definidas.

[00181] Em uma modalidade, a doença é câncer. Em uma modalidade adicional, o câncer é selecionado de: hematológico, medula óssea, linfa, sistema linfático, bexiga, mama, cólon, colo do útero, esôfago, rim, intestino grosso, pulmão, cavidade oral, ovário, pâncreas, próstata, reto, pele ou estômago. Ainda em uma modalidade adicional, o câncer é um câncer hematológico, por exemplo selecionado do grupo consistindo em: leucemia de célula B, mieloma múltiplo (MM), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL) e linfoma de não Hodgkin.

[00182] Quando o método aqui descrito é usado para tratar câncer, em uma modalidade, o método reduz o número de células de tumor, reduz o tamanho do tumor e/ou erradica o tumor no sujeito.

[00183] Em uma modalidade, a doença é uma resposta imune patogênica, tal como uma doença autoimune, alergia ou rejeição do enxerto versus hospedeiro. As doenças autoimunes surgem de uma resposta imune anormal do corpo contra substâncias e tecidos normalmente presentes no corpo. Isto pode resultar no dano ou destruição de tecidos ou crescimento ou função de órgão alterados. Os exemplos de doenças autoimunes incluem, mas não são limitados a: diabetes melito Tipo 1, artrite (incluindo artrite juvenil, psoriática, reativa e reumatóide), psoríase, esclerose múltipla, vasculite, alopecia areata, anemia perniciosa, glomerulonefrite, hepatite autoimune, pancreatite autoimune, colite ulcerativa, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Graves, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Sjogren, doença celíaca, doença de Crohn e síndrome de Wegener.

[00184] Em uma modalidade, a doença é uma infecção. Uma infecção pode ser causada por um patógeno, tal como uma bactéria, vírus, parasita, protozoário ou fungos. Em uma modalidade adicional, a infecção é uma infecção viral ou bacteriana.

[00185] Em uma modalidade, o sujeito é um mamífero. Em uma modalidade adicional, o mamífero é selecionado do grupo consistindo em: um ser humano, um camundongo, um primata, uma vaca, um porco, um cavalo, uma ovelha, um gato e um cão. Ainda em uma modalidade adicional, o sujeito é um ser humano.

[00186] O método de tratamento e/ou prevenção, pode compreender as seguintes etapas:

- (a) prover uma célula(s);
- (b) transduzir ou transfectar o polinucleotídeo ou o vetor de expressão como aqui definido, dentro da(s) dita(s) célula(s);
- (c) expressar o dito polinucleotídeo ou dito vetor de expressão na(s) célula(s); e
- (d) administrar a(s) célula(s) a um paciente.

[00187] Em uma modalidade, o método adicionalmente compreende: (e) administrar um composto que medeia a ligação entre a proteína de alvejamento de ubiquitina e uma ubiquitina ligase. Isto pode ser usado para controlar o nível e/ou atividade da sequência de polipeptídeos expressos pelo dito polinucleotídeo ou dito vetor de expressão. O composto pode ser administrado ao paciente antes ou simultaneamente com o polinucleotídeo ou o vetor de expressão (isto é antes ou durante a etapa (d) nas etapas do método de tratamento esboçadas acima). No contexto de um CAR como aqui descrito, a administração do composto antes/simultaneamente com o polipeptídeo/vetor de expressão permite que o CAR seja administrado em um estado “inativo” ou um “modestamente ativo” (isto é OFF). A quantidade de agente pode ser depois diminuída de modo a ativar o CAR. Administrar o CAR no seu estado inativo permite que uma distribuição uniforme das células imunomodulatórias seja obtida, portanto prevenindo o acúmulo local de células ativadas.

[00188] Alternativamente, o composto pode ser administrado ao paciente depois da administração do polinucleotídeo ou do vetor de expressão

(isto é, depois da etapa (d) nas etapas do método de tratamento esboçado acima) de modo que o CAR seja administrado no seu estado “ativo” (isto é, ON).

[00189] As células ou composições farmacêuticas aqui descritas podem ser administradas a um paciente que já tem a doença de modo a diminuir, reduzir ou melhorar pelo menos um sintoma associado com a doença e/ou diminuir a velocidade, reduzir ou bloquear a progressão da doença (isto é terapêuticamente). As células ou composições farmacêuticas aqui descritas podem ser administradas a um paciente que ainda não contraiu a doença e/ou que não está apresentando nenhum dos sintomas da doença para prevenir a causa da doença (isto é profilaticamente). O paciente pode ter uma predisposição para ou ser considerado estar em risco de desenvolver a doença.

[00190] O composto pode ser administrado na forma de uma composição farmacêutica. Nesta modalidade, a composição pode adicionalmente compreender carreadores, diluentes ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis como aqui esboçado.

[00191] A presente invenção provê uma comutação OFF adequada a ser usada com terapias de CAR-célula T. O método pode envolver monitorar atividade tóxica no paciente. Assim, se o nível de atividade tóxica se torna muito alta, o método pode envolver administrar um composto capaz de ubiquitina ligase para ligar à proteína de alvejamento de ubiquitina e assim ubiquitinar a sequência de polipeptídeos/CAR, de modo a reduzir os efeitos colaterais tóxicos adversos. As atividades tóxicas incluem, por exemplo, toxicidade imunológica, toxicidade biliar e síndrome da angústia respiratória.

[00192] Similarmente, o método pode envolver monitorar a progressão da doença e depois administrar um composto que medeia a ligação entre a proteína de alvejamento de ubiquitina e uma ubiquitina ligase e assim ubiquitinar a sequência de polipeptídeos/CAR, quando um nível aceitável de progressão de doença é atingido (por exemplo melhora). O nível específico de

progressão de doença determinado ser “aceitável” variará de acordo com as circunstâncias específicas e deve ser avaliado em uma tal base.

[00193] Monitorar a progressão da doença significa avaliar os sintomas associados com a doença com o tempo para determinar se eles estão reduzindo/melhorando ou aumentando/piorando.

[00194] De acordo com um outro aspecto da invenção é provido um composto para inibir o CAR como aqui definido.

[00195] A invenção pode ser descrita em mais detalhes com referência aos seguintes exemplos não limitantes:

EXEMPLO 1: Projeto de receptores de antígeno quimérico que incorporam motivos de ligação de cereblon como uma estratégia para construir um botão molecular de desligar

[00196] Construtos foram planejados para construir um botão de desligar o receptor de antígeno quimérico usando os motivos de ligação de cereblon presentes nos alvos de cereblon humanos tais como Ikaros3, Caseína cinase 1 alfa e GSTP1. Tais construtos visam 1) ser degradados pela adição de moléculas pequenas tais como lenalidomida b) sinalizar como receptores de antígeno quimérico pela ativação do caminho de NFAT na ausência de composto e c) ser desligado pela adição de compostos.

[00197] Experimentos foram planejados para medir a degradação de proteínas GFP contendo regiões de ligação de Ikaros3 ZnF cereblon e a conservação estrutural observada nos sítios de ligação de cereblon de três substratos de proteína Ikaros3 ZNF2, CK1 alfa e GSTP1:

TABELA 3: Sítios de ligação de cereblon

Substrato	ID UniProt	Referência estrutural (Ids PDB)
Ikaros3 ZNF2	Q9UKT9	As entradas de PDB 2MA7 e 2I13 serão usadas como representantes estruturais de Ikaros3 ZnF; 2MA7 com identidade de sequência de 95% quando alinhado aos resíduos 131 a 175 de Ikaros 3 (SEQ ID NO: 8) e 2I13 com identidade de sequência de 53% quando alinhado aos resíduos 131 a 175 de Ikaros 3 (SEQ ID NO: 8). 2I13 será usado como um modelo de Ikaros3 visto que a estrutura é representada por um único modelo experimental.
GSTP1	P15170	5HXB

CK1 alfa	P48729	5FQD
----------	--------	------

[00198] A conservação estrutural dos sítios de ligação de cereblon nos três substratos: Ikaros3, caseína cinase I e GSTP1, foi observado. Entretanto, isto foi na ausência de conservação de sequência (ver as SEQ ID NOs: 2 a 4). Quando os três motivos grampo de cabelo dos substratos são sobrepostos usando átomos da cadeia principal o rmsd overall está em torno de 1,7 Å:

TABELA 4: Matriz de RMSD aos Pares

Cadeias	GSTP1	CK1 alfa	Ikaros3 (de 2I13)
GSTP1		2,04	1,81
CK1 alfa	2,04		1,38
Ikaros3 (de 2I13)	1,81	1,38	

[00199] A sobreposição estrutural mais próxima é observada em torno de um resíduo de glicina central e o rmsd começa a aumentar conforme os resíduos estão localizados longe da glicina central, em particular na direção do terminal C:

TABELA 5: Resíduo de RMSD Individual

GSTP1 vs CK1		GSTP1 vs Ikaros3		CK1 vs Ikaros3	
Par	rmsd	Par	rmsd	Par	rmsd
ILE 35 - VAL 570 :	0,758	LYS 51 - VAL 570 :	0,595	LYS 51 - ILE 35 :	0,348
ASN 36 - ASP 571 :	0,629	CYS 52 - ASP 571 :	0,65	CYS 52 - ASN 36 :	0,386
ILE 37 - LYS 572 :	0,166	PRO 53 - LYS 572 :	0,608	PRO 53 - ILE 37 :	0,556
THR 38 - LYS 573 :	0,22	GLU 54 - LYS 573 :	0,328	GLU 54 - THR 38 :	0,443
ASN 39 - SER 574 :	0,435	CYS 55 - SER 574 :	0,429	CYS 55 - ASN 39 :	0,37
GLY 40 - GLY 575 :	0,208	GLY 56 - GLY 575 :	0,63	GLY 56 - GLY 40 :	0,426
GLU 41 - GLU 576 :	0,245	LYS 57 - GLU 576 :	0,562	LYS 57 - GLU 41 :	0,39
GLU 42 - LYS 577 :	0,477	SER 58 - LYS 577 :	0,431	SER 58 - GLU 42 :	0,051
VAL 43 - SER 578 :	0,733	PHE 59 - SER 578 :	0,974	PHE 59 - VAL 43 :	0,947
ALA 44 - LYS 579 :	4,683	SER 60 - LYS 579 :	4,139	SER 60 - ALA 44 :	2,335
ALA 44 - LYS 579 :	4,683	ASP 61 - THR 580 :	3,15	ASP 61 - VAL 45 :	2,624
LYS 46 - ARG 581 :	5,507	LYS 62 - ARG 581 :	6,03	LYS 62 - LYS 46 :	4,847

[00200] Uma representação alternativa da similaridade estrutural é a dos ângulos de Ramachandran visto que eles descrevem a conformação da cadeia principal de peptídeo. Quando os ângulos de Ramachandran são medidos nestes motivos de ligação de cereblon nós temos (a glicina central está salientada em negrito):

TABELA 6: Ângulos de Ramachandran de motivos grampo de cabelo da ligação de cereblon

CK1			GSTP1			Ikaros3 (2MA7)		
Resíduo	Psi	Phi	Resíduo	Psi	Phi	Resíduo	Psi	Phi
ILE 35	129,7	-125,5	VAL 570	132,4	-149,2	LYS 51	151,5	-102,8
ASN 36	106,9	-70,6	ASP 571	141	-82,1	CYS 52	127,8	-83,5
ILE 37	-14,2	-60,3	LYS 572	-42,5	-79,4	PRO 53	-7,5	-66
THR 38	-18,3	-89,2	LYS 573	-47,1	-52,6	GLU 54	-52,5	-111,7
ASN 39	-3	-152	SER 574	-65,9	-90,8	CYS 55	-16,9	-105,2
GLY 40	-4,3	91,8	GLY 575	-4,8	123,6	GLY 56	-4,9	91,2
GLU 41	131,7	-56,5	GLU 576	104,1	-75,1	LYS 57	127,9	-60,6
GLU 42	133,3	-96,6	LYS 577	169	-52,5	SER 58	148,5	-97,5
VAL 43	169,4	-136,4	SER 578	168,1	-108,3	PHE 59	155,5	-131,2
ALA 44	139,7	-106,3	LYS 579	-59,1	-91,6	SER 60	-32,1	-73,3
VAL 45	112	-127,1	THR 580	169,3	-86,4	ASP 61	161,1	-132,6
LYS 46	125,4	-87,9	ARG 581	156,7	-64,6	LYS 62	-35,3	-69

[00201] A comparação direta das diferenças pode ser facilitada pelo cálculo dos módulos das diferenças nos ângulos, assim se a diferença for 0 a conformação é idêntica e quanto mais alto os valores positivos mais alta é a diferença global na conformação. A comparação aos pares da diferença dos ângulos de Ramachandran (delta) representados como o módulo da diferença angular (ângulo 1 – ângulo 2) é mostrada na Tabela 7:

TABELA 7: Comparação entre os ângulos de Ramachandran

Resíduo	CK1 vs GSTP1		CK1 vs Ikaros		GSTP1 vs Ikaros	
	delta Psi	delta Phi	delta Psi	delta Phi	delta Psi	delta Phi
-5	2,7	23,7	21,8	22,7	19,1	46,4
-4	34,1	11,5	20,9	12,9	13,2	1,4
-3	28,3	19,1	6,7	5,7	35	13,4
-2	28,8	36,6	34,2	22,5	5,4	59,1
-1	62,9	61,2	13,9	46,8	49	14,4
1 (Gly)	0,5	31,8	0,6	0,6	0,1	32,4
2	27,6	18,6	3,8	4,1	23,8	14,5
3	35,7	44,1	15,2	0,9	20,5	45
4	1,3	28,1	13,9	5,2	12,6	22,9
5	198,8	14,7	171,8	33	27	18,3
6	57,3	40,7	49,1	5,5	8,2	46,2
7	31,3	23,3	160,7	18,9	192	4,4

[00202] O resíduo 1 é o resíduo de glicina central. Nesta comparação, está clara a similaridade conformacional de CK1 e Ikaros3 em torno dos resíduos 1 a 4 com diferenças de ângulos Psi < 20° e diferenças de ângulos Phi < 5°. A comparação tanto de CK1 quanto de Ikaros3 com GSTP1 nesta região mostra a mesma tendência conformacional, mas com variações mais altas dos ângulos com variações de Psi < 35° e variações de Phi < 45°. Em todos os casos, as diferenças estruturais tornam-se evidentes em torno da

posição 5 e isto está de acordo com as diferenças de rmsd.

[00203] Com base nos dados disponíveis e na análise estrutural é proposto que o 2º Dedo de Zinco de Ikaros3 deva prover um degron “mínimo” na forma de um domínio de proteína pequeno (em torno de 30 aminoácidos) que pode ser adicionado a uma proteína de interesse para degradação e na presença de um fármaco de imida imunomodulatório (IMiD) a degradação será induzida. Este degron/proteína de alvejamento de ubiquitina pode, portanto, ser incorporado dentro da arquitetura CAR usando métodos conhecidos na técnica de modo a criar um construto de CAR com um “botão de desligar”.

Exemplo 2. Degradação induzida pela proximidade da Proteína Fluorescente Verde (GFP) fundida às sequências de degron derivadas de Ikaros 1 nas células HeLa

[00204] Este exemplo ilustra a degradação seletiva de GFP na presença de lenalidomida. Os construtos de GFP são compostos da sequência codificadora de GFP na estrutura com uma (Glicina-Serina) x ligador N de comprimentos N = 1, 3, 5 seguido por uma sequência de degron derivada de Ikaros 1 humano. Os experimentos foram conduzidos com construtos transfectados em células HeLa e a degradação foi seguida pela citometria de fluxo.

MATERIALS E MÉTODOS

[00205] **Geração de construtos:** Os construtos de GFP foram clonados no vetor pTT5 (Figura 2) fundido a uma sequência de (Glicina-Serina) x ligador N de comprimento N = 1, 3, 5 e Ikaros 1 humano (IKFZ1, Uniprot Q13422) contendo os resíduos 141 a 168 (SEQ ID NO: 27). Os detalhes completos de sequência dos construtos são dados abaixo.

CONSTRUTO 1 (SEQ ID NO: 30)

MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFI
CTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYV

QERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKL
EYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPI
GDGPVLLPDNHILSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDE
LYKGSGERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS

Legenda:

GFP

Ligador 4 (SEQ ID NO: 26)

Resíduos Ikaros 1 de 141 a 168 (Uniprot Q13422) (SEQ ID NO: 27)

Sequência de DNA do CONSTRUTO 1 (SEQ ID NO: 31)

ATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG
 GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC
 GGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG
 TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCG
 TGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGA
 CCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGG
 CTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA
 CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAA
 CCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACAT
 CCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTA
 TATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAA
 GATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCA
 CTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCC
 CGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC
 CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGC
 CGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGTTCAGG
 AGAACGGCCCTTCCAGTGCAATCAGTGCGGGGCCTCATTACCCA
 GAAGGGCAACCTGCTCCGGCACATCAAGCTGCATTCC

CONSTRUTO 2 (SEQ ID NO: 32)

MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFI

CTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYV
QERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKL
EYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPI
GDGPVLLPDNHILSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDE
LYKGS GSGSGERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS

Legenda:

GFP

Ligador 1 (SEQ ID NO: 23)

Ikaros 1 resíduos 141 a 168 (Uniprot Q13422) (SEQ ID NO: 27)

Sequência de DNA do CONSTRUTO 2 (SEQ ID NO: 33)

ATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG
 GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC
 GGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG
 TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCG
 TGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGA
 CCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGG
 CTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA
 CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGGCGACACCCTGGTGAA
 CCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACAT
 CCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTA
 TATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAA
 GATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCA
 CTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCC
 CGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC
 CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGC
 CGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGTTCAGG
 TTCAGGTTCAGGAGAACGGCCCTTCCAGTGCAATCAGTGCGGGGC
 CTCATTCACCCAGAAGGGCAACCTGCTCCGGCACATCAAGCTGCA
 TTCC

CONSTRUTO 3 (SEQ ID NO: 34)

MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFI
CTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYV
QERTIFFKDDGNYKTRAIEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKL
EYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPI
GDGPVLLPDNHILSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDE
LYKGSGSGSGSGSGGERPFQCNCQCGASFTQKGNLLRHIKLHS

Legenda:

GFP

Ligador 2 (SEQ ID NO: 24)

Ikaros 1 resíduos 141 a 168 (Uniprot Q13422) (SEQ ID NO: 27)

Sequência de DNA do CONSTRUTO 3 (SEQ ID NO: 35)

ATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG
 GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC
 GGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG
 TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCG
 TGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGA
 CCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGG
 CTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA
 CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAA
 CCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACAT
 CCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTA
 TATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAA
 GATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCA
 CTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCC
 CGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC
 CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGC
 CGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGTTCAGG
 TTCAGGTTCAGGTTCAGGTTCAGGAGAACGGCCCTTCCAGTGCAAT

CAGTGCGGGGCCTCATTACCCAGAAGGGCAACCTGCTCCGGCAC
ATCAAGCTGCATTCC

[00206] **Transfecção de células HeLa com CONSTRUTOS 1, 2 e 3 e tratamento com lenalidomida:** Células HeLa Ohio cultivadas em EMEM (EBSS) + 2 mM de Glutamina + 1% de Aminoácidos Não Essenciais (NEAA) + 10% de Soro Bovino Fetal (FBS) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado por calor (Gibco) e 50 U/mL de penicilina + 50 µg/mL de estreptomicina (Gibco) foram transfectadas com 0,5 µg de plasmídeo de construto usando o reagente Lipofectamina 2000 (Thermofisher). Depois da transfecção, as células foram incubadas a 37°C em um incubador com CO₂ durante 24 horas. A lenalidomida foi reconstituída a 10 mM em 100% de DMSO e diluída para 1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM e 0,05 mM em 100% de DMSO. A lenalidomida foi adicionada ao meio de célula a uma concentração final de 10 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,1 µM e 0,01 µM e a quantidade de DMSO correspondente para o controle sem nenhum composto. A concentração final de DMSO em todas as condições foi de 0,1%. Depois do tratamento com lenalidomida, as células foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ durante 24 horas. A expressão de GFP foi medida pela citometria de fluxo com um iQue (Intellicyt) e os dados analisados usando ForeCyt (Intellicyt).

RESULTADOS

A degradação induzida pela lenalidomida de GFP codificado nos CONSTRUTOS 1, 2 e 3 foi avaliada pela medição da intensidade de fluorescência média (MFI) de células positivas em GFP. O efeito da lenalidomida sobre o nível de expressão de GFP é apresentada na Figura 3.

Exemplo 3: Degradação induzida pela proximidade de construtos de receptor de antígeno quimérico (CAR) transfectados em células Jurkat

[00207] Este exemplo ilustra a degradação seletiva de construtos de CAR na presença de lenalidomida. Os experimentos foram conduzidos pela transfecção dos construtos de CAR em células Jurkat.

MATERIAIS E MÉTODOS

[00208] **Geração de construtos:** Dois construtos foram gerados para avaliar o efeito da lenalidomida sobre a regulação dos níveis de expressão de um receptor (CAR). O CONSTRUTO 4 é um CAR convencional com um scFv de reconhecimento de antígeno que se liga ao e é ativado pelo antígeno de maturação de célula B BCMA (Uniprot Q02223). O scFv é seguido pela dobradiça CD8 α humana e domínio de transmembrana, 4-1BB humana coestimuladora e os domínios intracelulares de CD3 ζ humana (Figura 1). O CONSTRUTO 5 contém os mesmos elementos de CONSTRUTO 4 mais a adição na extremidade de terminal C de duas seções da proteína Ikaros 3 humana (Uniprot Q9UKT9). A primeira seção compreende os resíduos 131 a 175 (SEQ ID NO: 27) e é seguida por uma seção contendo os resíduos 231 a 249 (SEQ ID NO: 28). Os detalhes da sequência completa dos construtos são dados abaixo.

CONSTRUTO 4 (SEQ ID NO: 36)
MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKG
SGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWIGATYRGHSDTYYNQKFKGRAT
LTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRGAIYDGYDVLNWDGQGT
LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT
CSASQDISNILNWYQQKPGKAPKLLIYYTSNLSHSGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQYRKLPWTFGQGTKLEIKRFVPVFLPAKPTT
TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP
LAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGONOLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELOKDKMAEAYSEIGM
KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Legenda:

Peptídeo de sinal CD8 α (Uniprot P01732) (SEQ ID NO: 22)

Fv de cadeia única Anti-BCMA (SEQ ID NO: 29)

Dobradilha CD8 α (Uniprot P01732) e região de transmembrana (SEQ ID NO: 19)

domínio coestimulador 4-1BB (SEQ ID NO: 21)

Domínio CD3 ζ (Uniprot P20963) (SEQ ID NO: 20)

Sequência de DNA do CONSTRUTO 4 (SEQ ID NO: 37)

ATGGCCCTGCCCCGTGACCGCCCTCCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGC
TGCACGCCGCCAGGCCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGAGCGGGGCCG
AGGTGAAGAAGCCCCGGCAGCTCCGTGAAAGTGAGCTGCAAGGGC
AGCGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAG
GCCCCCGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCGCCACCTACAGGGGC
CACAGCGACACCTACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACC
CTGACCGCCGACACTAGCACCCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGC
TCACTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGGGGC
GCCATCTACGACGGCTACGACGTGCTGGACAAGTGGGGCCAGGGC
ACCCTGGTGACAGTGAGCTCTGGCGGGCGGCGGGAGCGGCGGCGGC
GGAAGCGGCGGCGGAGGAAGCGGCGGCGGCGGAAGCGATATCCA
GATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAG
GGTGACCATCACCTGCAGCGCAAGCCAGGACATCAGCAACTACCT
GAACTGGTACCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCCTAAGCTGCTGAT
CTACTACACCTCTAACCTGCACAGCGGCGTGCCCAGCAGGTTCTCT
GGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACTCTGACCATCAGCAGCCTCC
AGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGGAAGC
TCCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGCT
TCGTGCCCCGTGTTCTCCCCGCAAAACCCACCACCTCCCGCCCC
CAGACCCCCCACTCCCGCCCCAACAATTGCCAGCCAGCCCCTGAG
CCTGAGGCCCCGAGGCTTGTAAGGCCCGCCGCTGGCGGGCGCCGTCCA
CACCAGGGGCCTGGACTTCGCCTGCGACATCTATATCTGGGCCCCC
CTGGCCGGAACCTGCGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTGATCACCC
TGTACTGCAACCACAGGAACAAGAGGGGGCAGGAAGAAGCTCCTGT

ACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGAGGCCCGTGCAGACCACCCAGG
 AGGAGGACGGCTGCAGCTGCAGGTTCCCAGAGGAAGAGGAGGGC
 GGGTGCGAACTGAGAGTGAAATTTAGCAGGAGCGCCGACGCCCCC
 GCCTATCAGCAAGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTCAACCTG
 GGCAGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGGGGCAG
 AGATCCCGAGATGGGCGGCAAGCCCAGGAGGAAGAATCCCCAGG
 AGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCT
 ACAGCGAGATCGGCATGAAGGGGGAGAGGAGGAGGGGGCAAGGGC
 CACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACC
 TACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCCCAGG

CONSTRUTO 5 (SEQ ID NO: 38)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGS
GYFTNYWMHWVRQAPGQGLEWIGATYRGHSDTYYNQKFGRATLT
ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRGAIYDGYDVLNWDWGQGLT
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS
ASQDISNILNWYQQKPGKAPKLLIYYTSNLSHGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQYRKLPWTFGQGTKLEIKRFVPVFLPAKPTTTP
APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA
GTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG
CSCRFPEEEEGGCELGGGGSRVKFSRSADAPAYQOQONQLYNELNLG
RREEYDVLDRRRGRDPKMGKPRRKNPQEGLYNELOKDKMAEAYS
EIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMOALPPRGGGGSN
VLMVHKRSHTGERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHTGEKPFKDPG
DTASAEARHIKAEMG

Legenda:

Peptídeo de sinal CD8 α (Uniprot P01732) (SEQ ID NO: 22)

Fv de cadeia única Anti-BCMA (SEQ ID NO: 29)

dobradiça CD8 α (Uniprot P01732) e região de transmembrana (SEQ ID NO: 19)

Domínio coestimulador 4-1BB (SEQ ID NO: 21)

Domínio CD3ζ (Uniprot P20963) (SEQ ID NO: 20)

Ligador 3 (SEQ ID NO: 25)

Ikaros 3 resíduos 131 a 175 (Uniprot Q9UKT9) (SEQ ID NO: 8)

Ikaros 3 resíduos 231 a 249 (Uniprot Q9UKT9) (SEQ ID NO: 28)

Sequência de DNA do CONSTRUTO 5 (SEQ ID NO: 39)

ATGGCTCTTCCTGTAACCGCACTTCTGCTTCCTCTTGCTCTGCTGCT
TCATGCTGCTAGACCTCAGGTGCAGTTAGTGCAATCTGGAGCTGAG
GTGAAGAAACCTGGCTCTTCCGTGAAAGTGAGCTGTAAGGGAAGC
GGCTACACCTTTACCAACTACTGGATGCATTGGGTGAGACAGGCC
CCTGGACAGGGATTAGAGTGGATTGGAGCCACATATAGAGGACAC
AGCGATACCTACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACCCTT
ACAGCCGATACAAGCACATCTACCGCCTACATGGAACTGTCTTCTC
TGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCACAAGAGGAGCCA
TCTACGACGGCTATGATGTTCTGGACAATTGGGGACAGGGCACAC
TGGTGACAGTGTCTTCTGGTGGTGGCGGGTCCGGTGGAGGCGGAT
CTGGCGGTGGGGGCTCCGGAGGAGGAGGTTTCAGATATTCAAATGA
CACAGAGCCCAAGCAGCCTGTCTGCTTCTGTGGGCGATAGAGTGA
CCATCACCTGTTCTGCTTCTCAGGATATCAGCAACTACCTGAACTG
GTACCAGCAGAAGCCCGGCAAAGCCCCCTAAACTGCTGATCTACTA
CACCAGCAATCTGCACTCTGGAGTTCCTAGCAGATTCAGCGGAAG
CGGCTCTGGCACCGATTTTACACTGACCATCTCTTCTCTGCAGCCT
GAGGATTTTGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACCGGAAATTGCCTT
GGACCTTTGGACAGGGAACCAAGCTGGAGATCAAGAGGTTTGTGC
CCGTGTTTCTGCCTGCTAAGCCTACAACAACACCTGCCCCCTAGACC
ACCTACACCTGCTCCTACAATTGCCTCTCAGCCTCTTTCTCTGAGAC
CTGAAGCTTGCAGACCTGCTGCTGGAGGAGCTGTGCATACAAGAG
GACTGGATTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCTCCACTGGCCGG
CACATGTGGAGTTCTTCTGCTGTCTCTGGTGATCACCTGTACTGT

AATCACAGGAACAAGCGGGGCGGAAAAAGCTGCTGTACATCTTC
 AAGCAGCCCTTCATGAGACCAGTTCAGACAACACAGGAGGAGGAC
 GGCTGTAGCTGCAGATTTCTGAGGAAGAGGAAGGAGGATGTGAA
 TTAGGTGGTGGCGGGAGCAGGGTGAAGTTCTCACGCAGCGCAGAT
 GCTCCTGCCTATCAGCAAGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTG
 AATCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGATGTGCTGGACAAGAGAAG
 GGGCAGAGATCCTGAAATGGGAGGAAAGCCCAGAAGGAAGAACC
 CTCAAGAAGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCG
 AGGCCTATAGCGAGATTGGCATGAAAGGAGAGAGGAGAAGAGGA
 AAGGGCCATGATGGCCTGTATCAGGGCCTGTCTACAGCCACCAAG
 GATACATATGATGCCCTGCATATGCAGGCTTTACCCCCTAGAGGAG
 GAGGCGGATCTAACGTGCTGATGGTGCATAAAAGAAGCCACACAG
 GAGAGAGACCATTCCAGTGCAACCAGTGTGGAGCCAGCTTCACCC
 AGAAGGGAAATCTGCTGAGACACATCAAACCTGCATACAGGCGAGA
 AGCCCTTCAAGGACCCTGGCGATACAGCCTCTGCTGAAGCTAGAC
 ACATTAAAGCCGAAATGGGC

[00209] **Expressão de construtos em células Jurkat:** As células NFAT-luc2 Jurkat (Promega) a uma densidade de 2×10^5 células/ml foram cultivadas em meio RPMI 1640 (1x) sem L-glutamina com vermelho de fenol (Gibco), 10% (v/v) de Soro Bovino Fetal (FBS) Inativado por Calor (Gibco), 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais em meio essencial mínimo (MEM NEAA) (ThermoFisher), 1% (v/v) de Piruvato de Sódio (Sigma), 1% (v/v) de L-Glutamina (Gibco). 20 µg de DNA de plasmídeo foram misturadas com 8×10^6 células NFAT-luc2 Jurkat e as células foram transfectadas usando o 4D-Nucleofector (Lonza) com o kit de célula Line SE Nucleofector (Lonza) seguindo-se as instruções do fabricante com programa CL-120. As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 48h. Lenalidomida em uma concentração de estoque de 10 mM em 100% de DMSO foi diluída em meio de Jurkat para se obter uma concentração de estoque de 250 µM. Usando o

estoque de 250 μM , células NFAT-luc2 Jurkat foram incubadas em uma concentração de composto final de 10 μM ou 0 μM (DMSO em meio) durante 24 horas a 37°C com 5% de CO_2 . A concentração de DMSO final foi 0,1% em todos os poços. As células foram depois tingidas com BCMA-Fc conjugado com AlexaFluor 647 para rotular o CAR anti-BCMA. As medições foram feitas usando um Cytoflex S (Beckman Coulter) e os dados analisados usando FlowJo.

RESULTADOS

[00210] A Figura 5 apresenta o efeito de tratamento com lenalidomida sobre o nível de expressão de moléculas CAR na superfície de células Jurkat. O CONSTRUTO 4, que não conteve nenhuma sequência de degron não foi afetado pelo composto enquanto a expressão do CONSTRUTO 5 é reduzida pela adição de 10 μM de lenalidomida.

Exemplo 4. Degradação induzida pela proximidade de construtos de receptor de antígeno quimérico (CAR) em células T primárias. Efeito de lenalidomida sobre a liberação de citocina.

[00211] Este exemplo demonstra que CAR contendo sequências de degron são funcionais nas células T primárias e são degradadas pela adição de lenalidomida.

MATERIAIS E MÉTODOS

[00212] Para a produção de vetor lentiviral, 3,0 x 10⁷ células LentiX 293T (HEK 293T) foram semeados em 20 mL de DMEM (Gibco) e foram incubadas durante a noite a 37°C com 5% de CO_2 . As células LentiX foram transfectadas misturando-se, por exemplo, 21 μg de vetor de transferência contendo o construto, 3,75 μg de ViraSafe pRSV-Rev, 5,25 μg de ViraSafe pCMV-VSVG, 7,5 μg de ViraSafe pCgp V- (gag-pol), 75 μg de jetPRIME (Polyplus) e 1500 μg de Tampão jetPRIME (Polyplus). Depois de 2 dias, os sobrenadantes foram clarificados e o vírus foi concentrado e purificado pela ultracentrifugação sobre uma almofada de sacarose a 20% usando sacarose

Ultracore (ThermoFisher) em tubos de ultracentrifugação Oak Ridge PPCO de 50 ml (ThermoFisher). Os vetores lentivirais foram produzidos para o CONSTRUTO 4 e CONSTRUTO 5 usando o método descrito acima.

[00213] As células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) dos sangues frescos de três doadores humanos saudáveis foram isoladas pela centrifugação em gradiente de densidade em tubos Accuspin (Sigma) contendo 15 mL de Histopaque-1077 (Sigma) e seguindo as instruções do fabricante. As células foram recolocadas em suspensão a 1×10^6 células/mL em meio TEXMacs (Miltenyi Biotec) contendo 100 unidades/mL de IL-2 (Sigma) e grânulos TransAct (Miltenyi Biotec) e incubadas durante 48h a 37°C com 5% de CO₂.

[00214] As células T dos três doadores foram depois transduzidas com os vetores lentivirais codificando o CONSTRUTO 4 e CONSTRUTO 5. As reações de transdução foram preparadas para se alcançar um MOI de 5. As células T foram cultivadas em meio TEXMacs com 100 unidades/mL de IL-2, meio fresco foi adicionado a cada 3 dias. As células ARH-77-10B5, que expressam um alto nível do antígeno BCMA, foram cultivadas em meio Jurkat (descrito no **Exemplo 3**) mais 1 mg/mL de G418 (Gibco) a 37°C com 5% de CO₂.

[00215] 7 dias depois da transdução, lenalidomida em uma concentração de estoque de 10 mM em 100% de DMSO foi diluída em meio TEXMacs para se obter uma concentração de estoque de 250 µM e 5×10^4 células T foram incubadas em uma concentração de composto final de 10 µM ou 0 µM (DMSO em meio) durante 16 h a 37°C com 5% de CO₂. As células T foram depois cocultivadas (5×10^5 células por reservatório, razão de efetor:alvo de 1:1) com células ARH-77-10B5 (células positivas em BCMA) ou meio durante 24 h em meio TEXMacs contendo 10 µM ou 0 µM (DMSO em meio) a 37°C com 5% de CO₂. A concentração de DMSO final foi de 0,1% em todos os poços. As células foram peletizadas (1200 rpm, 5 min) e os

sobrenadantes foram coletados. Os sobrenadantes foram analisados quanto aos níveis de citocina usando o Kit MSD V-plex Proinflamatório Painel 1 Humano (MSD) e MSD Sector Imager (MSD).

RESULTADOS

[00216] O efeito de tratamento com lenalidomida nos níveis de expressão dos CONSTRUTOS 4 e 5 nas células T primárias transduzidas é mostrado na Figura 6. Depois da apresentação de antígeno, os sobrenadantes de célula T foram analisados quanto aos seus níveis de $TNF\alpha$, IL2 e $IFN-\gamma$. Os sobrenadantes correspondendo ao CONSTRUTO 4, um construto de CAR sem domínio de degron, mostrou níveis aumentados de concentrações de citocinas quando comparado com nenhum tratamento com lenalidomida em linha com os dados publicados (Otahal P *et al.* 2016 Oncoimmunology Vol. 5, No. 4), Figura 7. Este efeito também foi observado para células transduzidas com CONSTRUTO 5 (CAR mais elementos degron) mas em um grau reduzido quando comparado com o CAR de controle (CONSTRUTO 4), Figura 7.

[00217] Será entendido que as modalidades aqui descritas podem ser aplicadas em todos os aspectos da invenção. Além disso, todas as publicações, incluindo, mas não limitadas às patentes e pedidos de patente, citadas neste relatório descritivo são aqui incorporadas por referência como se totalmente apresentadas.

SEQUÊNCIAS

Estrutura	Sequência	SEQ ID NO.
Sequência de consenso de motivo de ligação estrutural	$X_1X_2X_3X_4X_5GX_7X_8X_9X_{10}$	1
Ikaros 3 (ZFN2) alça de ligação	QCGASFT	2
GSPT1 alça de ligação	VDKKSGEKSK	3
CK1 alfa alça de ligação	INITNGEEVA	4
ZFP91 alça de ligação	LQCEICGFTCR	5
Ikaros3 (141-173)	TGERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHSTGEKP	6
Ikaros3 (141-173) mais etiqueta Ub	TGERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHTGEKPST7DPGDTASAEARHIKAEMG	7
Ikaros3 (131-175) (Uniprot Q9UKT9)	NVLMVHKRSHTGERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHTGEKPFK	8

Ikaros3 (131-175) mais etiqueta Ub (Ikaros 3 resíduos 231-249 (Uniprot Q9UKT9))	NVLMVHKRSHTGERPFQCNQCGASFTQKGNLLR 9	
Ikaros3 (117-249)	KMNCDVCGLSCISFNVLMVHKRSHTGERPFQCNQ10 CGASFTQKGNLLRHIKLHTGEKPFKCHLCNYACQ RRDALTGHLRTHSVEKPYKCEFCGRSYKQRSSLE EHKERCRTFLQSTDPGDTASAEARHIKAEMG	
GSTP1 (388-499)	HSGRTFDAQIVIIIEHKSIIICPGYNAVLHIHTCIEEVEI11 TALICLVKKSGEKSSTRPRFVKQDQVCIARLRTA GTICLETFKDFPQMGRFTLRDEGKTIAIGKVLKLV PEKD	
GSTP1 (388-499) F471S/M474S	HSGRTFDAQIVIIIEHKSIIICPGYNAVLHIHTCIEEVEI12 TALICLVKKSGEKSSTRPRFVKQDQVCIARLRTA GTICLETFKDSPQSGRFTLRDEGKTIAIGKVLKLV EKD	
CK1 alfa (8-94)	KAEFIVGGKYKLVRKIGSGSFGDIILAINITNGEEV 13 AVKLESQKARHPQLLYESKLYKILQGGVGIPHIRW YGQEKDYNVLMVMDLLG	
CK1 alfa (8-94) L63H/L67Q/I73Q	KAEFIVGGKYKLVRKIGSGSFGDIILAINITNGEEV 14 AVKLESQKARHPQLLYESKHYKIQGGVGQPHIR WYGQEKDYNVLMVMDLLG	
Sequência de consenso de motivo de ligação estrutural expandida	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ GX ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ 15	
Etiqueta de ubiquitinação sequência de transmembrana de CD8α RN	STDPGDTASAEARHIKAEMG 16 deTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNH 17	
sequência de dobradiça de CD8α (Uniprot P01732)	deFVPVFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC 18 RPAAGGAVH	
sequência dobradiça transmembrana CD8α (Uniprot P01732)	eFVPVFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC 19 RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL SLVITLYCNHRN	
Domínio CD3ζ (Uniprot P20963)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD 20 VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	
domínio coestimulador 4- 1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE21 EEGGCEL	
Sequência de sinal CD8α (Uniprot P01732)	MALPVTALLLPLALLLHAARP 22	
Ligador 1	GSGSGS 23	
Ligador 2	GSGSGSGSGS 24	
Ligador 3	GGGGS 25	
Ligador 4	GS 26	
Ikaros 1 resíduos 141-168 (Uniprot Q13422)	GERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS 27	
Ikaros 3 resíduos 231-249 (Uniprot Q9UKT9)	DPGDTASAEARHIKAEMG 28	
Sequência de Aminoácido de Fv de cadeia única Anti-BCMA (Uniprot Q02223)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGYTFTNYW 29 MHWVRQAPGQGLEWIGATYRGHSDTYYNQKFK GRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRG AIYDGYDVLNHWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSAS QDISNILNWYQQKPGKAPKLLIYYTSNLHSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYRKLPLW TFGQGTKLEIKR	

Construto 1 Sequência de Aminoácido	MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSgege 30 GDATYGKLTlkFIcTTGKLpVpWpTLVTTlTYGV QCFsRYPdHMKQHdFFKSAMpEGYVqERTiFFKD DGNYKTRAEVKfEGDTLVNRIELKGIDfKEDGNIL GHKLEYNYNshNVYIMADKQKNGIKVNFkIRHNI EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHILSTQSA LSKDPNEKRdHmVLLefVTAAGITLGMdELYKGS GERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHikLHS
Construto 1 Sequência de DNA	ATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGT 31 GGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGT AAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC CTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCC GTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACC TACGGCGTGcAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGAC CACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCC ATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGC GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGT GAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGG AGTACAACtACAACAGCCACAACGTCTATATCA TGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTG AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC AGCGTGcAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCC GACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTG AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT GGTcCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGAT CACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGTTC AGGAGAAcGGCCCTTCCAGTGCAATCAGTGCGG GGCCTCATTCACCCAGAAGGGCAACCTGCTCCG GCACATCAAGCTGCATTCC
Construto 2 Sequência de Aminoácido	MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSgege 32 GDATYGKLTlkFIcTTGKLpVpWpTLVTTlTYGV QCFsRYPdHMKQHdFFKSAMpEGYVqERTiFFKD DGNYKTRAEVKfEGDTLVNRIELKGIDfKEDGNIL GHKLEYNYNshNVYIMADKQKNGIKVNFkIRHNI EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHILSTQSA LSKDPNEKRdHmVLLefVTAAGITLGMdELYKGS GSGSGERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHikLHS
Construto 2 Sequência de DNA	ATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGT 33 GGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGT AAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC CTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCC GTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACC TACGGCGTGcAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGAC CACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCC ATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGC GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGT GAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGG AGTACAACtACAACAGCCACAACGTCTATATCA TGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTG AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC AGCGTGcAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCC GACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTG AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT GGTcCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGAT

CACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGTTC
 AGGTTTCAGGTTTCAGGAGAACGGCCCTTCCAGTG
 CAATCAGTGCGGGGCCTCATTCACCCAGAAGGG
 CAACCTGCTCCGGCACATCAAGCTGCATTCC
 Construto 3 Sequência deMSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGE 34
 Aminoácido
 GDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYG
 QCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKD
 DGNKYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNIL
 GHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI
 EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHILSTQSA
 LSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKGS
 GSGSGSGSERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKHL
 S
 Construto 3 Sequência deATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGT 35
 DNA
 GGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGT
 AAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG
 GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC
 CTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCC
 GTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACC
 TACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGAC
 CACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCC
 ATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC
 TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGC
 GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGT
 GAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
 GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGG
 AGTACAACACTAACAGCCACAACGTCTATATCA
 TGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTG
 AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC
 AGCGTGCACTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC
 ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCC
 GACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTG
 AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
 GGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGAT
 CACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGTTC
 AGGTTTCAGGTTTCAGGTTTCAGGTTTCAGGAGAACG
 GCCCTTCCAGTGCAATCAGTGCGGGGCCTCATT
 CACCCAGAAGGGCAACCTGCTCCGGCACATCAA
 GCTGCATTCC
 Construto 4 Sequência deMALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKK36
 Aminoácido
 PGSSVKVSCCKSGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLE
 WIGATYRGHSPTYNQKFKGRATLTADTSTSTAY
 MELSSLRSEDYVYYCTRGAIYDGYDVLNWDGQ
 GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT
 QSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNILNWDYQKP
 GKAPKLLIYYTSLNLSHGVPSRFSGSGSGTDFLTIS
 SLQPEDFATYYCQYRKLPTWTFGQGTKLEIKRFV
 PVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRP
 AAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL
 VITLYCNHRNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE
 EDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG
 QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGMPGPK
 RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
 GKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Construto 4 Sequência de DNA 37

ATGGCCCTGCCCCGTGACCGCCCTCCTGCTGCCC
 CTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCCAGGCCCCAG
 GTCCAGCTGGTGCAGAGCGGGCCGAGGTGAA
 GAAGCCCGGCAGCTCCGTGAAAGTGAGCTGCA
 AGGGCAGCGGCTACACCTTCACCAACTACTGGA
 TGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGACAGGGA
 CTGGAGTGGATCGGCGCCACCTACAGGGGCCAC
 AGCGACACCTACTACAACCAGAAGTTCAAGGG
 CAGGGCCACCCTGACCGCCGACACTAGCACCAG
 CACCGCCTACATGGAAGTGAAGTCAAGGG
 CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGGGG
 CGCCATCTACGACGGCTACGACGTGCTGGACAA
 CTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGAGCTC
 TGGCGGCGGCGGGAGCGGCGGCGGCGGAAGCG
 GCGGCGGAGGAAGCGGCGGCGGCGGAAGCGAT
 ATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC
 GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGC
 AGCGCAAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAA
 CTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTA
 AGCTGCTGATCTACTACACCTCTAACCTGCACA
 GCGGCGTGCCCAGCAGGTTCTCTGGCAGCGGCT
 CCGGCACCGACTTCACTCTGACCATCAGCAGCC
 TCCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCC
 AGCAGTACAGGAAGCTCCCCTGGACCTTCGGCC
 AGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGCTTCGTGC
 CCGTGTTCTCCCCGCAAAACCCACCACCACTC
 CCGCCCCCAGACCCCCCACTCCCGCCCCAACAA
 TTGCCAGCCAGCCCCCTGAGCCTGAGGCCCCGAGG
 CTTGTAGGCCCCGCCGCTGGCGGCGCCGTCCACA
 CCAGGGGCCTGGACTTCGCCTGCGACATCTATA
 TCTGGGGCCCCCTGGCCGGAACCTGCGGCGTGC
 TGCTGCTGAGCCTGGTGATCACCTGTACTGCA
 ACCACAGGAACAAGAGGGGCAGGAAGAAGCTC
 CTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGAGGCCC
 GTGCAGACCACCCAGGAGGAGGACGGCTGCAG
 CTGCAGGTTCCCAGAGGAAGAGGAGGGCGGGT
 GCGAACTGAGAGTGAAATTTAGCAGGAGCGCC
 GACGCCCCCGCCTATCAGCAAGGCCAGAACCA
 GCTGTACAACGAGCTCAACCTGGGCAGGAGGG
 AGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGGGGC
 AGAGATCCCCGAGATGGGCGGCAAGCCCAGGAG
 GAAGAATCCCCAGGAGGGCCTGTACAACGAGC
 TGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGC
 GAGATCGGCATGAAGGGGGAGAGGAGGAGGGG
 CAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGA
 GCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGC
 ACATGCAGGCCCTGCCCCCAGG

Construto 5 Sequência de Aminoácido 38

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKK38
 PGSSVKVSCKSGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLE
 WIGATYRGHSDTYYNQKFKGRATLTADTSTSTAY
 MELSSLRSEDVAVYYCTRGAIYDGYDVLNWDGQ
 GTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT
 QSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNILNWYQQKP
 GKAPKLLIYYTSNLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
 SLQPEDFATYYCQYRKLPWTFGQGTKLEIKRFV
 PVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP
 AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL
 VITLYCNHRNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE
 EDGCSRFPEEEEGGCELGGGGSRVKFSRSADAP
 AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
 MGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMK
 GERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP

PRGGGGSNVLMVHKRSHTGERPFQCNQCGASFT
QKGNLLRHIKLHTGEKPFKDPGDTASAEARHIKA
EMG

Construto 5 Sequência deATGGGCTCTTCCTGTAACCGCACTTCTGCTTCCTC 39
DNA

TTGCTCTGCTGCTTCATGCTGCTAGACCTCAGGT
GCAGTTAGTGCAATCTGGAGCTGAGGTGAAGA
AACCTGGCTCTTCCGTGAAAGTGAGCTGTAAGG
GAAGCGGCTACACCTTTACCAACTACTGGATGC
ATTGGGTGAGACAGGCCCTGGACAGGGATTA
GAGTGGATTGGAGCCACATATAGAGGACACAG
CGATACCTACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAG
GGCCACCCTTACAGCCGATAACAAGCACATCTAC
CGCCTACATGGAAGTGTCTTCTCTGAGAAGCGA
GGATACCGCCGTGTACTACTGCACAAGAGGAGC
CATCTACGACGGCTATGATGTTCTGGACAATTG
GGGACAGGGCACACTGGTGACAGTGTCTTCTGG
TGGTGGCGGGTCCGGTGGAGGCGGATCTGGCG
GTGGGGGCTCCGGAGGAGGAGGTTTCAGATATTC
AAATGACACAGAGCCCAAGCAGCCTGTCTGCTT
CTGTGGGCGATAGAGTGACCATCACCTGTTCTG
CTTCTCAGGATATCAGCAACTACCTGAACTGGT
ACCAGCAGAAGCCCGGCAAAGCCCTAAACTG
CTGATCTACTACACCAGCAATCTGCACTCTGGA
GTTCCCTAGCAGATTGAGCGGAAGCGGCTCTGGC
ACCGATTTTACACTGACCATCTCTTCTCTGCAGC
CTGAGGATTTTGCCACCTACTACTGCCAGCAGT
ACCGGAAATTGCCTTGGACCTTTGGACAGGGAA
CCAAGCTGGAGATCAAGAGGTTTGTGCCCCGTGT
TTCTGCCTGCTAAGCCTACAACAACACCTGCCC
CTAGACCACCTACACCTGCTCCTACAATTGCCT
CTCAGCCTCTTTCTCTGAGACCTGAAGCTTGCA
GACCTGCTGCTGGAGGAGCTGTGCATACAAGAG
GACTGGATTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGG
CTCCACTGGCCGGCACATGTGGAGTTCTTCTGC
TGTCTCTGGTGATCACCTGTACTGTAATCACA
GGAACAAGCGGGGCCGAAAAAGCTGCTGTAC
ATCTTCAAGCAGCCCTTCATGAGACCAGTTCAG
ACAACACAGGAGGAGGACGGCTGTAGCTGCAG
ATTCCTGAGGAAGAGGAAGGAGGATGTGAAT
TAGGTGGTGGCGGGAGCAGGGTGAAGTTCTCAC
GCAGCGCAGATGCTCCTGCCTATCAGCAAGGCC
AGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGCA
GAAGAGAGGAGTACGATGTGCTGGACAAGAGA
AGGGGCAGAGATCCTGAAATGGGAGGAAAGCC
CAGAAGGAAGAACCCTCAAGAAGGCCTGTACA
ATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCC
TATAGCGAGATTGGCATGAAAGGAGAGAGAGAG
AAGAGGAAAGGGCCATGATGGCCTGTATCAGG
GCCTGTCTACAGCCACCAAGGATACATATGATG
CCCTGCATATGCAGGCTTTACCCCCTAGAGGAG
GAGGCGGATCTAACGTGCTGATGGTGCATAAAA
GAAGCCACACAGGAGAGAGACCATTCCAGTGC

AACCAGTGTGGAGCCAGCTTCACCCAGAAGGG
AAATCTGCTGAGACACATCAAACCTGCATACAGG
CGAGAAGCCCTTCAAGGACCCTGGCGATACAGC
CTCTGCTGAAGCTAGACACATTAAAGCCGAAAT
GGGC

REIVINDICAÇÕES

1. Método para controlar o nível de uma sequência de polipeptídeos, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) administrar uma proteína de fusão compreendendo a dita sequência de polipeptídeos e uma proteína de alvejamento de ubiquitina consistindo em menos do que 135 aminoácidos no comprimento que compreenda o motivo de grampo de cabelo de um sítio de ligação de cereblon, e

b) controlar o nível da sequência de polipeptídeos pela administração de um composto que medeia a ligação da proteína de alvejamento de ubiquitina e cereblon.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o motivo de grampo de cabelo compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 2 a 5 ou uma variante funcional das mesmas, em que um ou dois aminoácidos podem ser substituídos, adicionados ou deletados exceto para o resíduo de GLY presente em cada sequência de aminoácido.

3. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de que o motivo de grampo de cabelo compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 2 a 5.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a proteína de alvejamento de ubiquitina é uma sequência de polipeptídeos consistindo em menos do que 100 aminoácidos no comprimento.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a proteína de alvejamento de ubiquitina compreende um resíduo de lisina que atua como um sítio de ubiquitinação.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a proteína de alvejamento de ubiquitina

compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 6 a 14 e 27.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a sequência de polipeptídeos controlada pela administração de um composto que medeia a ligação da proteína de alvejamento de ubiquitina e cereblon é uma proteína de transmembrana.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a sequência de polipeptídeos controlada pela administração de um composto que medeia a ligação da proteína de alvejamento de ubiquitina e cereblon é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o composto é um fármaco de imida imunomodulatório (IMiD).

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o IMiD é selecionado de talidomida, lenalidomida, pomalidomida ou um derivado funcional ou análogo das mesmas.

11. Receptor de antígeno quimérico (CAR), caracterizado pelo fato de que compreende:

um domínio de ligação do ligando extracelular;

um domínio de transmembrana;

um domínio de sinalização intracelular; e,

uma proteína de alvejamento de ubiquitina como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6 que é capaz de ser ligada pela ubiquitina ligase na presença de um composto.

12. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação do ligando extracelular é uma sequência de aminoácido de Fv de cadeia única do antígeno de maturação anticélula B (BCMA).

13. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácido de Fv de cadeia única anti-BCMA compreende a SEQ ID NO: 29.

14. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, caracterizado pelo fato de que o domínio de transmembrana é selecionado dos domínios de transmembrana de CD4, CD8, CD3 ou CD28.

15. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o domínio de transmembrana CD8a compreende a SEQ ID NO: 17.

16. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização intracelular é um motivo de ativação com base na tirosina imunorreceptora (ITAM).

17. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o ITAM é selecionado dos ITAMs de CD3zeta, FcRgamma, FcRbeta, FcRépsilon, CD3gamma, CD3delta, CD3épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b ou CD66d.

18. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização CD3ζ compreende a SEQ ID NO: 20.

19. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 18, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende um domínio coestimulador.

20. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador é selecionado dos domínios coestimuladores de CD28, CD27, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), ICOS (CD278), CD30, CD40, PD-1 (CD279), CD2, CD7, NKG2C (CD94) ou B7-H3 (CD276).

21. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador compreende a SEQ ID NO: 21.

22. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 21, caracterizado pelo fato de que a proteína de alvejamento de ubiquitina está no terminal C do CAR.

23. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 22, caracterizado pelo fato de que a proteína de alvejamento de ubiquitina é separada do domínio de sinalização intracelular por um ligador.

24. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o ligador compreende $(GS)_n$ e/ou $(GGGS)_p$ em que $n = 1$ a 10 e $p = 1$ a 3.

25. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o ligador compreende qualquer uma das SEQ ID NOs 23 a 26.

26. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 25, caracterizado pelo fato de que o composto é um fármaco de imida imunomodulatório (IMiD).

27. Receptor de antígeno quimérico (CAR) de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o IMiD é selecionado de talidomida, lenalidomida, pomalidomida ou um derivado funcional ou análogo das mesmas.

28. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de polipeptídeos e uma proteína de alvejamento de ubiquitina consistindo em menos do que 135 aminoácidos no comprimento que compreende o motivo de grampo de cabelo de um sítio de ligação de cereblon.

29. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 28,

caracterizado pelo fato de que a proteína de alvejamento de ubiquitina consiste de uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 6 a 14 e 27.

30. Polinucleotídeo isolado, caracterizado pelo fato de que codifica a proteína de alvejamento de ubiquitina como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, o CAR como definido em qualquer uma das reivindicações 11 a 27 ou a proteína de fusão como definida na reivindicação 28 ou 29.

31. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende um polinucleotídeo como definido na reivindicação 30.

32. Célula, caracterizada pelo fato de que compreende um polinucleotídeo como definido na reivindicação 30 ou um vetor de expressão como definido na reivindicação 31.

33. Célula de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que é uma célula imunomodulatória.

34. Célula de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que é uma célula T.

35. Célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 34, caracterizada pelo fato de ser para o uso em terapia.

36. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma pluralidade de células como definidas em qualquer uma das reivindicações 32 a 34.

37. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo fato de que adicionalmente compreende um excipiente, carreador ou diluente farmacêuticamente aceitáveis.

38. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 36 ou 37, caracterizada pelo fato de ser para o uso em terapia.

39. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de que a terapia é um método de terapia de gene.

40. Método para engenheirar uma célula imunomodulatória, caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) prover uma célula imunomodulatória;
- (b) transduzir ou transfectar o polinucleotídeo como definido na reivindicação 30 ou o vetor de expressão como definido na reivindicação 31, dentro da dita célula imunomodulatória; e
- (c) expressar o dito polinucleotídeo ou dito vetor de expressão na célula imunomodulatória.

Figura 1

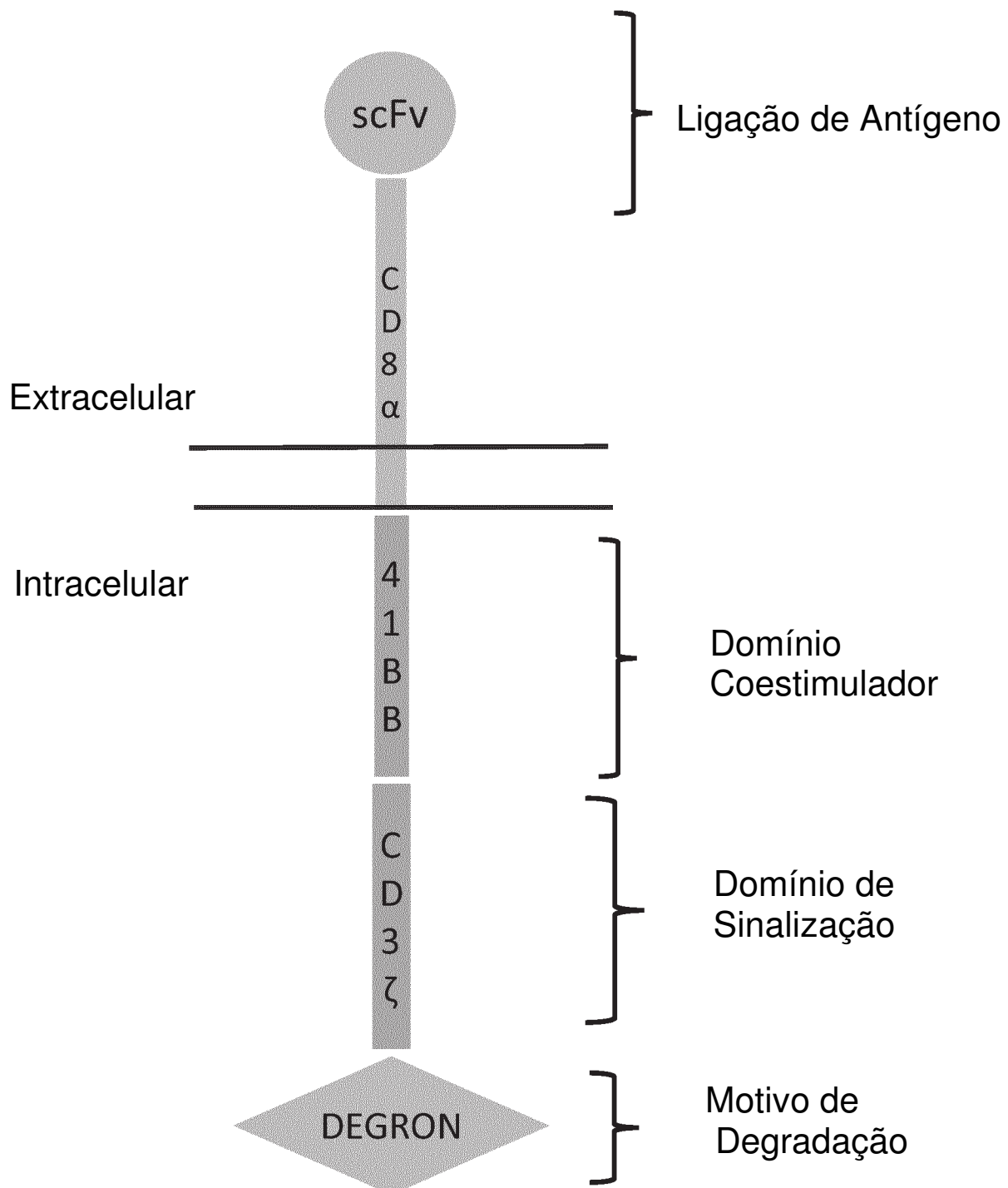


Figura 2



Figura 3

A)

Concentração de Lenalidomida [nM]	GFP + Intensidade de Fluorescência Média (MFI)		
	Construto 1	Construto 2	Construto 3
0	18,216	56,091	42,043
10	15,778	47,132	32,130
100	13,987	26,745	22,361
500	13,284	26,126	22,263
1,000	14,673	22,173	19,370
10,000	14,024	18,771	19,521

B)

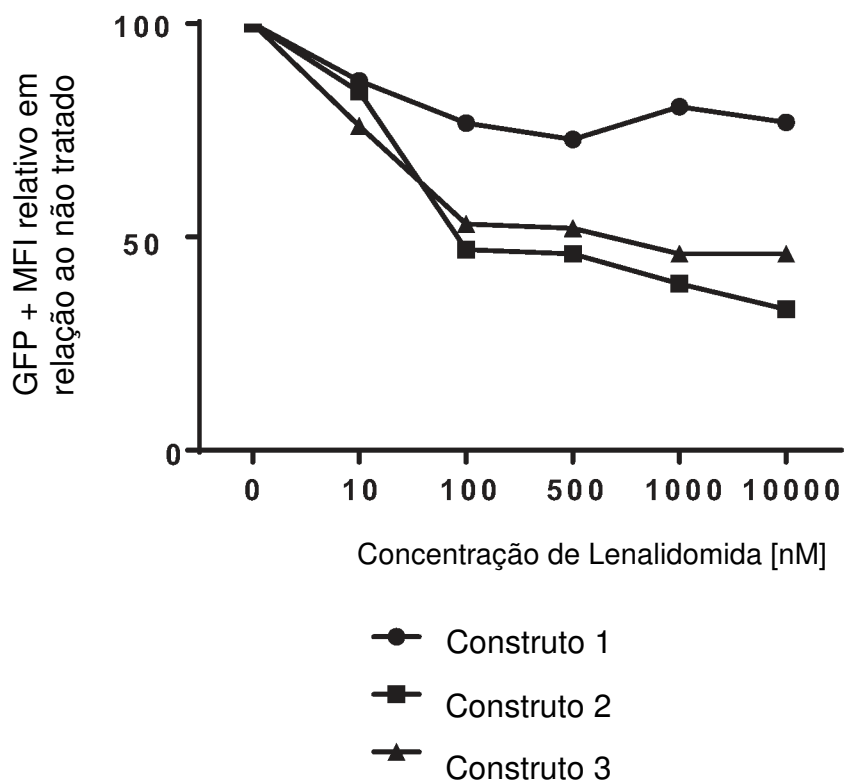


Figura 4

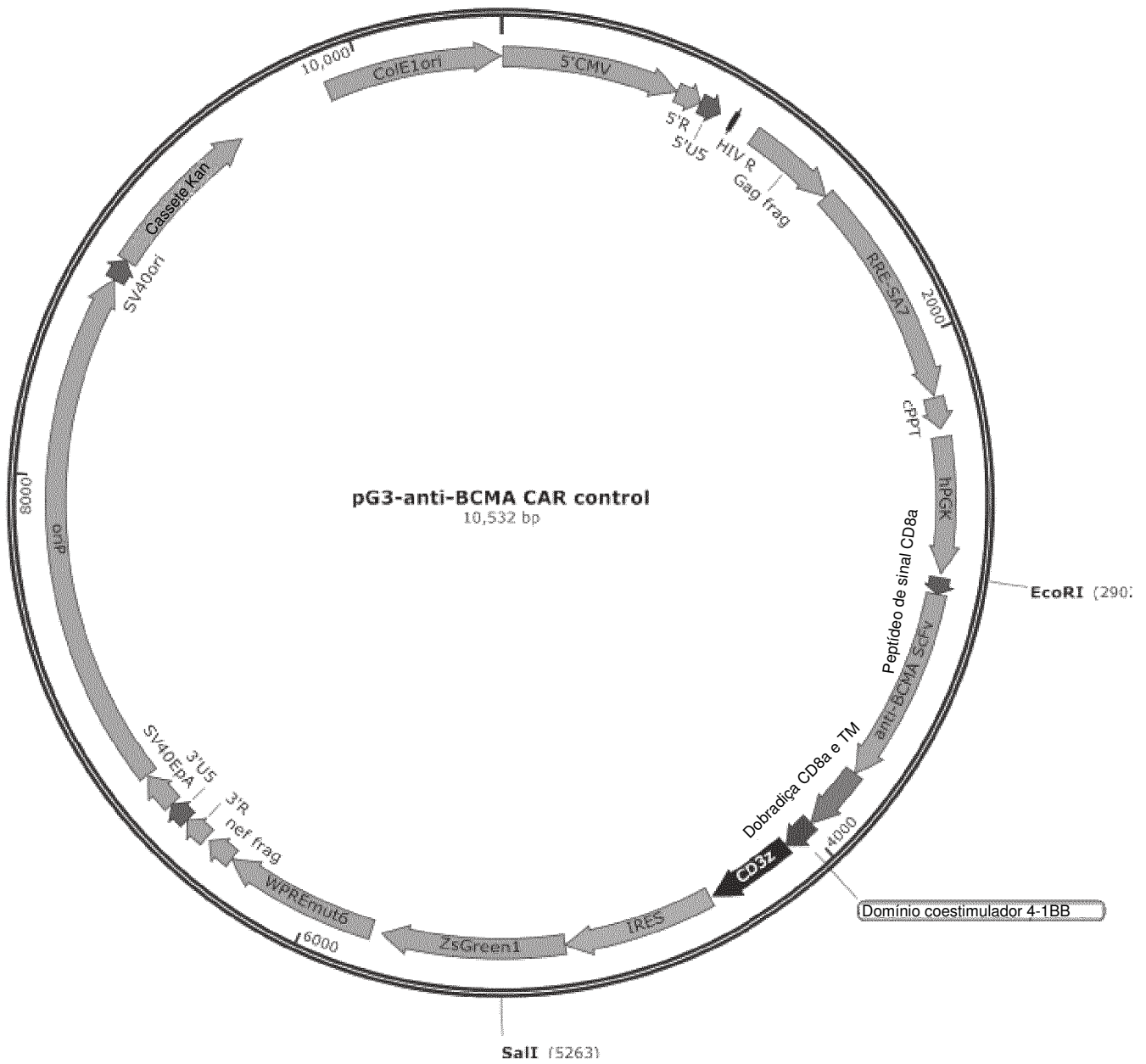
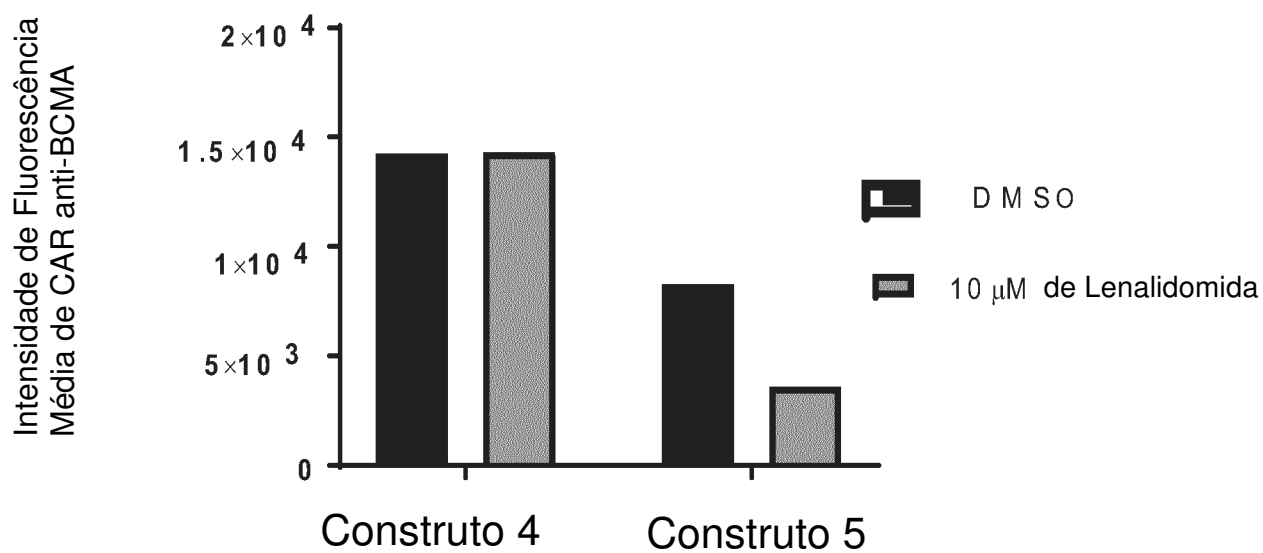


Figura 5

A)



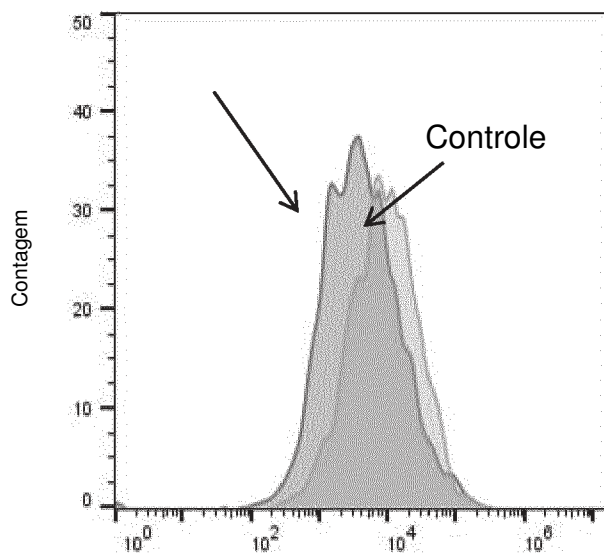
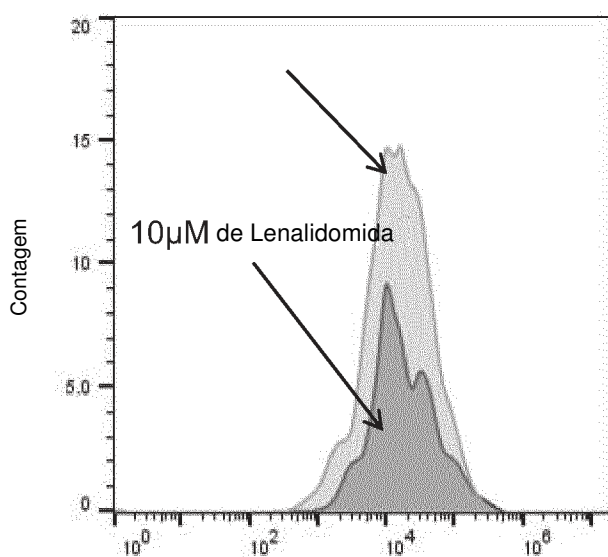
B)

Construto 4

Construto 5

Controle

10μM de Lenalidomida

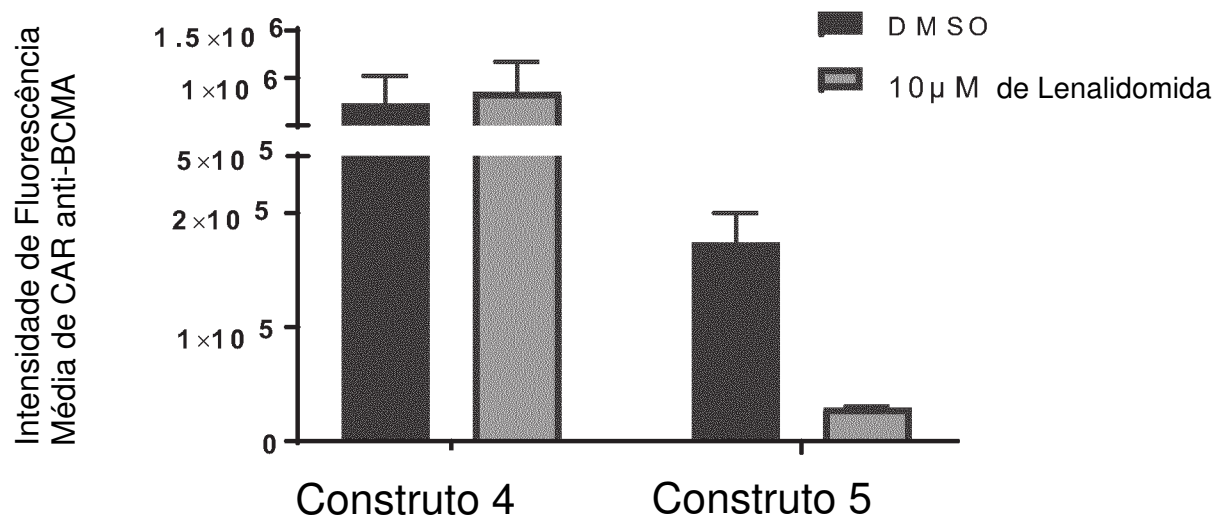


Intensidade de Fluorescência de CAR anti-BCMA



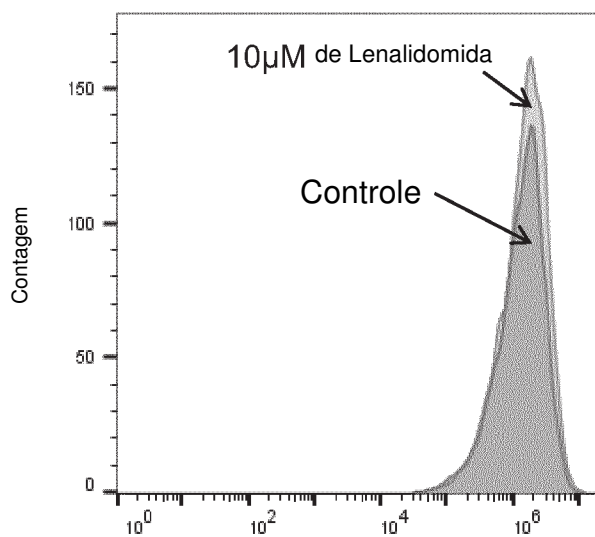
Figura 6

A)

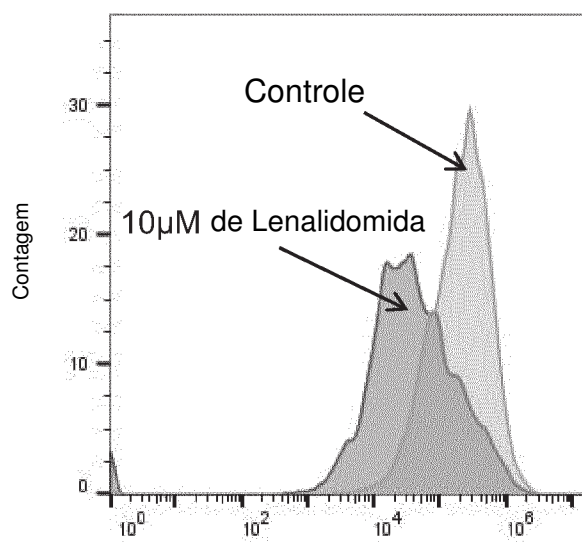


B)

Construto 4



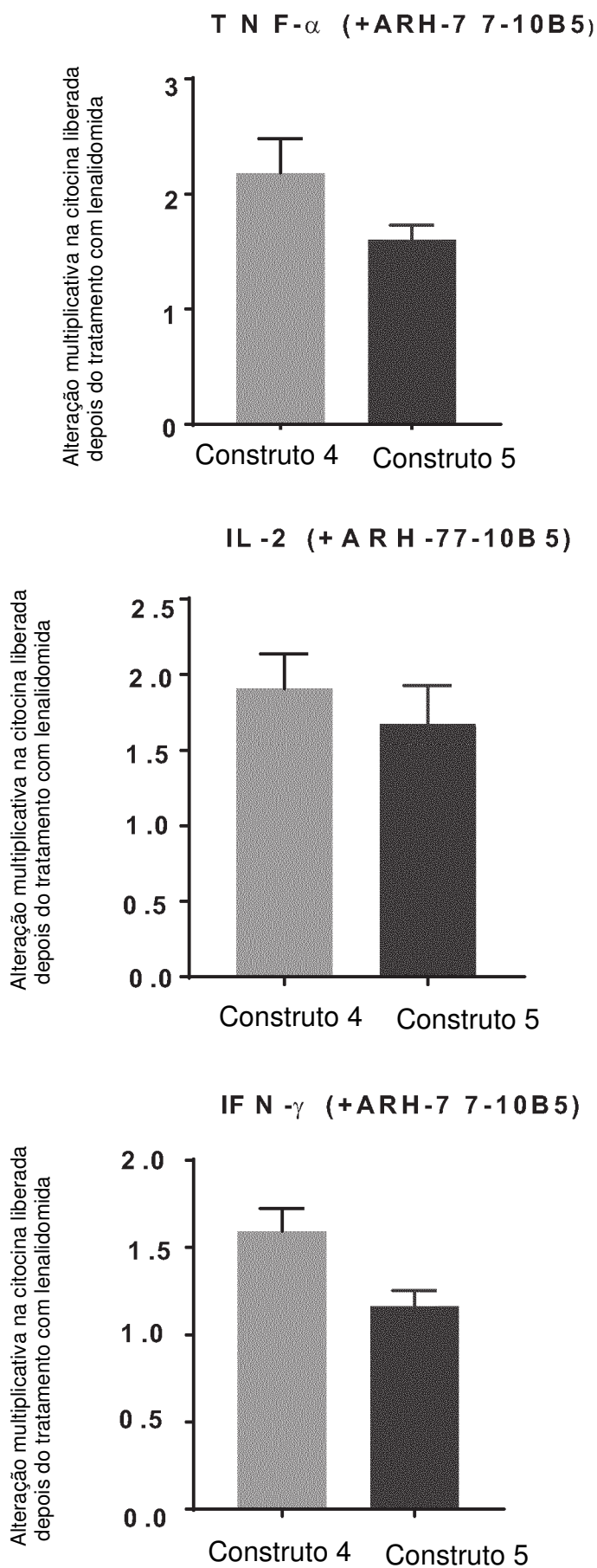
Construto 5



Intensidade de Fluorescência de CAR anti-BCMA



Figura 7



RESUMO

MÉTODO PARA CONTROLAR O NÍVEL DE UMA SEQUÊNCIA DE POLIPEPTÍDEOS, RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO, PROTEÍNA DE FUSÃO, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODO PARA ENGENHEIRAR UMA CÉLULA IMUNOMODULATÓRIA

A invenção se refere a um método para controlar o nível de uma sequência de polipeptídeos compreendendo administrar uma sequência de polipeptídeos fundida a uma proteína de alvejamento de ubiquitina que compreende um motivo estrutural mínimo de degron. Em particular, a sequência de polipeptídeos compreende um receptor de antígeno quimérico portanto a presente invenção é útil nos métodos de terapia de célula e gene onde a atividade do receptor de antígeno quimérico precisa ser controlada.