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

(21) BR 112021015429-9 A2

(22) Data do Depósito: 05/02/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 05/10/2021

(54) Título: CÉLULAS MODIFICADAS POR RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCERES QUE EXPRESSAM CLDN6

(51) Int. Cl.: A61K 31/7105; A61K 35/17; A61P 35/00; C07K 14/705; C07K 14/725; (...).

(30) Prioridade Unionista: 08/02/2019 EM PCT/EP2019/053156.

(71) Depositante(es): BIONTECH CELL & GENE THERAPIES GMBH.

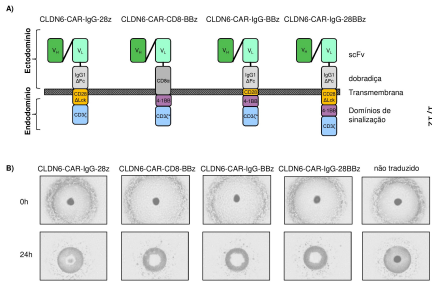
(72) Inventor(es): UGUR SAHIN; PETRA OEHM; BENJAMIN RENGSTL; KATHARINA REINHARD; KRISTINA MICHEL.

(86) Pedido PCT: PCT EP2020052867 de 05/02/2020

(87) Publicação PCT: WO 2020/161186 de 13/08/2020

(85) Data da Fase Nacional: 04/08/2021

(57) Resumo: CÉLULAS MODIFICADAS POR RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCERES QUE EXPRESSAM CLDN6. A presente divulgação refere-se a um receptor de antígeno quimérico (CAR) que mostra reconhecimento altamente específico e sensível de células alvo que expressam CLDN6, bem como um alto potencial para sobrevivência e estimulação repetitiva de células T CAR.



“CÉLULAS MODIFICADAS POR RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCERES QUE EXPRESSAM CLDN6”

RELATÓRIO DESCRITIVO

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[001] A imunoterapia baseada na transferência adotiva de células (ACT) pode ser amplamente definida como uma forma de imunização passiva com células T previamente sensibilizadas que são transferidas para receptores não imunes ou para o hospedeiro autólogo após a expansão *ex vivo* de baixas frequências precursoras para números de células clinicamente relevantes. O uso de abordagens de engenharia genética para inserir receptores direcionados a antígenos de especificidade definida em células T ampliou muito as capacidades potenciais do ACT. Receptores de antígenos quiméricos (CARs) são um tipo de receptor direcionado a antígeno composto de domínios de sinalização de células T intracelulares fundidos a domínios de ligação de antígeno extracelular, mais comumente fragmentos variáveis de cadeia única (scFvs) de anticorpos monoclonais. Os CARs reconhecem diretamente os antígenos da superfície celular, independentemente da apresentação mediada pelo MHC.

[002] As tentativas de tratar o câncer usando células T geneticamente modificadas para direcionar antígenos expressos em células tumorais por meio da expressão de CARs tiveram um sucesso muito limitado. Apesar das respostas significativas em pacientes com malignidades de células B, as respostas clínicas bem-sucedidas após o direcionamento de tumores sólidos usando células T CAR com várias especificidades são muito mais limitadas.

[003] A terapia com células T CAR para tumores sólidos enfrenta

vários desafios. Isso inclui barreiras físicas, o microambiente tumoral imunossupressor e, mais importante, a falta de alvos tumorais realmente específicos e seguros.

[004] Assim, há uma necessidade urgente na técnica de composições e métodos eficazes para o tratamento de câncer usando CARs. A presente invenção aborda essa necessidade.

[005] A fim de implementar uma terapia baseada em CAR para o tratamento de cânceres sólidos, selecionamos o antígeno oncofetal CLDN6 (Claudin 6) que tem todas as características de um alvo ideal para terapia baseada em CAR. CLDN6 é uma proteína de membrana tetraspin que está envolvida na formação de junções apertadas primitivas durante a organogênese e, portanto, é expressa exclusivamente em níveis significativos durante o desenvolvimento fetal e está ausente em tecidos adultos saudáveis, mas altamente superexpressa em diferentes tipos de câncer de alta necessidade médica, incluindo cânceres de ovário, endométrio, testículo e pulmão.

[006] CLDN6 tem alças extracelulares drogáveis e os níveis de superfície celular são altos o suficiente para permitir o reconhecimento por células T CAR. Além disso, a expressão de CLDN6 se correlaciona com a progressão da doença, pois pode ser detectada com maior frequência em lesões metastáticas e células desdiferenciadas, sugerindo um papel em processos oncogênicos. A segurança do direcionamento de CLDN6 é sugerida por um ensaio clínico de fase I/II usando o anticorpo monoclonal anti-CLDN6 IMAB027 em pacientes com carcinoma de ovário avançado (OVAR, NCT02054351), onde nenhum evento adverso relacionado ao IMAB027 foi detectado.

[007] Com base nos resultados de nossos experimentos *in vitro* e *in vivo* , selecionamos um CAR de segunda geração com um domínio 4-1BB (CLDN6-CAR-CD8h-BBz) como estrutura principal para testes pré-clínicos e clínicos. Pudemos demonstrar o reconhecimento altamente específico e sensível de células alvo que expressam CLDN6, bem como um alto potencial para sobrevivência e estimulação repetitiva de células

T CAR.

[008] Avaliamos ainda o potencial antitumoral *in vivo* do CLDN6-CAR usando um modelo de xenoenxerto de carcinoma ovariano e pudemos demonstrar que a transferência adotiva de células T transduzidas por CLDN6-CAR resultou na erradicação completa de tumores avançados. Além disso, esses resultados podem ser reproduzidos com células T CAR criopreservadas que foram geradas nas instalações do GMP.

[009] Como poderia ser demonstrado no passado, que o resultado clínico da terapia com células CAR T está positivamente correlacionado com a persistência de células CAR T infundidas no corpo (Robbins *et al.* (2004) J Immunol. 173(12):7125-30, Huang *et al.* (2005) 28(3):258-67), combinamos a terapia CLDN6-CAR com nosso conceito inovador de expansão *in vivo* do CAR usando mRNA formulado por lipossoma que codifica o antígeno CAR (WO 2016/180778).

[0010] Por fim, poderíamos demonstrar em diferentes modelos de tumor que a combinação de células T CAR transferidas de forma adotiva junto com a vacinação baseada em $RNA_{(LIP)}$acelera as respostas antitumorais em curso e também pode restaurar a eficácia antitumoral de doses insuficientes de células T CAR.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0011] A presente invenção fornece uma molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) que compreende:

i) um domínio de ligação ao antígeno CLDN6;

ii) um domínio transmembranar; e

iii) um domínio intracelular que compreende um domínio coestimulatório 4-1BB e um domínio de sinalização CD3-zeta.

[0012] Em uma modalidade, o domínio de ligação ao antígeno

CLDN6 compreende um anticorpo, um fragmento de anticorpo, um scFv, um Fv, um Fab, um (Fab')2, um anticorpo de domínio único (SDAB), um domínia VH ou VL ou um domínia VHH de camelídeo. Em uma modalidade, o domínio de ligação ao antígeno CLDN6 compreende um scFv. Em uma modalidade, o domínio de ligação ao antígeno CLDN6 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 ou uma variante funcional da mesma.

[0013] Em uma modalidade, o domínio coestimulatório 4-1BB compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 ou uma variante funcional da mesma. Em uma modalidade, a molécula CAR da invenção não compreende um outro domínio coestimulatório.

[0014] Em uma modalidade, o domínio de sinalização CD3-zeta compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 ou uma variante funcional da mesma.

[0015] Em uma modalidade, o domínio transmembranar compreende um domínio transmembranar de uma proteína selecionada do grupo que consiste na cadeia alfa, beta ou zeta do receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gama, IL7Ra, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDlld, ITGAE, CD103, ITGAL, CDlla, LFA-1, ITGAM, CDllb, ITGAX, CDllc, ITGBl, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAMl (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tátil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGLl, CDIOO (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D e NKG2C, ou uma variante funcional dos mesmos.

[0016] Em uma modalidade, o domínio transmembranar compreende um domínio transmembranar CD8α. Em uma modalidade, o domínio transmembranar compreende a sequência de aminoácidos de

SEQ ID NO: 28 ou uma variante funcional da mesma.

[0017] Em uma modalidade, o domínio de ligação ao antígeno está conectado ao domínio transmembranar por um domínio de dobradiça. Em uma modalidade, o domínio de dobradiça é um domínio de dobradiça CD8α. Em uma modalidade, o domínio de dobradiça compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 ou uma variante funcional da mesma.

[0018] Em uma modalidade, a molécula CAR da invenção compreende:

i) um domínio de ligação ao antígeno CLDN6;

ii) um domínio de dobradiça CD8α;

iii) um domínio transmembranar CD8α; e

iv) um domínio intracelular que compreende um domínio coestimulatório 4-1BB e um domínio de sinalização CD3-zeta.

[0019] Em uma modalidade, a molécula CAR da invenção compreende ainda uma sequência líder.

[0020] Em uma modalidade, a molécula de CAR da invenção compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 ou uma variante funcional da mesma.

[0021] A presente invenção fornece ainda um ácido nucleico que codifica a molécula CAR da invenção. Em uma modalidade, o ácido nucleico é DNA ou RNA.

[0022] A presente invenção fornece ainda um vetor que compreende o ácido nucleico da invenção. Em uma modalidade, o vetor é selecionado do grupo que consiste em um vetor de DNA, um vetor de RNA, um plasmídeo, um vetor de lentivírus, um vetor adenoviral e um vetor de retrovírus. Em uma modalidade, o vetor compreende ainda um promotor. Em uma modalidade, o promotor é escolhido de um promotor EF-1, um

promotor do gene CMV IE, um promotor EF-1α, um promotor da ubiquitina C ou um promotor da fosfoglicerato quinase (PGK).

[0023] A presente invenção fornece ainda uma célula efetora imune, compreendendo:

a molécula CAR da invenção;

o ácido nucleico da invenção; ou

o vetor da invenção.

[0024] Em uma modalidade, a célula efetora imune é geneticamente modificada para expressar o CAR. Em uma modalidade, a célula efetora imune é selecionada do grupo que consiste em uma célula T, uma célula Assassina Natural (NK) e um linfócito T citotóxico (CTL). Em uma modalidade, a célula efetora imune é uma célula T CD8+. Em uma modalidade, a célula efetora imune é uma célula humana.

[0025] A presente invenção fornece ainda uma população de células imunes efetoras compreendendo múltiplas células imunes efetoras da invenção.

[0026] Em uma modalidade da célula efetora imune da invenção ou a população de células imunes efetoras da invenção, as células não têm expressão ou têm baixa expressão de um TCR funcional ou um HLA funcional.

[0027] A presente invenção fornece ainda um método de produção de uma célula efetora imune ou uma população de células imunes efetoras, compreendendo introduzir o ácido nucleico da invenção ou do vetor da invenção em uma célula efetora imune, sob condições tais que a molécula de CAR seja expressa.

[0028] A presente invenção fornece ainda um método para estimular uma resposta imune mediada por células a um CLDN6 que expressa população de células alvo ou tecido em um sujeito, o método compreende fornecer ao sujeito uma quantidade eficaz de uma célula efetora imune

da invenção ou uma população de células efetoras imunes da invenção. A célula efetora imune ou a população de células imunes efetoras pode ser gerada *ex vivo* e administrada ao sujeito ou a célula efetora imune ou a população de células imunes efetoras pode ser gerada no sujeito.

[0029] A presente invenção fornece ainda um método de tratamento de um sujeito com uma doença associada à expressão de CLDN6, compreendendo fornecer ao sujeito uma quantidade eficaz de uma célula efetora imune da invenção ou uma população de células imunes efetoras da invenção. A célula efetora imune ou a população de células imunes efetoras pode ser gerada *ex vivo* e administrada ao sujeito ou a célula efetora imune ou a população de células imunes efetoras pode ser gerada no sujeito. Em uma modalidade, a doença associada à expressão de CLDN6 é selecionada do grupo que consiste em uma doença proliferativa, uma condição pré-cancerígena, um câncer e uma indicação não relacionada ao câncer associada à expressão de CLDN6. Em uma modalidade, o câncer é selecionado do grupo que consiste em câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer de mama, câncer hepático, câncer de pâncreas, câncer de pele, melanomas, câncer de cabeça, sarcomas, câncer do duto biliar, câncer de células renais e câncer de bexiga urinária.

[0030] A presente invenção fornece ainda um método de fornecimento de imunidade antitumoral em um sujeito, compreendendo fornecer ao sujeito uma quantidade eficaz de uma célula efetora imune da invenção ou uma população de células imunes efetoras da invenção. A célula efetora imune ou a população de células imunes efetoras pode ser gerada *ex vivo* e administrada ao sujeito ou a célula efetora imune ou a população de células imunes efetoras pode ser gerada no sujeito. Em uma modalidade, o tumor é um tumor que expressa CLDN6.

[0031] Em uma modalidade dos métodos da invenção, a célula efetora imune ou a população de células imunes efetoras é autóloga ou alogênica para o sujeito.

[0032] Em uma modalidade dos métodos da invenção, o método

compreende ainda administrar um agente que aumenta a eficácia da célula efetora imune ou a população de células imunes efetoras. Em uma modalidade, o referido agente é escolhido de um ou mais de:

um inibidor de proteína fosfatase;

um inibidor de quinase;

uma citocina;

um inibidor de uma molécula inibidora do sistema imunológico; ou

um agente que diminui o nível ou atividade de uma célula TREG.

[0033] Em uma modalidade dos métodos da invenção, o método compreende ainda a etapa de contatar a célula efetora imune ou a população de células efetoras imunes, *ex vivo* ou no sujeito, com uma molécula de antígeno cognata ligada ao domínio de ligação ao antígeno CLDN6. Em uma modalidade, a molécula de antígeno cognata é selecionada do grupo que consiste em CLDN6 ou um fragmento do mesmo, ou uma variante de CLDN6 ou um fragmento de CLDN6. Em uma modalidade, a célula efetora imune ou a população de células efetoras imunes é colocada em contato com a molécula de antígeno cognata sob condições tais que a expansão e/ou ativação da célula efetora imune ou a população de células efetoras imunes ocorre. Em uma modalidade, a etapa de contatar a célula efetora imune ou a população de células imunes efetoras com a molécula de antígeno cognata ocorre *in vivo* ou *ex vivo*.

[0034] Em uma modalidade dos métodos da invenção, o método compreende a etapa de administrar a molécula de antígeno cognata ou um ácido nucleico que a codifica para o sujeito. Em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata é expresso em

células do sujeito para fornecer a molécula de antígeno cognata. Em uma modalidade, a expressão da molécula de antígeno cognata está na superfície da célula. Em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata é transitoriamente expresso nas células do sujeito. Em uma modalidade, o nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata é RNA. Em uma modalidade, a célula efetora imune ou a população de células imunes efetoras e/ou a molécula de antígeno cognata ou o ácido nucleico que a codifica são administrados sistemicamente. Em uma modalidade, após a administração sistêmica do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata, ocorre a expressão do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata no baço. Em uma modalidade, após a administração sistêmica do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata, ocorre a expressão do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata em células de apresentação de antígeno, de preferência células de apresentação de antígeno profissionais. Em uma modalidade, as células de apresentação de antígeno são selecionadas do grupo que consiste em células dendríticas, macrófagos e células B. Em uma modalidade, após a administração sistêmica do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata, nenhuma ou essencialmente nenhuma expressão do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata no pulmão e/ou fígado ocorre. Em uma modalidade, após a administração sistêmica do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata, a expressão do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata no baço é pelo menos 5 vezes a quantidade de expressão no pulmão.

[0035] Em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata é formulado em um veículo de distribuição. Em uma modalidade, o veículo de distribuição compreende partículas. Em uma modalidade, o veículo de distribuição compreende pelo menos um lipídeo. Em uma modalidade, pelo menos um lipídeo compreende pelo menos um lipídeo catiônico. Em uma modalidade, o lipídeo forma um complexo com e/ou encapsula o ácido nucleico que codifica a molécula

de antígeno cognata. Em uma modalidade, o lipídeo é compreendido em uma vesícula que encapsula o ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata. Em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata é formulado em lipossomas.

[0036] Em uma modalidade da célula efetora imune da invenção, a população de células imunes efetoras da invenção ou o método da invenção, a célula efetora imune ou a população de células imunes efetoras é uma célula efetora imune que expressa CAR ou uma população de células efetoras imunes que expressa CAR.

[0037] A presente invenção fornece ainda a molécula CAR da invenção, o ácido nucleico da invenção, o vetor da invenção, a célula efetora imune da invenção ou a população de células imunes efetoras da invenção para uso como um medicamento.

[0038] A presente invenção fornece ainda a molécula CAR da invenção, o ácido nucleico da invenção, o vetor da invenção, a célula efetora imune da invenção ou a população de células imunes efetoras da invenção para uso no tratamento de um doença que expressa CLDN6.

[0039] A presente invenção fornece um kit compreendendo ainda a molécula CAR da invenção, o ácido nucleico da invenção, o vetor da invenção, a célula efetora imune da invenção ou a população de células imunes efetoras da invenção. Em uma modalidade, o kit compreende ainda uma molécula de antígeno cognata que se liga ao domínio de ligação ao antígeno CLDN6 ou um ácido nucleico que a codifica. Em uma modalidade, o kit compreende ainda instruções para uso do kit nos métodos da invenção.

[0040] Em um aspecto adicional, a invenção fornece os agentes e composições, tais como células efetoras imunes aqui descritas para uso nos métodos aqui descritos.

[0041] Outras características e vantagens da presente invenção serão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada e Reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

FIG. 1: Geração e caracterização de diferentes CLDN6-CARs.

[0042] Quatro CARs de direcionamento a CLDN6 diferentes foram projetados e gerados com base nos domínios variáveis da cadeia pesada (V_H) e leve (V_L) do anticorpo específico de CLDN6 IMAB206-C46S. IgG1ΔFc: domínio de IgG1 humana dobradiça-CH2-CH3 Fc com sítios de ligação do receptor IgG Fcγ mutado (FcγR) para prevenir a ativação por FcγR expressando células imunes inatas (Hombach A. *et al.*, (2010) Gene Therapy 17, 1206–1213); CD28ΔLck: domínio transmembranar e citoplasmático de CD28 com uma deleção na fração de ligação Lck do endodomínio CD28 anulando a indução de IL-2 após o envolvimento de CAR para evitar a expansão indesejada de células Treg no local do tumor (Kofler D.M. *et al.*, (2011) Molecular Therapy 19 (4), 760–767); 4-1BB: endodomínio coestimulatório 4-1BB; CD3ζ: domínio de sinalização de CD3ζ; CD3ζ*: CD3ζ com mutação Q14 → K; CD8α: domínio de dobradiça de CD8α humano. B) Teste funcional de diferentes CLDN6-CARs em um ensaio de esferoide tumoral PA1-SC12-A2-eGFP. A lise dos esferoides tumorais foi analisada com base na expressão de eGFP após 24 h de cocultura (E:T = 10:1) usando o sistema de imageamento de células vivas IncuCyte®. As imagens dos poços foram digitalizadas com lentes objetivas 4x no início da cocultura (0h) e 24h depois disso e representam a morte do esferoide tumoral de triplicados técnicos.

FIG. 2: Reconhecimento mediado por CAR dependente da dose e lise de células alvo que expressam CLDN6.

[0043] A expressão de superfície CLDN6-CAR-BBz foi analisada em células T transduzidas após coloração com um anticorpo específico do idiotipo IMAB206 conjugado com fluorocromo. As células T não transduzidas serviram como controle negativo. As células foram fechadas em linfócitos $CD4^+$ ou $CD8^+$ únicos. Os números indicados representam a frequência da população parental (em %). B) A expressão de superfície CLDN6 em células Colo699-N transfectadas com quantidades tituladas

de CLDN6-RNA foi analisada por citometria de fluxo. C) A lise específica de células Colo699-N transfectadas com RNA por células T transduzidas CLDN6-CAR-BBz foi analisada após 12 h de cocultura com uma razão E:T de 20:1 usando o dispositivo xCELLigence. Os dados são apresentados como média ± SD de triplicados técnicos.

FIG. 3: Lise específica mediada por CLDN6-CAR de linhagens de células tumorais que expressam CLDN6.

[0044] As células T humanas transduzidas CLDN6-CAR-BBz foram analisadas por citometria de fluxo e cocultivadas com um painel de linhagens de células tumorais humanas positivas e negativas CLDN6 de origem diferente. A) A expressão de superfície do CAR foi avaliada por citometria de fluxo antes do início da cocultura. Os números indicados representam a frequência da população parental (em %). B) usando uma razão E:T de 10:1. C) A lise específica foi analisada usando o sistema xCELLLigence após 12 h de cocultura de acordo com a fórmula % lise = (CI eGFP –CI efetor)/CI eGFP * 100; CI: índice de células. Os dados representam a média ± SD de triplicados técnicos. D) A expressão de superfície de CLDN6 em linhagens de células tumorais foi analisada por citometria de fluxo após coloração com um anticorpo específico de CLDN6. A porcentagem da população parental é mostrada. E) Os níveis de expressão relativa do mRNA de CLDN6 em linhagens de células tumorais usadas em (A-D), conforme avaliado por qRT-PCR, foram calculados após a normalização para o gene de manutenção *HPRT1*. As barras representam a média ± SD de triplicados técnicos.

FIG. 4: Proliferação dependente da dose mediada por CLDN6-CAR-BBz em resposta a células alvo que expressam CLDN6.

[0045] Células T transduzidas por CAR foram marcadas com CFSE e cocultivadas com DCs autólogas transfectadas com quantidades tituladas de lipoplexoos CLDN6-RNA ($RNA_{(LIP)}$). A proliferação foi

analisada com base em CFSE após 5 dias de cocultura e coloração com anticorpos conjugados com fluorocromo contra CD4, CD8 e o CAR. A) A expressão de superfície do CAR foi avaliada por citometria de fluxo antes do início da cocultura. Os números indicados representam a frequência da população parental (em %). B) A expressão de CLDN6 na superfície de DCs transfectadas foi avaliada por citometria de fluxo usando um anticorpo específico de CLDN6 conjugado com fluorocromo. C) A proliferação específica foi analisada por citometria de fluxo com base na diluição do corante de proliferação CFSE. As barras mostram a porcentagem de células T $CD8^+$ e $CD4^+$ que expressam CAR em proliferação.

FIG. 5: Células T transduzidas de CLDN6-CAR-BBz da atividade antitumoral em um modelo de tumor de xenoenxerto de câncer de ovário avançado (OV90).

[0046] $5x10^6$ células tumorais OV90-SC12 foram enxertadas por via subcutânea 25 dias antes da transferência de células adotivas (ACT) de uma dose única de $1x10^7$ i.v. administradas com células T humanas transduzidas com CLDN6-CAR-BBz ou eGFP (n = 10/grupo). Neste ponto do tratamento com células T, os camundongos já apresentavam tumores avançados de 170 mm^3 em média. O volume do tumor foi determinado três vezes por semana usando um paquímetro e calculado de acordo com a fórmula V = ½ (comprimento x largura ^{2}) com comprimento e largura máximos dos tumores. Os animais foram sacrificados quando o volume do tumor excedeu 1500 mm^3 ou quando o tumor ulcerou. A) Visão geral esquemática do experimento de camundongo conduzido. B) A expressão do transgene (GFP ou CAR) de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ Thumanas transduzidas foi analisada por citometria de fluxo no dia da ACT. Os números indicados representam a frequência da população parental (em %). C) Os volumes médios do tumor em animais tratados com células CLDN6-CAR-BBz e eGFP-T após ACT (indicado como linha pontilhada)

até o dia 44 são mostrados. Os dados são apresentados como média ± SEM todos os camundongos/grupo. D) A persistência de células T e a expressão de superfície do CAR foram analisadas no sangue periférico 3 semanas após o ACT usando citometria de fluxo. Gráficos de pontos representativos são mostrados. Os números indicam a frequência das populações parentais.

FIG. 6: Eliminação repetitiva de esferoides tumorais por células T CLDN6-CAR cultivadas durante 7 e 10 dias.

[0047] As células T transduzidas por CLDN6-CAR geradas em 7 e 10 dias, respectivamente, foram avaliadas quanto ao seu potencial para matar repetidamente os esferoides tumorais que expressam CLDN6 e eGFP, conforme avaliado por imageamento de células vivas. A) A expressão de superfície CAR de células T CLDN6-CAR cultivadas em 7 dias e 10 dias foi analisada em células T transduzidas após coloração com um anticorpo específico de idiotipo IMAB206 conjugado com fluorocromo. As células T não transduzidas serviram como controle negativo. As células foram fechadas em linfócitos $CD4^+$ ou $CD8^+$ únicos. Os números indicados representam a frequência da população parental (em %). B) O teste funcional de células T CLDN6-CAR cultivadas em 7 dias e 10 dias foi realizado usando o ensaio de esferoide tumoral PA1-SC12-A2-eGFP. A lise dos esferoides tumorais foi analisada com base na expressão de eGFP usando o sistema de imageamento de células vivas IncuCyte® ao longo de um período total de 10 dias. Após 5 dias, um novo esferoide tumoral foi adicionado. Os valores representam as intensidades integradas do objeto verde de triplicados técnicos como média ± SD.

FIG. 7: Eficácia antitumoral de células T CLDN6-CAR fabricadas por GMP

[0048] $5x10^6$ células tumorais OV90-SC12 foram enxertadas subcutaneamente 35 dias antes da transferência adotiva de uma dose

única de $1x10^7$ células T CLDN6-CAR-BBz humanas não transduzidas *i.v.* (n = 12/grupo). Os produtos de células T usados foram fabricados nas instalações da GMP em um procedimento de fabricação padrão (dez dias de cultura *in vitro*) ou abreviado (colhido já após sete dias). As células T não transduzidas, que foram tratadas da mesma forma que as células T transduzidas, foram usadas como controle negativo. Os produtos de células T indicados foram descongelados, lavados com PBS e injetados diretamente nos camundongos, que já apresentavam tumores avançados de 160 mm^3 em média. O volume do tumor foi determinado três vezes por semana usando um paquímetro e calculado de acordo com a fórmula V = ½ (comprimento x $largura^2$) com comprimento e largura máximos dos tumores. Os animais foram sacrificados quando o volume do tumor excedeu 1500 mm^3 ou quando o tumor ulcerou. A) Visão geral esquemática do experimento de camundongo conduzido. B) A expressão da superfície do CAR em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ humanas transduzidas foi analisada por citometria de fluxo no dia da ACT. Os números indicados representam a frequência da população parental (em %). C) Os volumes do tumor em CLDN6-CAR-BBz e animais tratados com células T de controle até o dia 57 são mostrados. Os dados são apresentados como média ± SEM de todos os camundongos/grupo. D) A persistência de células T e a expressão de superfície do CAR foram analisadas no sangue periférico 2 semanas após o ACT usando citometria de fluxo. Gráficos de pontos representativos são mostrados. Os números indicam a frequência das populações parentais.

FIG. 8: A expansão *in vivo* via $RNA_{(LIP)}$ leva a uma persistência intensificada de células T CLDN6-CAR-BBz

[0049] Camundongos C57BL/6BrdCrHsd-*Tyr*^{c} irradiados com 2,5 Gy (XRAD320) Gy(n = 2-3/grupo) foram enxertados *i.v.* com 5×10^6 CLDN6-CAR-BBz-Luc-GFP células T C57Bl/6-$Thy1.1^+$. 8 dias após ACT, os camundongos receberam hCLDN6 ou OvaI (ctrl RNA) codificado

vacinação de lipoplexo mRNA ($RNA_{(LIP)}$; 20 µg, *i.v.*) seguido por administração *i.p.* de RNA formulado com nucleosídeo modificado que codifica albumina murina (1 µg/mRNA/camundongo). A vacinação foi repetida nos dias 15, 22, 50 e 85. O imageamento de bioluminescência sequencial foi realizado para monitorar a expansão e persistência no dia 1 (linha de base) até o dia 92 após ACT. A) Visão geral esquemática do experimento de camundongo conduzido. B) Exemplo de imageamento de bioluminescência de camundongos em posição lateral no ponto de tempo indicado após ACT e tratamento com antígeno $RNA_{(LIP)}$. Imagens sem cor representam a intensidade da luz (preto, menos intenso; branco até cinza escuro, mais intenso) que foi sobreposta às imagens de referência em escala de cinza. C) Quantificação da bioluminescência durante e após as rodadas de expansão com CLDN6-$RNA_{(LIP)}$ /ctrl-$RNA_{(LIP)}$ na presença de RNAs de citocina formulados modificados com nucleosídeo indicado(média +/- s.e.m.). Cinza, linhas verticais indicam o ponto de tempo de vacinação de $RNA_{(LIP)}$ vaccination.ACT: transferência adotiva de células T, TBI: irradiação corporal total, BLI: imageamento de bioluminescência, Luc: luciferase de vagalume eficaz, BBz: 4-1BB; z: CD3zeta.

FIG. 9: Atividade antitumoral melhorada de células T CLDN6-CAR-BBz expandidas *in vivo*

[0050] $5x10^5$ células tumorais CT26 foram enxertadas subcutaneamente em camundongos Balb/c 20 dias antes da irradiação de corpo total de 4 Gy e 26 dias antes de ACT de uma dose única de $1x10^6$ células T CLDN6-CAR-BBz ou ctrl-CAR-BBz transduzidas Balb/c-Thy1.1+ i.v. (n=10/grupo). No momento do tratamento com células T, os camundongos apresentaram tumores estabelecidos de aprox. 80 mm^3 em média. O volume do tumor foi determinado três vezes por semana usando um paquímetro e calculado de acordo com a fórmula V = ½ (comprimento x largura ^{2}) com comprimento e largura máximos dos tumores. A) Visão

geral esquemática do experimento de camundongo conduzido. B) Os volumes médios do tumor em animais tratados com células CLDN6-CAR-BBz e ctrl-CAR-BBz-T até o dia 40 são mostrados. Os dados são apresentados como média ± SEM todos os camundongos/grupo. ACT é indicado como linha pontilhada e o tratamento de $RNA_{(LIP)}$ como linha cinza.

FIG. 10: Eficácia antitumoral restaurada de células T CLDN6-CAR expandidas *in vivo* de baixa dose

[0051] $5x10^6$ células tumorais OV90-SC12 foram enxertadas por via subcutânea 30 dias antes de ACT de uma dose única de dose baixa ($1x10^5$) ou células T ($1x10^6$) CLDN6-CAR-BBz ou $1x10^7$ não transduzidas humanas *i.v.* (n=9/grupo). Os produtos de células T usados foram fabricados de acordo com o processo de transdução encurtado (colhido já após 7 dias) nas instalações de GMP. As células T não transduzidas, que foram tratadas da mesma forma que as células T transduzidas, foram usadas como controle negativo. Os produtos de células T indicados foram descongelados, lavados com PBS e injeção direta em camundongos com tumor. Além disso, os camundongos que receberam uma dose baixa de células T CAR foram ainda vacinados com 20 µg de $RNA_{(LIP)}$ codificando CLDN6 ou um antígeno de controle, conforme indicado. O volume do tumor foi determinado três vezes por semana usando um paquímetro e calculado de acordo com a fórmula V = ½ (comprimento x largura ^{2}) com comprimento e largura máximos dos tumores. Os animais foram sacrificados quando o volume do tumor excedeu 1500 mm^3 ou quando o tumor ulcerou. A) Visão geral esquemática do experimento de camundongo conduzido. B) A expressão da superfície do CAR em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ humanas transduzidas foi analisada por citometria de fluxo no dia da transferência adotiva. Os números indicados representam a frequência da população parental (em %). C) Curvas de crescimento tumoral de animais tratados com diferentes doses de CLDN6-CAR-BBz

+/- $RNA_{(LIP)}$ ou células T de controle. Os dados são apresentados como média ± SEM de todos os camundongos/grupo. ACT é indicado como linha pontilhada e o tratamento de $RNA_{(LIP)}$ como linha cinza. D) A persistência de células T e a expressão de superfície do CAR foram analisadas no sangue periférico 2,5 semanas após o ACT usando citometria de fluxo. Gráficos de pontos representativos são mostrados. Os números indicam a frequência das populações parentais.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0052] A invenção se refere a composições e métodos para tratar câncer, incluindo, mas sem limitação, tumores sólidos. A presente invenção se refere a uma estratégia de transferência adotiva de células, como células T transduzidas para expressar um CAR. CARs são moléculas que combinam especificidade para um antígeno desejado (por exemplo, antígeno tumoral) que preferencialmente é baseado em anticorpo com um domínio intracelular de ativação de receptor de células T para gerar uma proteína quimérica que exibe uma atividade imunológica celular específica (por exemplo, uma atividade imune celular antitumoral específica). De preferência, uma célula pode ser geneticamente modificada para expressar de forma estável um CAR em sua superfície, conferindo uma nova especificidade de antígeno que é independente do MHC. A presente invenção se refere geralmente a células T geneticamente modificadas para expressar de forma estável um CAR desejado. As células T que expressam um CAR são aqui referidas como células T CAR ou células T modificadas por CAR.

[0053] Um CAR da invenção combina um domínio de ligação ao antígeno CLDN6, de preferência um domínio de um anticorpo específico, e um domínio intracelular que compreende um domínio coestimulatório 4-1BB e um domínio da cadeia CD3-zeta em uma única proteína quimérica. Em uma modalidade, o CAR da invenção compreende um domínio extracelular que compreende um domínio de ligação ao antígeno

CLDN6, um domínio transmembranar e um domínio intracelular que compreende um domínio coestimulatório 4-1BB e um domínio da cadeia CD3-zeta. Em uma modalidade, o domínio transmembranar não está naturalmente associado a um dos domínios no CAR. Em uma modalidade, o domínio transmembranar está naturalmente associado a um dos domínios no CAR. Em uma modalidade, o domínio transmembranar é modificado por substituição de aminoácidos para evitar a ligação de tais domínios aos domínios transmembranares das mesmas ou diferentes proteínas da membrana de superfície para minimizar as interações com outros membros do complexo receptor. De preferência, o domínio transmembranar é derivado de CD8α.

[0054] A invenção fornece ainda células CAR T e métodos de seu uso para terapia adotiva. Em uma modalidade, as células T CAR da invenção podem ser geradas através da introdução de um retroviral, tal como vetor lentiviral compreendendo um CAR desejado, por exemplo, um CAR compreendendo anti-CLDN6, dobradiça CD8α e domínio transmembranar e domínios de sinalização 4-1BB e CD3zeta, nas células. As células CAR T da invenção são, de preferência, capazes de se replicar *in vivo* , resultando em persistência de longo prazo que pode levar ao controle sustentado do tumor.

[0055] Em uma modalidade, a invenção se refere à administração de uma célula T geneticamente modificada que expressa um CAR desejado para o tratamento de um paciente com câncer ou em risco de ter câncer. De preferência, células autólogas são usadas no tratamento. Em uma modalidade, PBMCs autólogas são coletadas de um paciente com necessidade de tratamento e as células T são ativadas e expandidas usando os métodos aqui descritos e conhecidos na técnica e, em seguida, infundidas de volta no paciente.

[0056] Em uma modalidade, a invenção se refere geralmente ao tratamento de um paciente com ou em risco de desenvolver câncer que expressa CLDN6. A invenção inclui o uso de células T que expressam um anti-CLDN6-CAR incluindo CD3-zeta e o domínio coestimulatório 4-1BB.

As células CAR T da invenção podem sofrer expansão robusta de células T *in vivo* , em particular se contatadas com seu antígeno cognato, e podem persistir em níveis elevados por um período de tempo prolongado. Em alguns casos, as células CAR T da invenção infundidas em um paciente podem eliminar as células cancerígenas *in vivo* em pacientes.

Definições

[0057] Embora a presente invenção seja descrita em detalhes abaixo, deve ser entendido que esta invenção não está limitada às metodologias, protocolos e reagentes específicos descritos neste documento, pois estes podem variar. Deve também ser entendido que a terminologia usada neste documento tem a finalidade de descrever modalidades específicas apenas, e não se pretende limitar o escopo da presente invenção, o qual será limitado somente pelas Reivindicações anexas. A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado compreendido comumente por versados na técnica.

[0058] A seguir, serão descritos os elementos da presente invenção. Esses elementos são listados com modalidades específicas, no entanto, deve-se entender que eles podem ser combinados de qualquer maneira e em qualquer número para criar modalidades adicionais. Os exemplos descritos de várias maneiras e as modalidades preferidas não devem ser interpretadas como limitando a presente invenção apenas às modalidades explicitamente descritas. Esta descrição deve ser entendida para apoiar e abranger modalidades que combinam as modalidades explicitamente descritas com qualquer número dos elementos divulgados e/ou preferidos. Além disso, quaisquer permutações e combinações de todos os elementos descritos neste Pedido devem ser consideradas divulgadas pela descrição do presente Pedido, a menos que o contexto indique o contrário.

[0059] A menos que definidos de outra maneira, todos os termos

técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado como compreendido geralmente por alguém versado na técnica à qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos neste documento possam ser usados na prática para o teste da presente invenção, os materiais e métodos preferidos são descritos neste documento. Ao descrever e reivindicar a presente invenção, será usada a seguinte terminologia.

[0060] Ao longo deste Relatório Descritivo e das Reivindicações que se seguem, a menos que o contexto exija o contrário, a palavra "compreende", e variações como "compreende" e "compreendendo", serão entendidas como implicando a inclusão de um membro declarado, número inteiro ou etapa ou grupo de membros, números inteiros ou etapas, mas não a exclusão de qualquer outro membro, número inteiro ou etapa ou grupo de membros, números inteiros ou etapas, embora em algumas modalidades esse outro membro, número inteiro ou etapa ou grupo de membros, números inteiros ou etapas possam ser excluídos, ou seja, o assunto consiste na inclusão de um membro declarado, inteiro ou etapa ou grupo de membros, inteiros ou etapas.

[0061] Os artigos "um" e "uma" são usados neste documento para se referir a um ou mais de um (isto é a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais de um elemento.

[0062] "Cerca de", como utilizado neste documento quando se refere a um valor mensurável, tal como uma quantidade, uma duração temporal e semelhantes, destina-se a abranger variações de ± 20% ou ± 10%, com maior preferência ± 5%, ainda com maior preferência ± 1 %, e ainda com maior preferência ± 0,1% do valor especificado.

[0063] O termo "anticorpo", como utilizado neste documento, refere-se a uma molécula de imunoglobulina que se liga, de preferência se liga especificamente a um antígeno. Anticorpos podem ser imunoglobulinas intactas derivadas de fontes naturais ou de fontes recombinantes e podem ser partes ou fragmentos imunorreativos de imunoglobulinas

intactas. Anticorpos são tipicamente tetrâmeros de moléculas de imunoglobulina. Os anticorpos na presente invenção podem existir em uma variedade de formas incluindo, por exemplo, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, Fv, Fab e $F(ab)_2$, bem como anticorpos de cadeia simples e anticorpos humanizados (Harlow *et al.*, 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow *et al.*, 1989, in: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426).

[0064] Os anticorpos expressos por células B são algumas vezes referidos como BCR (receptor de células B) ou receptor de antígeno. Os cinco membros incluídos nesta classe de proteínas são IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. IgA é o anticorpo primário que está presente nas secreções corporais, como saliva, lágrimas, leite materno, secreções gastrointestinais e secreções de muco dos tratos respiratório e geniturinário. IgG é o anticorpo circulante mais comum. IgM é a principal imunoglobulina produzida na resposta imune primária na maioria dos sujeitos. É a imunoglobulina mais eficiente na aglutinação, fixação do complemento e outras respostas de anticorpos, e é importante na defesa contra bactérias e vírus. IgD é a imunoglobulina que não tem função conhecida de anticorpo, mas pode servir como um receptor de antígeno. IgE é a imunoglobulina que medeia a hipersensibilidade imediata, causando a liberação de mediadores de mastócitos e basófilos após a exposição ao alérgeno.

[0065] O termo “fragmento de anticorpo” refere-se a uma parte de um anticorpo intacto e compreende tipicamente as regiões variáveis determinantes antigênicas de um anticorpo intacto.

[0066] Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas sem limitação, fragmentos Fab, Fab’, F(ab’)2, anticorpos lineares, anticorpos scFv e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpos.

[0067] Uma “cadeia pesada de anticorpo”, como utilizado neste documento, se refere ao maior dos dois tipos de cadeias polipeptídicas

presentes em moléculas de anticorpo em suas conformações ocorrendo naturalmente.

[0068] Uma “cadeia leve de anticorpo”, como utilizado neste documento, se refere ao menor dos dois tipos de cadeias polipeptídicas presentes em moléculas de anticorpos em suas conformações ocorrendo naturalmente. As cadeias leves κ e λ se referem aos dois principais isótipos de cadeia leve de anticorpo.

[0069] O termo “antígeno” ou “Ag”, como utilizado neste documento, é definido como uma molécula que provoca uma resposta imune. Essa resposta imune pode envolver tanto a produção de anticorpo quanto a ativação de células imunologicamente competentes específicas, ou ambas. O versado na técnica entenderá que qualquer macromolécula, incluindo virtualmente todas as proteínas ou peptídeos, podem servir como um antígeno. Além disso, os antígenos podem ser antígenos de ocorrência natural ou recombinantes.

[0070] No contexto da presente invenção, o termo “antígeno tumoral” refere-se a antígenos que são comuns a distúrbios hiperproliferativos específicos, como o câncer.

[0071] Claudinas são proteínas integrais de membrana localizadas nas junções estreitas do epitélio e do endotélio. Prevê-se que as claudinas tenham quatro segmentos transmembranares com duas alças extracelulares e terminais N e C localizados no citoplasma. A primeira alça extracelular, denominada EC1 ou ECL1, consiste em média de 53 aminoácidos, e a segunda alça extracelular, denominada EC2 ou ECL2, consiste em cerca de 24 aminoácidos. A família Claudina (CLDN) de proteínas transmembrana desempenha um papel crítico na manutenção das junções estreitas epiteliais e endoteliais e também pode desempenhar um papel na manutenção do citoesqueleto e na sinalização celular.

[0072] Claudina 6 (CLDN6) é um gene oncofetal expresso em células-tronco murinas e humanas, bem como em corpos embrioides comprometidos com o destino de células epiteliais (Turksen, K. *et al.* (2001) Dev Dyn 222, 292-300; Anderson WJ. *et al.* (2008) Dev Dyn 237,

504-12; Turksen K. *et al.* (2002) Development, 129, 1775-84; Assou S. *et al.* (2007) Stem Cells 25, 961-73). Como um antígeno associado ao tumor, pode ser classificado como um antígeno de diferenciação devido à sua expressão durante o estágio inicial da morfogênese epidérmica, onde é crucial para a diferenciação epidérmica e formação de barreira. Além disso, a expressão foi observada em tecidos epiteliais ou tecido epitelial normal neonatal da língua, pele, estômago e mama (Abuazza G. *et al.* (2006), Am J Physiol Renal Physiol 291, 1132-1141; Troy T.C. *et al.* (2007), Molecular Biotechnology 36, 166-74; Zhao L. *et al.* (2008), Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294, 1856-1862). Além disso, dados próprios também revelam expressão baixa ou muito baixa de CLDN6 na placenta humana, bexiga urinária, endométrio, próstata e nervo periférico e superexpressão frequente de CLDN6 em diferentes cânceres. CLDN6 demonstrou ser superexpresso em tumores, incluindo tumores cerebrais pediátricos, adenocarcinomas gástricos e tumores de células germinativas, bem como carcinomas viscerais, como carcinomas ovarianos. Também foi demonstrado que a superexpressão de CLDN6 em células de câncer gástrico resulta em maior invasividade, migração e proliferação, sugerindo que CLDN6 é um marcador de mau prognóstico e pode desempenhar um papel potencial na manutenção do fenótipo maligno. Além disso, foi demonstrado que CLDN6 funciona como supressor de câncer por meio da inibição da proliferação celular e indução de apoptose em linhagens de células de câncer de mama.

[0073] Mostrou-se que CLDN6 é expresso, por exemplo, em câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer de mama, câncer hepático, câncer de pâncreas, câncer de pele, melanomas, câncer de cabeça e pescoço, sarcomas, câncer de ducto biliar, câncer de células renais e câncer de bexiga urinária. CLDN6 é um alvo particularmente preferido para a prevenção e/ou tratamento de câncer de ovário, em particular adenocarcinoma de ovário e teratocarcinoma de ovário, câncer de pulmão, incluindo câncer de pulmão de células pequenas (SCLC) e câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), em particular

carcinoma de células escamosas do pulmão e adenocarcinoma, câncer gástrico, câncer de mama, câncer hepático, câncer de pâncreas, câncer de pele, em particular carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, câncer de cabeça e pescoço, em particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, em particular sarcoma sinovial e carcinossarcoma, câncer do ducto biliar, câncer da bexiga urinária, em particular carcinoma de células transicionais e carcinoma papilar, câncer de rim, em particular carcinoma de células renais, incluindo carcinoma de células renais de células claras e carcinoma de células renais papilares, câncer de cólon, câncer do intestino delgado, incluindo câncer do íleo, em particular adenocarcinoma do intestino delgado e adenocarcinoma do íleo, carcinoma embrionário testicular, coriocarcinoma placentário, câncer cervical, câncer testicular, em particular seminoma testicular, teratoma testicular e câncer testicular embrionário, câncer uterino, tumores de células germinativas, como um teratocarcinoma ou um carcinoma embrionário, em particular tumores de células germinativas do testículo, e formas metastáticas dos mesmos. Em uma modalidade, a doença de câncer associada à expressão de CLDN6 é selecionada do grupo que consiste em câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer de ovário metastático e câncer de pulmão metastático. De preferência, o câncer de ovário é um carcinoma ou um adenocarcinoma. De preferência, o câncer de pulmão é um carcinoma ou um adenocarcinoma e, de preferência, é câncer bronquiolar, tal como um carcinoma bronquiolar ou adenocarcinoma bronquiolar.

[0074] O termo “CLDN6” refere-se preferencialmente a CLDN6 humano e, em particular, a uma proteína compreendendo, de preferência consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2 da listagem de sequência ou uma variante da referida sequência de aminoácido. A primeira alça extracelular de CLDN6 compreende preferencialmente os aminoácidos 28 a 80, com maior preferência os aminoácidos 28 a 76 da sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID

NO: 1 ou a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 2. A segunda alça extracelular de CLDN6 compreende preferencialmente os aminoácidos 138 a 160, de preferência os aminoácidos 141 a 159, com maior preferência os aminoácidos 145 a 157 da sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 1 ou a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 2. As referidas primeira e segunda alças extracelulares formam, de preferência, a parte extracelular de CLDN6.

[0075] O termo “expresso na superfície da célula” ou “associado à superfície da célula” significa que uma molécula como CLDN6 está associada e localizada na membrana plasmática de uma célula, em que pelo menos uma parte da molécula está voltada para o espaço extracelular da referida célula e é acessível do exterior da referida célula, por exemplo, por anticorpos localizados fora da célula. Neste contexto, uma parte é preferencialmente pelo menos 4, preferencialmente pelo menos 8, preferencialmente pelo menos 12, com maior preferência pelo menos 20 aminoácidos. A associação pode ser direta ou indireta. Por exemplo, a associação pode ser por um ou mais domínios transmembranares, uma ou mais âncoras lipídicas, ou pela interação com qualquer outra proteína, lipídeo, sacarídeo ou outra estrutura que pode ser encontrada no folheto externo da membrana plasmática de uma célula. Por exemplo, uma molécula associada à superfície de uma célula pode ser uma proteína transmembranar possuindo uma parte extracelular ou pode ser uma proteína associada à superfície de uma célula interagindo com outra proteína que é uma proteína transmembranar.

[0076] “Superfície celular” ou “superfície de uma célula” é usada de acordo com o seu significado normal na técnica e, portanto, inclui a parte externa da célula que é acessível à ligação por proteínas e outras moléculas.

[0077] “Imunidade mediada por células”, “imunidade celular”, “resposta imune celular” ou termos semelhantes pretendem incluir uma resposta celular direcionada a células caracterizadas pela expressão de

um antígeno, em particular caracterizada pela apresentação de um antígeno com MHC classe I ou classe II. A resposta celular está relacionada a células chamadas células T ou linfócitos T, que atuam como “ajudantes” ou “assassinos”. As células T auxiliares (também chamadas de células T $CD4^+$) desempenham um papel central ao regular a resposta imune e as células assassinas (também chamadas de células T citotóxicas, células T citolíticas, células T $CD8^+$ ou CTLs) matam células doentes, como células cancerígenas, evitando a produção de mais células doentes.

[0078] O termo “epítopo” refere-se a um determinante antigênico em uma molécula, como um antígeno, ou seja, a uma parte ou fragmento da molécula, que é reconhecido, ou seja, ligado, pelo sistema imunológico, por exemplo, que é reconhecido por um anticorpo ou CAR. Por exemplo, epítopos são sítios distintos e tridimensionais em um antígeno, que são reconhecidos pelo sistema imunológico. Os epítopos geralmente consistem em grupos de moléculas de superfície quimicamente ativos, como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e geralmente têm características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Os epítopos conformacionais e não conformacionais distinguem-se pelo fato de a ligação ao primeiro, mas não ao último, se perder na presença de solventes desnaturantes. De preferência, um epítopo é capaz de induzir uma resposta imune contra o antígeno ou uma célula que expressa o antígeno. De preferência, o termo refere-se a uma parte imunogênica de um antígeno. Um epítopo de uma proteína, como um antígeno tumoral, compreende preferencialmente uma parte contínua ou descontínua da referida proteína e está preferencialmente entre 5 e 100, preferencialmente entre 5 e 50, com maior preferência entre 8 e 30, com maior preferência entre 10 e 25 aminoácidos em comprimento, por exemplo, o epítopo pode ter de preferência 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 aminoácidos de comprimento.

[0079] “Processamento de antígeno” refere-se à degradação de um

antígeno em produtos de procissão, que são fragmentos do referido antígeno (por exemplo, a degradação de uma proteína em peptídeos) e a associação de um ou mais desses fragmentos (por exemplo, via ligação) com moléculas MHC para apresentação por células, de preferência células apresentadoras de antígeno a células T específicas.

[0080] Uma célula apresentadora de antígeno (APC) é uma célula que exibe o antígeno no contexto do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em sua superfície. As células T poder reconhecer esse complexo usando seu receptor de células T (TCR). As células apresentadoras de antígenos processam os antígenos e os apresentam às células T. De acordo com a invenção, o termo "célula apresentadora de antígeno" inclui células apresentadoras de antígeno profissionais e células apresentadoras de antígeno não profissionais.

[0081] As células apresentadoras de antígenos profissionais são muito eficientes na internalização de antígenos, seja por fagocitose ou por endocitose mediada por receptor, e então exibem um fragmento do antígeno, ligado a uma molécula de MHC de classe II, em sua membrana. A célula T reconhece e interage com o complexo da molécula de MHC de classe II do antígeno na membrana da célula apresentadora de antígeno. Um sinal coestimulatório adicional é então produzido pela célula apresentadora de antígeno, levando à ativação da célula T. A expressão de moléculas coestimulatórias é uma característica definidora das células apresentadoras de antígenos profissionais. Os principais tipos de células apresentadoras de antígenos profissionais são as células dendríticas, que têm a mais ampla faixa de apresentação de antígenos e são provavelmente as células apresentadoras de antígenos mais importantes, macrófagos, células B e certas células epiteliais ativadas.

[0082] O termo "macrófago" refere-se a um subgrupo de células fagocíticas produzidas pela diferenciação de monócitos. Os macrófagos que são ativados por inflamação, citocinas imunes ou produtos microbianos engolfam e matam de forma não específica patógenos estranhos dentro do macrófago por ataque hidrolítico e oxidativo

resultando na degradação do patógeno. Os peptídeos de proteínas degradadas são exibidos na superfície das células dos macrófagos, onde podem ser reconhecidos pelas células T e podem interagir diretamente com os anticorpos na superfície das células B, resultando na ativação das células T e B e estimulação adicional da resposta imune. Os macrófagos pertencem à classe das células apresentadoras de antígenos. Em uma modalidade, os macrófagos são macrófagos esplênicos.

[0083] O termo "célula dendrítica" (DC) refere-se a outro subtipo de células fagocíticas pertencentes à classe das células apresentadoras de antígeno. Em uma modalidade, as células dendríticas são derivadas de células progenitoras da medula óssea hematopoiéticas. Essas células progenitoras inicialmente se transformam em células dendríticas imaturas. Essas células imaturas são caracterizadas por alta atividade fagocítica e baixo potencial de ativação de células T. As células dendríticas imaturas coletam amostras constantemente do ambiente circundante em busca de patógenos, como vírus e bactérias. Assim que entram em contato com um antígeno apresentável, eles se tornam ativados em células dendríticas maduras e começam a migrar para o baço ou para o linfonodo. As células dendríticas imaturas fagocitam patógenos e degradam suas proteínas em pequenos pedaços e, após a maturação, apresentam esses fragmentos em sua superfície celular usando moléculas de MHC. Simultaneamente, eles suprarregulam os receptores da superfície celular que atuam como correceptores na ativação das células T, como CD80, CD86 e CD40, intensificando muito sua capacidade de ativar as células T. Eles também suprarregulam o CCR7, um receptor quimiotático que induz a célula dendrítica a se deslocar através da corrente sanguínea para o baço ou através do sistema linfático para um nódulo linfático. Aqui, elas agem como células apresentadoras de antígeno e ativam células T auxiliares e células T assassinas, bem como células B, apresentando-lhes antígenos, ao lado de sinais coestimulatórios não específicos do antígeno. Assim, as células dendríticas podem induzir ativamente uma resposta imune relacionada

às células T ou B. Em uma modalidade, as células dendríticas são células dendríticas esplênicas.

[0084] De acordo com a invenção, o termo "CAR" (ou "receptor de antígeno quimérico") se refere a um receptor artificial que compreende uma única molécula ou um complexo de moléculas que reconhece, isto é, se liga a, uma estrutura alvo (por exemplo, um antígeno) em uma célula alvo, como uma célula cancerígena (por exemplo, pela ligação de um domínio de ligação de antígeno a um antígeno expresso na superfície da célula alvo) e pode conferir especificidade a uma célula efetora imune, como uma célula T que expressa o referido CAR na superfície celular. De preferência, o reconhecimento da estrutura alvo por um CAR resulta na ativação de uma célula efetora imune que expressa o referido CAR. Um CAR pode compreender uma ou mais unidades de proteína, as referidas unidades de proteína compreendendo um ou mais domínios, conforme descrito neste documento. O termo "CAR" não inclui receptores de células T.

[0085] A terapia de transferência de células adotiva com células T modificadas com CAR que expressam receptores de antígenos quiméricos é uma terapêutica anticâncer promissora, pois as células T modificadas com CAR podem ser engenheiradas para direcionar virtualmente qualquer antígeno tumoral. Por exemplo, as células T do paciente podem ser geneticamente engenheiradas (geneticamente modificadas) para expressar CARs especificamente direcionados a antígenos nas células tumorais do paciente e, em seguida, infundidas de volta no paciente.

[0086] O termo "antitumoral", como utilizado neste documento, refere-se a um efeito biológico que pode ser manifestado por uma diminuição no volume do tumor, uma diminuição no número de células tumorais, uma diminuição no número de metástases, uma prevenção da ocorrência de tumor em primeiro lugar, um aumento na expectativa de vida ou melhora de vários sintomas fisiológicos associados à condição cancerígena.

[0087] Como utilizado neste documento, o termo "autólogo"

pretende referir-se a qualquer material derivado do mesmo indivíduo ao qual será posteriormente reintroduzido no indivíduo.

[0088] "Alogênico" refere-se a um enxerto derivado de um animal diferente da mesma espécie,

[0089] "Xenogênico" refere-se a um enxerto derivado de um animal de uma espécie diferente.

[0090] O termo "singênico" é usado para descrever qualquer coisa que seja derivada de indivíduos ou tecidos com genótipos idênticos, ou seja, gêmeos idênticos ou animais da mesma linhagem consanguínea, ou seus tecidos.

[0091] O termo "câncer", como utilizado neste documento, é definido como doença caracterizada pelo crescimento rápido e descontrolado de células aberrantes. As células cancerígenas podem se espalhar localmente ou através da corrente sanguínea e do sistema linfático para outras partes do corpo. Exemplos de vários cânceres incluem, mas sem limitação, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pele, câncer de pâncreas, câncer colorretal, câncer renal, câncer de fígado, câncer cerebral, linfoma, leucemia, câncer de pulmão e semelhantes.

[0092] Como utilizado neste documento, os termos "peptídeo", "polipeptídeo" e "proteína" são utilizados indiferentemente e referem-se a um composto constituído por resíduos de aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. Uma proteína ou peptídeo deve conter pelo menos dois aminoácidos e nenhuma limitação é colocada no número máximo de aminoácidos que podem compreender uma sequência de proteína ou peptídeo. Os polipeptídeos incluem qualquer peptídeo ou proteína compreendendo dois ou mais aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas. Como utilizado neste documento, o termo refere-se a ambas as cadeias curtas, que também são comumente referidas na técnica como peptídeos, oligopeptídeos e oligômeros, por exemplo, e a cadeias mais longas, que geralmente são referidas na técnica como proteínas, das quais existem muitos tipos. "Polipeptídeos" incluem, por

exemplo, fragmentos biologicamente ativos, polipeptídeos substancialmente homólogos, oligopeptídeos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipeptídeos, polipeptídeos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusão, entre outros. Os polipeptídeos incluem peptídeos naturais, peptídeos recombinantes, peptídeos sintéticos ou uma combinação dos mesmos.

[0093] O termo “polinucleotídeo”, como utilizado neste documento, é definido como uma cadeia de nucleotídeos. Além disso, os ácidos nucleicos são polímeros de nucleotídeos. Assim, os ácidos nucleicos e polinucleotídeos, como utilizado neste documento, são intercambiáveis. Um versado na técnica tem o conhecimento geral de que os ácidos nucleicos são polinucleotídeos, que podem ser hidrolisados nos “nucleotídeos” monoméricos. Os nucleotídeos monoméricos podem ser hidrolisados em nucleosídeos. Como utilizado neste documento, os polinucleotídeos incluem, mas sem limitação, todas as sequências de ácido nucleico que são obtidas por qualquer meio disponível na técnica, incluindo, sem limitação, meios recombinantes, isto é, a clonagem de sequências de ácido nucleico de uma biblioteca recombinante ou uma célula genoma, usando tecnologia de clonagem comum e PCR™ e semelhantes, e por meios sintéticos. O termo “polinucleotídeo”, como aqui utilizado neste documento, deve ser interpretado de forma ampla e inclui DNA e RNA, incluindo DNA e RNA modificados.

[0094] Na presente divulgação, o termo “RNA” refere-se a uma molécula de ácido nucleico que inclui resíduos de ribonucleotídeo. Em modalidades preferidas, o RNA contém todos ou a maioria dos resíduos de ribonucleotídeo. Como utilizado neste documento, “ribonucleotídeo” refere-se a um nucleotídeo com um grupo hidroxil na posição 2’ de um grupo β-D-ribofuranosil. O RNA abrange, sem limitação, RNA de fita dupla, RNA de fita simples, RNA isolado, como RNA parcialmente purificado, RNA essencialmente puro, RNA sintético, RNA produzido de forma recombinante, bem como RNA modificado que difere do RNA de ocorrência natural pela adição, deleção, substituição e/ou alteração de

um ou mais nucleotídeos. Tais alterações podem referir-se à adição de material não nucleotídico a nucleotídeos de RNA internos ou à(s) extremidade(s) do RNA. Também está contemplado aqui que os nucleotídeos no RNA podem ser nucleotídeos não padrão, tais como nucleotídeos sintetizados quimicamente ou desoxinucleotídeos. Para a presente divulgação, esses RNAs alterados são considerados análogos de RNA de ocorrência natural.

[0095] Em certas modalidades da presente divulgação, o RNA é RNA mensageiro (mRNA) que se refere a um transcrito de RNA que codifica um peptídeo ou proteína. Conforme estabelecido na técnica, o mRNA geralmente contém uma região 5' não traduzida (5'-UTR), uma região de codificação de peptídeo e uma região 3' não traduzida (3'-UTR). Em algumas modalidades, o RNA é produzido por transcrição *in vitro* ou síntese química. Em uma modalidade, o mRNA é produzido por transcrição *in vitro* usando um modelo de DNA em que DNA se refere a um ácido nucleico que contém desoxirribonucleotídeos.

[0096] Em uma modalidade, o RNA é RNA transcrito *in vitro* (IVT-RNA) e pode ser obtido por transcrição *in vitro* de um modelo de DNA apropriado. O promotor para controlar a transcrição pode ser qualquer promotor para qualquer RNA polimerase. Um modelo de DNA para a transcrição *in vitro* pode ser obtido por clonagem de um ácido nucleico, em particular cDNA, e introduzindo-o em um vetor apropriado para a transcrição *in vitro* . O cDNA pode ser obtido por transcrição reversa de RNA.

[0097] Em uma modalidade, o RNA pode ter ribonucleotídeos modificados. Exemplos de ribonucleotídeos modificados incluem, sem limitação, 5-metilcitidina, pseudouridina e/ou 1-metil-pseudouridina.

[0098] Em algumas modalidades, o RNA de acordo com a presente divulgação compreende uma 5'-cap. Em uma modalidade, o RNA da presente divulgação não tem 5'-trifosfatos não capeados. Em uma modalidade, o RNA pode ser modificado por um análogo de 5'-cap. O termo "5'-cap" refere-se a uma estrutura encontrada na extremidade 5'

de uma molécula de mRNA e geralmente consiste em um nucleotídeo de guanosina conectado ao mRNA por meio de uma ligação 5' a 5' trifosfato. Em uma modalidade, esta guanosina é metilada na posição 7. O fornecimento de um RNA com um 5'-cap ou análogo de 5'-cap pode ser alcançado por transcrição *in vitro* , em que o 5'-cap é cotranscricionalmente expresso na fita de RNA, ou pode ser anexado ao RNA pós-transcricionalmente usando enzimas de capeamento.

[0099] Em algumas modalidades, o RNA de acordo com a presente divulgação compreende uma 5'-UTR e/ou uma 3'-UTR. O termo "região não traduzida" ou "UTR" refere-se a uma região em uma molécula de DNA que é transcrita, mas não é traduzida em uma sequência de aminoácidos, ou à região correspondente em uma molécula de RNA, tal como uma molécula de mRNA. Uma região não traduzida (UTR) pode estar presente 5' (a montante) de uma estrutura de leitura aberta (5'-UTR) e/ou 3' (a jusante) de uma estrutura de leitura aberta (3'-UTR). Uma 5'-UTR, se presente, está localizada na extremidade 5', a montante do códon de início de uma região de codificação de proteína. Uma 5'-UTR está a jusante do 5'-cap (se presente), por exemplo, diretamente adjacente ao 5'-cap. Uma 3'-UTR, se presente, está localizada na extremidade 3', a jusante do códon de terminação de uma região de codificação de proteína, mas o termo "3'-UTR" preferencialmente não inclui a cauda poli(A). Assim, a 3'-UTR está a montante da sequência poli(A) (se presente), por exemplo, diretamente adjacente à sequência poli(A).

[00100] Em algumas modalidades, o RNA de acordo com a presente divulgação compreende uma sequência 3'-poli(A). O termo "sequência poli(A)" refere-se a uma sequência de resíduos adenil (A) que está tipicamente localizada na extremidade 3' de uma molécula de RNA. De acordo com a divulgação, em uma modalidade, uma sequência poli(A) compreende pelo menos cerca de 20, pelo menos cerca de 40, pelo menos cerca de 80 ou pelo menos cerca de 100 e até cerca de 500, até cerca de 400, até cerca de 300, até cerca de 200 ou até cerca de 150 nucleotídeos A e, em particular, cerca de 120 nucleotídeos A.

[00101] “Codificação” se refere à propriedade inerente de sequências específicas de nucleotídeos em um polinucleotídeo, tal como um gene, um cDNA ou um mRNA, para servir como modelos para síntese de outros polímeros e macromoléculas em processos biológicos tendo ou uma sequência definida de nucleotídeos (isto é, rRNA, tRNA e mRNA) ou uma sequência definida de aminoácidos e as propriedades biológicas resultantes dos mesmos. Assim, um gene codifica uma proteína se transcrição e tradução do mRNA correspondente a esse gene produzir a proteína em uma célula ou outro sistema biológico. Tanto a fita codificante, cuja sequência de nucleotídeos é idêntica à sequência de mRNA e é geralmente fornecida em listagens de sequências, quanto a fita não codificante, usada como o modelo para transcrição de um gene ou cDNA, podem ser referidas como codificando a proteína ou outro produto desse gene ou cDNA.

[00102] Como utilizado neste documento, “endógeno” refere-se a qualquer material de ou produzido dentro de um organismo, célula, tecido ou sistema.

[00103] Como utilizado neste documento, o termo “exógeno” refere-se a qualquer material introduzido ou produzido fora de um organismo, célula, tecido ou sistema.

[00104] O termo “expressão”, como utilizado neste documento é definido como a transcrição e/ou tradução de uma sequência de nucleotídeos particular.

[00105] “Vetor de expressão” refere-se a um vetor que compreende um polinucleotídeo recombinante que compreende sequências de controle de expressão operativamente ligadas a uma sequência de nucleotídeos a ser expressa. Um vetor de expressão compreende elementos de cis-ação suficientes para expressão; outros elementos para expressão podem ser fornecidos pela célula hospedeira ou em um sistema de expressão *in vitro* . Os vetores de expressão incluem todos aqueles conhecidos na técnica, como cosmídeos, plasmídeos (por exemplo, nus ou contidos em lipossomas) e vírus (por exemplo, lentivírus, retrovírus,

adenovírus e vírus adenoassociados) que incorporam o polinucleotídeo recombinante.

[00106] "Homólogo" refere-se à semelhança de sequência ou identidade de sequência entre dois polipeptídeos ou entre duas moléculas de ácido nucleico. Quando uma posição em ambas as duas sequências comparadas é ocupada pela mesma base ou subunidade monomérica de aminoácido, por exemplo, se uma posição em cada uma das duas moléculas de DNA é ocupada por adenina, então as moléculas são homólogas nessa posição. A porcentagem de homologia entre duas sequências é uma função do número de posições correspondentes ou homólogas compartilhadas pelas duas sequências dividido pelo número de posições comparadas X 100. Por exemplo, se 6 de 10 das posições em duas sequências são emparelhadas ou homólogas, então as duas sequências são 60% homólogas. Geralmente, é feita uma comparação quando duas sequências estão alinhadas para fornecer homologia máxima. As sequências homólogas exibem de acordo com a divulgação pelo menos 40%, em particular pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% e de preferência pelo menos 95%, pelo menos 98 ou pelo menos pelo menos 99% de identidade dos resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos.

[00107] "Fragmento", com referência a uma sequência de aminoácidos (peptídeo ou proteína), refere-se a uma parte de uma sequência de aminoácidos, isto é, uma sequência que representa a sequência de aminoácidos encurtada no terminal N e/ou terminal C. Um fragmento encurtado no terminal C (fragmento N-terminal) pode ser obtido, por exemplo, por tradução de uma estrutura de leitura aberta truncada que não possui a extremidade 3' da estrutura de leitura aberta. Um fragmento encurtado no terminal N (fragmento C-terminal) pode ser obtido, por exemplo, por tradução de uma estrutura de leitura aberta truncada que não tem a extremidade 5' da estrutura de leitura aberta, desde que a estrutura de leitura aberta truncada compreenda um códon de início que serve para iniciar a tradução. Um fragmento de uma

sequência de aminoácidos compreende, por exemplo, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% dos resíduos de aminoácidos de uma sequência de aminoácidos. Um fragmento de uma sequência de aminoácidos compreende preferencialmente pelo menos 6, em particular pelo menos 8, pelo menos 12, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 50 ou pelo menos 100 aminoácidos consecutivos de uma sequência de aminoácido.

[00108] Por "variante" ou "proteína variante" ou "polipeptídeo variante" aqui se entende uma proteína que difere de uma proteína parental em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido. O polipeptídeo parental pode ser um polipeptídeo de ocorrência natural ou de tipo selvagem (WT), ou pode ser uma versão modificada de um polipeptídeo de tipo selvagem. De preferência, o polipeptídeo variante tem pelo menos uma modificação de aminoácido em comparação com o polipeptídeo parental, por exemplo, de 1 a cerca de 20 modificações de aminoácidos e, de preferência, de 1 a cerca de 10 ou de 1 a cerca de 5 modificações de aminoácidos em comparação com o parental.

[00109] Por "polipeptídeo parental", "proteína parental", "polipeptídeo precursor" ou "proteína precursora" como utilizado neste documento, entende-se um polipeptídeo não modificado que é subsequentemente modificado para gerar uma variante. Um polipeptídeo parental pode ser um polipeptídeo de tipo selvagem, ou uma variante ou versão projetada de um polipeptídeo de tipo selvagem.

[00110] Por "tipo selvagem" ou "WT" ou "nativo" aqui entende-se uma sequência de aminoácidos que é encontrada na natureza, incluindo variações alélicas. Uma proteína ou polipeptídeo de tipo selvagem tem uma sequência de aminoácidos que não foi intencionalmente modificada.

[00111] Para os fins da presente divulgação, "variantes" de uma sequência de aminoácidos (peptídeo, proteína ou polipeptídeo) compreendem variantes de inserção de aminoácidos, variantes de adição de aminoácidos, variantes de deleção de aminoácidos e/ou variantes de substituição de aminoácidos. O termo "variante" inclui todos os

mutantes, variantes de emenda, variantes modificadas pós-tradução, conformações, isoformas, variantes alélicas, variantes de espécies e homólogos de espécies, em particular aqueles que são de ocorrência natural.

[00112] Variantes de inserção de aminoácidos compreendem inserções de um ou dois ou mais aminoácidos em uma sequência de aminoácidos particular. No caso de variantes de sequência de aminoácidos tendo uma inserção, um ou mais resíduos de aminoácidos são inseridos em um sítio particular em uma sequência de aminoácidos, embora a inserção aleatória com rastreio apropriado do produto resultante também seja possível. As variantes de adição de aminoácidos compreendem fusões de terminal amino e/ou carboxi de um ou mais aminoácidos, tais como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 ou mais aminoácidos. As variantes de deleção de aminoácidos são caracterizadas pela remoção de um ou mais aminoácidos da sequência, como por remoção de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 ou mais aminoácidos. As deleções podem estar em qualquer posição da proteína. As variantes de deleção de aminoácidos que compreendem a deleção na extremidade N-terminal e/ou C-terminal da proteína são também chamadas de variantes de truncamento N-terminal e/ou C-terminal. As variantes de substituição de aminoácidos são caracterizadas por pelo menos um resíduo na sequência ser removido e outro resíduo ser inserido em seu lugar. É dada preferência às modificações em posições na sequência de aminoácidos que não são conservadas entre proteínas ou peptídeos homólogos e/ou para substituir os aminoácidos por outros com propriedades semelhantes. De preferência, as alterações de aminoácidos em variantes de peptídeos e proteínas são alterações conservativas de aminoácidos, isto é, substituições de aminoácidos com carga semelhante ou sem carga. Uma mudança conservadora de aminoácidos envolve a substituição de um de uma família de aminoácidos que estão relacionados em suas cadeias laterais. Os aminoácidos de ocorrência natural são geralmente divididos em quatro famílias: acídicos (aspartato, glutamato), básicos (lisina,

arginina, histidina), não polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano) e aminoácidos sem carga polares (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). Fenilalanina, triptofano e tirosina são às vezes classificados em conjunto como aminoácidos aromáticos. Em uma modalidade, as substituições conservadoras de aminoácidos incluem substituições dentro dos seguintes grupos:

glicina, alanina;

valina, isoleucina, leucina;

ácido aspártico, ácido glutâmico;

asparagina, glutamina;

serina, treonina;

lisina, arginina; e

fenilalanina, tirosina.

[00113] De preferência, o grau de semelhança, de preferência a identidade entre uma determinada sequência de aminoácidos e uma sequência de aminoácidos que é uma variante da referida sequência de aminoácidos será de pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82 %, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%. O grau de semelhança ou identidade é dado preferencialmente para uma região de aminoácido que é pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% ou cerca de 100% de todo o comprimento da sequência de aminoácidos de referência. Por exemplo, se a sequência de aminoácidos

de referência consiste em 200 aminoácidos, o grau de similaridade ou identidade é dado preferencialmente por pelo menos cerca de 20, pelo menos cerca de 40, pelo menos cerca de 60, pelo menos cerca de 80, pelo menos cerca de 100, pelo menos cerca de 120, pelo menos cerca de 140, pelo menos cerca de 160, pelo menos cerca de 180 ou cerca de 200 aminoácidos, de preferência aminoácidos contínuos. Em modalidades preferidas, o grau de semelhança ou identidade é dado para todo o comprimento da sequência de aminoácidos de referência. O alinhamento para determinar a similaridade de sequência, de preferência identidade de sequência, pode ser feito com ferramentas conhecidas na técnica, de preferência usando o melhor alinhamento de sequência, por exemplo, usando Align, usando configurações padrão, de preferência EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Abertura de Folga 10,0, Extensão de Folga 0,5.

[00114] "Semelhança de sequência" indica a porcentagem de aminoácidos que são idênticos ou que representam substituições conservativas de aminoácidos. "Identidade de sequência" entre duas sequências de aminoácidos indica a porcentagem de aminoácidos que são idênticos entre as sequências.

[00115] O termo "porcentagem de identidade" pretende denotar uma porcentagem de resíduos de aminoácidos que são idênticos entre as duas sequências a serem comparadas, obtida após o melhor alinhamento, sendo esta porcentagem puramente estatística e as diferenças entre as duas sequências sendo distribuídas aleatoriamente e ao longo de todo o seu comprimento. As comparações de sequências entre duas sequências de aminoácidos são convencionalmente realizadas comparando estas sequências depois de as terem alinhado de forma ideal, sendo a referida comparação efetuada por segmento ou por "janela de comparação" para identificar e comparar regiões locais de semelhança de sequência. O alinhamento ideal das sequências para comparação pode ser produzido, além de manualmente, por meio do algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, 1981, Ads App. Math. 2, 482, por meio do algoritmo de

homologia local de Neddleman e Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 443, por meio do método de pesquisa de similaridade de Pearson e Lipman, 1988, Proc. Natl Acad. Sci. USA 85, 2444, ou por meio de programas de computador que usam esses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N and TFASTA in Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

[00116] A percentagem de identidade é calculada determinando o número de posições idênticas entre as duas sequências em comparação, dividindo este número pelo número de posições comparadas e multiplicando o resultado obtido por 100 de modo a obter a porcentagem de identidade entre estas duas sequências.

[00117] O termo “variante funcional”, como utilizado neste documento, refere-se a uma molécula ou sequência variante que compreende uma sequência de aminoácidos que é alterada por um ou mais aminoácidos em comparação com a sequência de aminoácidos da molécula ou sequência parental e que ainda é capaz de cumprir uma ou mais das funções da molécula ou sequência parental, por exemplo, ligar-se a uma molécula alvo ou contribuir para a ligação a uma molécula alvo. Em uma modalidade, uma variante funcional sozinha ou em combinação com outros elementos compete pela ligação a uma molécula alvo com a molécula ou sequência parental. Em outras palavras, as modificações na sequência de aminoácidos da molécula ou sequência parental não afetam ou alteram significativamente as características de ligação da molécula ou sequência. Em diferentes modalidades, a ligação da variante funcional pode ser reduzida, mas ainda está significativamente presente, por exemplo, a ligação da variante funcional pode ser pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80% ou pelo menos 90 % da molécula ou sequência parental. No entanto, em outras modalidades, a ligação da variante funcional pode ser intensificada em comparação com a molécula ou sequência parental.

[00118] Uma sequência de aminoácidos (peptídeo, proteína ou polipeptídeo) “derivada de” uma sequência de aminoácidos designada

(peptídeo, proteína ou polipeptídeo) refere-se à origem da primeira sequência de aminoácidos. De preferência, a sequência de aminoácidos que é derivada de uma sequência de aminoácidos particular tem uma sequência de aminoácidos que é idêntica, essencialmente idêntica ou homóloga a essa sequência particular ou a um fragmento da mesma. As sequências de aminoácidos derivadas de uma sequência de aminoácidos particular podem ser variantes dessa sequência particular ou um fragmento da mesma.

[00119] Como utilizado neste documento, um "material de instrução" ou "instruções" inclui uma publicação, uma gravação, um diagrama ou qualquer outro meio de expressão que pode ser usado para comunicar a utilidade das composições e métodos da invenção. O material de instrução do kit da invenção pode, por exemplo, ser afixado a um recipiente que contém as composições da invenção ou ser enviado junto com um recipiente que contém as composições. Alternativamente, o material de instrução pode ser enviado separadamente do recipiente com a intenção de que o material de instrução e as composições sejam usados cooperativamente pelo destinatário.

[00120] "Isolado" significa alterado ou removido do estado natural. Por exemplo, um ácido nucleico ou um peptídeo naturalmente presente em um animal vivo não é "isolado", mas o mesmo ácido nucleico ou peptídeo parcial ou completamente separado dos materiais coexistentes em seu estado natural é "isolado". Um ácido nucleico ou uma proteína isolada pode existir em forma substancialmente purificada ou pode existir em um ambiente não nativo, tal como, por exemplo, uma célula hospedeira.

[00121] No contexto da presente invenção, são utilizadas as seguintes abreviaturas para as bases de ácido nucleico de ocorrência comum. "A" refere-se a adenosina, "C" refere-se a citosina, "G" refere-se a guanosina, "T" refere-se a timidina e "U" refere-se a uridina.

[00122] Um "lentivírus", como utilizado neste documento, refere-se a um gênero da família Retroviridae. Os lentivírus são únicos entre os

retrovírus por serem capazes de infectar células que não se dividem; eles podem distribuir uma quantidade significativa de informações genéticas no DNA da célula hospedeira, portanto, são um dos métodos mais eficientes de um vetor de distribuição de genes. HIV, SIV e FIV são exemplos de lentivírus. Os vetores derivados de lentivírus oferecem os meios para atingir níveis significativos de transferência de genes *in vivo*.

[00123] O termo "operacionalmente ligado" refere-se à ligação funcional entre uma sequência regulatória e uma sequência de ácido nucleico heteróloga resultando na expressão desta última. Por exemplo, uma primeira sequência de ácido nucleico está operacionalmente ligada a uma segunda sequência de ácido nucleico quando a primeira sequência de ácido nucleico é colocada em uma relação funcional com a segunda sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor está operacionalmente ligado a uma sequência de codificação se o promotor afetar a transcrição ou expressão da sequência de codificação. Geralmente, as sequências de DNA operacionalmente ligadas são contíguas e, quando necessário para unir duas regiões de codificação de proteínas, na mesma estrutura de leitura.

[00124] O termo antígeno tumoral "superexpresso" ou "superexpressão" do antígeno tumoral destina-se a indicar um nível anormal de expressão do antígeno tumoral em uma célula de uma área de doença, como um tumor sólido dentro de um tecido ou órgão específico do paciente em relação ao nível de expressão em uma célula normal desse tecido ou órgão.

[00125] O termo "promotor" como utilizado neste documento é definido como uma sequência de DNA reconhecida pela maquinaria sintética da célula, ou maquinaria sintética introduzida, necessária para iniciar a transcrição específica de uma sequência polinucleotídica.

[00126] Como utilizado neste documento, o termo "promotor/ sequência regulatória" significa uma sequência de ácido nucleico que é necessária para a expressão de um produto genético operacionalmente ligado à sequência promotora/regulatória. Em alguns casos, esta

sequência pode ser a sequência promotora do núcleo e, em outros casos, esta sequência também pode incluir uma sequência intensificadora e outros elementos regulatórios que são necessários para a expressão do produto genético. A sequência promotora/reguladora pode, por exemplo, ser uma que expressa o produto do gene de uma maneira específica do tecido.

[00127] Um promotor "constitutivo" é uma sequência de nucleotídeos que, quando operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica ou especifica um produto genético, faz com que o produto genético seja produzido em uma célula sob a maioria ou todas as condições fisiológicas da célula.

[00128] Um promotor "induzível" é uma sequência de nucleotídeos que, quando operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica ou especifica um produto genético, faz com que o produto genético seja produzido em uma célula substancialmente apenas quando um indutor que corresponde ao promotor está presente na célula

[00129] Um promotor "específico de tecido" é uma sequência de nucleotídeos que, quando operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica ou é especificado por um gene, faz com que o produto do gene seja produzido em uma célula substancialmente apenas se a célula for uma célula do tipo de tecido correspondente ao promotor.

[00130] Pelo termo "liga-se especificamente", como utilizado neste documento, entende-se uma molécula como um anticorpo ou CAR que reconhece um antígeno específico, mas não reconhece ou se liga substancialmente a outras moléculas em uma amostra ou em um sujeito. Por exemplo, um anticorpo que liga especificamente a um antígeno de uma espécie também pode ligar a esse antígeno de uma ou mais outras espécies. Porém, essa reatividade de espécies cruzadas não altera por si só a classificação de um anticorpo como específico. Em outro exemplo, um anticorpo que liga especificamente a um antígeno também pode ligar a diferentes formas alélicas do antígeno. No entanto, essa reatividade cruzada por si só não altera a classificação de um anticorpo como

específico. Em alguns casos, os termos “ligação específica” ou “ligando de forma específica” podem ser usados em referência à interação de um anticorpo, uma proteína ou um peptídeo com uma segunda espécie química, para significar que a interação é dependente da presença de uma estrutura particular (por exemplo, um determinante antigênico ou epítopo) na espécie química; por exemplo, um anticorpo reconhece e se liga a uma estrutura de proteína específica em vez de às proteínas em geral. Se um anticorpo é específico para o epítopo “A”, a presença de uma molécula contendo o epítopo A (ou livre, A não marcado), em uma reação contendo “A” marcado e o anticorpo, irá reduzir a quantidade de “A’ marcado ligado ao anticorpo.

[00131] O termo “transfectado” ou “transformado” ou “transduzido”, como utilizado neste documento, refere-se a um processo pelo qual o ácido nucleico exógeno é transferido ou introduzido na célula hospedeira. Uma célula “transfectada” ou “transformada” ou “transduzida” é aquela que foi transfectada, transformada ou transduzida com ácido nucleico exógeno. A célula inclui a célula principal e sua progênie.

[00132] A frase “sob controle da transcrição” ou “operacionalmente ligado”, como utilizada neste documento, significa que o promotor está na localização e orientação corretas em relação a um polinucleotídeo para controlar a iniciação da transcrição pela RNA polimerase e a expressão do polinucleotídeo.

[00133] Um “vetor” é uma composição de matéria que compreende um ácido nucleico isolado e que pode ser usada para distribuir o ácido nucleico isolado ao interior de uma célula. Numerosos vetores são conhecidos na técnica, incluindo, mas sem limitação, polinucleotídeos lineares, polinucleotídeos associados a compostos iônicos ou anfifílicos, plasmídeos e vírus. Assim, o termo vetor inclui um plasmídeo de replicação autônoma ou um vírus. O termo também deve ser interpretado como incluindo compostos não plasmídicos e não virais que facilitam a transferência de ácido nucleico para as células, tais como, por exemplo, compostos de polilisina, lipossomas e semelhantes. Exemplos de vetores

virais incluem, mas sem limitação, vetores adenovirais, vetores de vírus adenoassociados, vetores retrovirais e semelhantes.

Descrição

[00134] A presente invenção fornece composições e métodos para o tratamento de câncer entre outras doenças. O câncer pode ser um tumor sólido, um tumor primário ou metatastizante. Em uma modalidade, o câncer é um câncer que expressa CLDN6. Em uma modalidade, o câncer é selecionado do grupo que consiste em câncer de ovário, em particular adenocarcinoma de ovário e teratocarcinoma de ovário, câncer de pulmão, incluindo câncer de pulmão de células pequenas (SCLC) e câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), em particular carcinoma de células escamosas do pulmão e adenocarcinoma, câncer gástrico, câncer de mama, câncer hepático, câncer de pâncreas, câncer de pele, em particular carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, câncer de cabeça e pescoço, em particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, em particular sarcoma sinovial e carcinossarcoma, câncer do ducto biliar, câncer da bexiga urinária, em particular carcinoma de células transicionais e carcinoma papilar, câncer de rim, em particular carcinoma de células renais, incluindo carcinoma de células renais de células claras e carcinoma de células renais papilares, câncer de cólon, câncer do intestino delgado, incluindo câncer do íleo, em particular adenocarcinoma do intestino delgado e adenocarcinoma do íleo, carcinoma embrionário testicular, coriocarcinoma placentário, câncer cervical, câncer testicular, em particular seminoma testicular, teratoma testicular e câncer testicular embrionário, câncer uterino, tumores de células germinativas, como um teratocarcinoma ou um carcinoma embrionário, em particular tumores de células germinativas do testículo, e formas metastáticas dos mesmos. Em uma modalidade, a doença de câncer associada à expressão de CLDN6 é selecionada do grupo que

consiste em câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer de ovário metastático e câncer de pulmão metastático. De preferência, o câncer de ovário é um carcinoma ou um adenocarcinoma. De preferência, o câncer de pulmão é um carcinoma ou um adenocarcinoma e, de preferência, é câncer bronquiolar, tal como um carcinoma bronquiolar ou adenocarcinoma bronquiolar.

[00135] A presente invenção proporciona um receptor de antígeno quimérico (CAR) compreendendo um domínio extracelular e intracelular. O domínio extracelular compreende um elemento de ligação específico ao alvo, de outra forma referido como uma parte ou domínio de ligação ao antígeno. O domínio intracelular ou de outra forma o domínio citoplasmático compreende uma região de sinalização coestimulatória 4-1BB e uma parte da cadeia CD3-zeta. A região de sinalização coestimulatória 4-1BB refere-se a uma parte do CAR que compreende um domínio intracelular da molécula coestimulatória 4-1BB. As moléculas coestimulatórias são moléculas da superfície celular que não os receptores de antígenos ou seus ligandos, que são necessários para uma resposta eficiente dos linfócitos ao antígeno.

[00136] Entre o domínio extracelular e o domínio transmembranar do CAR, ou entre o domínio citoplasmático e o domínio transmembranar do CAR, pode ser incorporado um domínio ou região de espaçador. Em modalidades, um domínio espaçador fornece flexibilidade do domínio de ligação ao antígeno. Como utilizado neste documento, o termo “domínio espaçador” geralmente significa qualquer oligo- ou polipeptídeo que funciona para ligar o domínio transmembranar ao domínio extracelular ou ao domínio citoplasmático na cadeia polipeptídica. Um domínio espaçador pode compreender até 300 aminoácidos, preferencialmente 10 a 100 aminoácidos e com maior preferência 25 a 50 aminoácidos. Em modalidades, um domínio espaçador tem cerca de 10 a 300 aminoácidos, cerca de 10 a 200 aminoácidos, cerca de 10 a 175 aminoácidos, cerca de 10 a 150 aminoácidos, cerca de 10 a 125 aminoácidos, cerca de 10 a 100 aminoácidos, cerca de 10 a 75 aminoácidos, cerca de 10 a 50

aminoácidos, cerca de 10 a 40 aminoácidos, cerca de 10 a 30 aminoácidos, cerca de 10 a 20 aminoácidos ou cerca de 10 a 15 aminoácidos e incluindo qualquer número inteiro entre os pontos finais de qualquer um dos intervalos listados. Em algumas modalidades, o domínio espaçador é derivado de uma região de dobradiça de uma molécula do tipo imunoglobulina. Em modalidades, um domínio espaçador compreende toda ou uma parte da região de dobradiça de uma IgG1 humana, IgG2 humana, uma IgG3 humana ou uma IgG4 humana e pode conter uma ou mais substituições de aminoácidos. Em algumas modalidades, o domínio espaçador é derivado da sequência da região de dobradiça de CD8α.

[00137] Em uma modalidade, a invenção fornece uma célula (por exemplo, célula T) engenheirada para expressar um CAR, em que a célula engenheirada com CAR exibe uma propriedade antitumoral. O CAR da invenção, quando expresso em uma célula, é capaz de redirecionar o reconhecimento do antígeno com base na especificidade de ligação ao antígeno do CAR. Em uma modalidade, CLDN6 é expresso em células dos tipos de câncer aqui divulgados. A célula engenheirada por CAR, quando ligada a seu antígeno cognato, afeta uma célula tumoral para que a célula tumoral não cresça, seja levada a morrer ou de outra forma seja afetada de modo que a carga tumoral em um paciente seja diminuída ou eliminada.

[00138] De acordo com a invenção, uma fração de ligação ao antígeno CLDN6 é fundida através de um domínio de dobradiça derivado de CD8α com domínios intracelulares compreendendo uma combinação de um domínio de sinalização 4-1BB (CD137) e um domínio de sinalização CD3-zeta. A inclusão do domínio de sinalização 4-1BB (CD137) aumenta significativamente a atividade antitumoral e a persistência *in vivo* de células CAR T em comparação com uma célula CAR T de outra forma idêntica não projetada para expressar 4-1BB (CD137) (Milone M.C. *et al.*, (2009) Molecular Therapy 17 (8), 1453–1464).

Fração de ligação ao antígeno

[00139] O CAR da invenção compreende um elemento de ligação específico do alvo, de outra forma referido como uma fração de ligação ao antígeno ou domínio de ligação ao antígeno que geralmente faz parte do domínio extracelular do CAR. O domínio de ligação ao antígeno reconhece um ligando que atua como um marcador de superfície celular em células alvo associadas a um estado de doença particular. Especificamente, o CAR da invenção direciona o antígeno tumoral CLDN6 em uma célula tumoral.

[00140] Em uma modalidade, o domínio de ligação CLDN6 no CAR da invenção se liga especificamente ao CLDN6. Em uma modalidade, o CLDN6 ao qual o domínio de ligação CLDN6 no CAR da invenção se liga é expresso em uma célula cancerígena. Em uma modalidade, o CLDN6 é expresso na superfície de uma célula cancerígena. Em uma modalidade, o domínio de ligação CLDN6 se liga a um domínio extracelular ou a um epítopo em um domínio extracelular de CLDN6. Em uma modalidade, o domínio de ligação CLDN6 se liga a epítopos nativos de CLDN6 presentes na superfície de células vivas. Em uma modalidade, o domínio de ligação CLDN6 se liga à primeira alça extracelular de CLDN6, de preferência nas posições de aminoácidos 28 a 76 de CLDN6, ou à segunda alça extracelular de CLDN6, de preferência nas posições de aminoácidos 141 a 159 de CLDN6. Em modalidades particulares, o domínio de ligação CLDN6 se liga a um epítopo em CLDN6 que não está presente em CLDN9. De preferência, o domínio de ligação CLDN6 se liga a um epítopo em CLDN6 que não está presente em CLDN4 e/ou CLDN3. Com maior preferência, o domínio de ligação CLDN6 se liga a um epítopo no CLDN6 que não está presente em uma proteína CLDN diferente de CLDN6. O domínio de ligação CLDN6 se liga preferencialmente a CLDN6, mas, não a CLDN9 e preferencialmente não se liga a CLDN4 e/ou CLDN3. De preferência, o domínio de ligação CLDN6 é específico para CLDN6. De preferência, o domínio de ligação CLDN6 se liga a CLDN6 expresso na

superfície celular.

[00141] Em uma modalidade da invenção, um domínio de ligação ao antígeno CLDN6 compreende uma região variável de uma cadeia pesada de uma imunoglobulina (VH) com uma especificidade para CLDN6 e uma região variável de uma cadeia leve de uma imunoglobulina (VL) com uma especificidade para CLDN6 . Em uma modalidade, a referida região variável da cadeia pesada (VH) e a região variável da cadeia leve correspondente (VL) são conectadas através de um ligante peptídico, de preferência um ligante peptídico compreendendo a sequência de aminoácidos (GGGGS) 3.

[00142] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende uma região variável da cadeia pesada (VH) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 3, 5, 7 e 9 ou uma variante funcional da mesma.

[00143] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende uma região variável da cadeia leve (VL) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 e 24 ou uma variante funcional da mesma.

[00144] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende:

(i) uma região variável da cadeia pesada (VH) que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: x ou uma variante funcional da mesma, e

(ii) uma região variável da cadeia leve (VL) que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: x + 1 ou uma variante funcional da mesma;

em que x selecionado de 3, 5, 7 e 9.

[00145] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende:

(i) uma região variável da cadeia pesada (VH) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 3, 5, 7 e 9 ou uma variante funcional da mesma, e

(ii) uma região variável da cadeia leve (VL) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 e 24 ou uma variante funcional da mesma.

[00146] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende:

(i) uma região variável da cadeia pesada (VH) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 ou uma variante funcional da mesma, e

(ii) uma região variável da cadeia leve (VL) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 ou uma variante funcional da mesma.

[00147] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende:

(i) uma região variável da cadeia pesada (VH) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 ou uma variante funcional da mesma, e

(ii) uma região variável da cadeia leve (VL) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 ou uma variante funcional da mesma.

[00148] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende:

(i) uma região variável da cadeia pesada (VH) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 ou uma variante funcional da mesma, e

(ii) uma região variável da cadeia leve (VL) que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 ou uma variante funcional da mesma.

[00149] Em certas modalidades preferidas, um domínio de ligação para CLDN6 compreende uma combinação de região variável da cadeia pesada (VH) e região variável da cadeia leve (VL) selecionada das seguintes possibilidades (i) a (xi):

(i) a VH compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional, e o VL compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional,

(ii) a VH compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional, e o VL compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 6 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional,

(iii) a VH compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 7 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional, e o VL compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional,

(iv) a VH compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional, e o VL compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID

NO: 10 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional,

(iv) a VH compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional, e o VL compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional,

(vi) a VH compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional, e o VL compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 23 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional,

(vii) a VH compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional, e o VL compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 24 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional.

[00150] Em uma modalidade particularmente preferida, um domínio de ligação para CLDN6 compreende a seguinte combinação de região variável da cadeia pesada (VH) e região variável da cadeia leve (VL):

a VH compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da sequência de aminoácidos ou variante funcional, e o VL compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 24 ou uma variante funcional da mesma, ou um fragmento da

sequência de aminoácidos ou variante funcional.

[00151] O termo “fragmento” refere-se, em particular, a uma ou mais das regiões determinantes de complementaridade (CDRs), de preferência pelo menos a região variável de CDR3, da região variável da cadeia pesada (VH) e/ou da região variável da cadeia leve (VL). Em uma modalidade, as referidas uma ou mais das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) são selecionadas de um conjunto de regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3. Em uma modalidade particularmente preferida, o termo “fragmento” refere-se às regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável da cadeia pesada (VH) e/ou da região variável da cadeia leve (VL).

[00152] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreendendo uma ou mais CDRs, um conjunto de CDRs ou uma combinação de conjuntos de CDRs como aqui descrito compreende as referidas CDRs juntamente com suas regiões de estrutura intervenientes. De preferência, a parte também incluirá pelo menos cerca de 50% de uma ou ambas da primeira e quarta regiões de estrutura, sendo os 50% os 50% C-terminais da primeira região de estrutura e os 50% N-terminais da quarta região de estrutura. A construção de domínios de ligação feitos por técnicas de DNA recombinante pode resultar na introdução de resíduos N- ou C-terminais para as regiões variáveis codificadas por ligantes introduzidos para facilitar a clonagem ou outras etapas de manipulação, incluindo a introdução de ligantes para juntar regiões variáveis ou juntar regiões variáveis para sequências de proteínas adicionais, incluindo sequências como aqui descrito.

[00153] Em uma modalidade, um domínio de ligação compreendendo uma ou mais CDRs, um conjunto de CDRs ou uma combinação de conjuntos de CDRs conforme descrito neste documento compreende as referidas CDRs em uma estrutura de anticorpo humano.

[00154] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende uma região variável da cadeia pesada (VH) compreendendo

pelo menos uma, de preferência duas, com maior preferência todas as três sequências de CDR de uma região variável da cadeia pesada (VH) aqui descritas, por exemplo, de um região variável da cadeia pesada (VH) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 3, 5, 7 e 9 ou uma variante funcional da mesma.

[00155] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende uma região variável da cadeia leve (VL) compreendendo pelo menos uma, de preferência duas, com maior preferência todas as três sequências de CDR de uma região variável da cadeia leve (VL) aqui descrita, por exemplo, de uma região variável da cadeia leve (VL) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 e 24 ou uma variante funcional da mesma.

[00156] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende:

(i) uma região variável da cadeia pesada (VH) que compreende pelo menos uma, de preferência duas, com maior preferência todas as três das sequências CDR de uma região variável da cadeia pesada (VH) de uma combinação de região variável da cadeia pesada (VH) e região variável da cadeia leve (VL) aqui descrita, por exemplo, uma combinação em que a VH compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 ou uma variante funcional da mesma, e o VL compreende uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 6 ou uma variante funcional da mesma, e

(ii) uma região variável da cadeia leve (VL) compreendendo pelo menos uma, de preferência duas, com maior preferência todas as três das sequências CDR de uma região variável da cadeia leve (VL) da combinação de região variável da cadeia pesada (VH) e região variável da cadeia leve (VL) aqui descrita.

[00157] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende:

(i) uma região variável da cadeia pesada (VH) compreendendo pelo menos uma, de preferência duas, com maior preferência todas as três das sequências CDR de uma região variável da cadeia pesada (VH) de SEQ ID NO: x, ou uma variante funcional da mesma, e

(ii) uma região variável da cadeia leve (VL) compreendendo pelo menos uma, de preferência duas, com maior preferência todas as três das sequências CDR de uma região variável da cadeia leve (VL) de SEQ ID NO: x + 1, ou uma variante funcional da mesma;

em que x selecionado de 3, 5, 7 e 9.

[00158] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende:

(i) uma região variável da cadeia pesada (VH) compreendendo pelo menos uma, de preferência duas, com maior preferência todas as três das sequências CDR de uma região variável da cadeia pesada (VH) de SEQ ID NO: 5, ou uma variante funcional da mesma, e

(ii) uma região variável da cadeia leve (VL) compreendendo pelo menos uma, de preferência duas, com maior preferência todas as três das sequências CDR de uma região variável da cadeia leve (VL) de SEQ ID NO: 6, ou uma variante funcional da mesma.

[00159] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende:

(i) uma região variável da cadeia pesada (VH) compreendendo pelo menos uma, de preferência duas, com maior preferência todas as três das sequências CDR de uma região variável da cadeia pesada (VH)

de SEQ ID NO: 5, ou uma variante funcional da mesma, e

(ii) uma região variável da cadeia leve (VL) compreendendo pelo menos uma, de preferência duas, com maior preferência todas as três das sequências CDR de uma região variável da cadeia leve (VL) de SEQ ID NO: 4, ou uma variante funcional da mesma.

[00160] O termo “pelo menos uma, de preferência duas, com maior preferência todas as três sequências CDR” refere-se preferencialmente a pelo menos a sequência CDR3, opcionalmente em combinação com a sequência CDR1 e/ou a sequência CDR2.

[00161] CDR1 de uma região variável da cadeia pesada (VH) selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 3, 5, 7 e 9 inclui preferencialmente os aminoácidos 26 a 33 das sequências mostradas em SEQ ID NOs: 3, 5, 7 e 9, respectivamente. CDR2 de uma região variável da cadeia pesada (VH) selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 3, 5, 7 e 9 inclui preferencialmente os aminoácidos 51 a 58 das sequências mostradas em SEQ ID NOs: 3, 5, 7 e 9, respectivamente. CDR3 de uma região variável da cadeia pesada (VH) selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 3, 5, 7 e 9 inclui preferencialmente os aminoácidos 97 a 106 das sequências mostradas em SEQ ID NOs: 3, 5, 7 e 9, respectivamente.

[00162] CDR1 de uma região variável da cadeia leve (VL) selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 e 24 inclui preferencialmente os aminoácidos 27 a 31 das sequências mostradas em SEQ ID NOs: 4, 6 , 8, 10, 23 e 24, respectivamente. CDR2 de uma região variável da cadeia leve (VL) selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 e 24 inclui preferencialmente os aminoácidos 49 a 51 das sequências mostradas em SEQ ID NOs: 4, 6 , 8, 10, 23 e 24, respectivamente. CDR3 de uma região variável da cadeia leve (VL) selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 e 24 inclui preferencialmente os aminoácidos 88 a 97 das sequências

mostradas em SEQ ID NOs: 4, 6 , 8, 10, 23 e 24, respectivamente.

[00163] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende uma região variável da cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência CDR3 Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, em que Xaa1 é qualquer aminoácido, preferencialmente um aminoácido aromático, com maior preferência Phe ou Tyr, com maior preferência Tyr , Xaa2 é qualquer aminoácido, preferencialmente um aminoácido aromático, com maior preferência Phe ou Tyr, com maior preferência Tyr, e Xaa3 é qualquer aminoácido, preferencialmente Leu ou Phe, com maior preferência Leu. Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) que compreende a sequência CDR3 Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 ou Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, em que Xaa1, Xaa2 e Xaa3 são conforme definido acima. Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência CDR3 Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, em que Xaa1, Xaa2 e Xaa3 são conforme definido acima. Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) que compreende a sequência CDR3 Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr, em que Xaa1, Xaa2 e Xaa3 são conforme definido acima. Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 de acordo com as modalidades anteriores compreende uma região variável da cadeia pesada (VH) que compreende a sequência CDR1 de acordo com SEQ ID NO: 16 ou uma variante funcional da mesma e/ou a sequência CDR2 de acordo com SEQ ID NO : 17 ou uma variante funcional da mesma.

[00164] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende uma região variável da cadeia leve (VL) compreendendo a sequência CDR3 Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro, em que Xaa1 é qualquer aminoácido, preferencialmente Ser ou Asn, com maior preferência Ser, Xaa2 é qualquer aminoácido, preferencialmente Tyr, Ser, Ile, Asn ou Thr, com maior preferência Tyr, Ser ou Asn, com maior preferência Asn, e Xaa3 é qualquer aminoácido, preferencialmente Ser ou Tyr, com maior

preferência Tyr. Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende uma região variável da cadeia leve (VL) compreendendo sequência CDR3 Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro, em que Xaa1, Xaa2 e Xaa3 são conforme definido acima. Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende uma região variável da cadeia leve (VL) compreendendo a sequência CDR3 Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr, em que Xaa1, Xaa2 e Xaa3 são conforme definido acima. Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 de acordo com as modalidades anteriores compreende uma região variável da cadeia leve (VL) que compreende a sequência CDR1 de acordo com SEQ ID NO: 21 ou uma variante funcional da mesma e/ou a sequência CDR2 de acordo com SEQ ID NO : 22 ou uma variante funcional da mesma.

[00165] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compreende:

(i) uma região variável da cadeia pesada (VH) que compreende uma sequência CDR3 selecionada do grupo que consiste em Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, e Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr, em que Xaa1 é qualquer aminoácido, preferencialmente um aminoácido aromático, com maior preferência Phe ou Tyr, com maior preferência Tyr, Xaa2 é qualquer aminoácido, preferencialmente um aminoácido aromático, com maior preferência Phe ou Tyr, com maior preferência Tyr, e Xaa3 é qualquer aminoácido, preferencialmente Leu ou Phe, com maior preferência Leu, e

(ii) uma região variável da cadeia leve (VL) que compreende uma sequência de CDR3 selecionada do grupo que consiste em Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro, Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro, Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr, em que Xaa1 é qualquer aminoácido, preferencialmente Ser ou Asn, com maior preferência Ser, Xaa2 é qualquer aminoácido, preferencialmente Tyr, Ser, Ile, Asn ou Thr, com

maior preferência Tyr, Ser ou Asn, com maior preferência Asn, e Xaa3 é qualquer aminoácido, preferencialmente Ser ou Tyr, com maior preferência Tyr.

[00166] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 de acordo com as modalidades anteriores compreende (i) uma região variável da cadeia pesada (VH) que compreende a sequência CDR1 de acordo com SEQ ID NO: 16 ou uma variante funcional da mesma e/ou a sequência CDR2 de acordo com SEQ ID NO: 17 ou uma variante funcional da mesma e/ou (ii) uma região variável da cadeia leve (VL) que compreende a sequência CDR1 de acordo com SEQ ID NO: 21 ou uma variante funcional da mesma e/ou a sequência CDR2 de acordo com SEQ ID NO: 22 ou uma variante funcional da mesma.

[00167] Em uma modalidade, um domínio de ligação para CLDN6 compete pela ligação de CLDN6 com um domínio de ligação para CLDN6 descrito acima e/ou tem a especificidade para CLDN6 de um domínio de ligação para CLDN6 descrito acima. Nesta e em outras modalidades, um domínio de ligação para CLDN6 pode ser altamente homólogo a um domínio de ligação para CLDN6 descrito acima. É contemplado que um domínio de ligação preferido para CLDN6 tem regiões CDR idênticas ou altamente homólogas às regiões CDR de um domínio de ligação para CLDN6 descrito acima. Por “altamente homólogo” é contemplado que de 1 a 5, de preferência de 1 a 4, tal como 1 a 3 ou 1 ou 2 substituições podem ser feitas em cada região CDR.

[00168] O termo “competir” refere-se à competição entre duas moléculas de ligação para a ligação a um antígeno alvo. Se duas moléculas de ligação não se bloqueiam para a ligação a um antígeno alvo, tais moléculas de ligação não competem e isso é uma indicação de que as referidas moléculas de ligação não se ligam à mesma parte, isto é, epítopo, do antígeno alvo. É bem conhecido por um versado na técnica como testar a competição de moléculas de ligação, tais como anticorpos para ligação a um antígeno alvo. Um exemplo de tal método é o

denominado ensaio de competição cruzada, que pode, por exemplo, ser realizado como um ELISA ou por citometria de fluxo. Por exemplo, um ensaio baseado em ELISA pode ser realizado revestindo os poços da placa de ELISA com um dos anticorpos; adicionando o anticorpo competidor e antígeno/alvo marcado com His e detectando se o anticorpo adicionado inibiu a ligação do antígeno marcado com His ao anticorpo revestido, por exemplo, adicionando anticorpo anti-His biotinilado, seguido por Estreptavidina-poli-HRP, e ainda desenvolvendo a reação com ABTS e medindo a absorbância em 405 nm. Por exemplo, um ensaio de citometria de fluxo pode ser realizado incubando células que expressam o antígeno/alvo com um excesso de anticorpo não marcado, incubando as células com uma concentração subideal de anticorpo marcado com biotina, seguido de incubação com estreptavidina marcada com fluorescência e análise por citometria de fluxo.

[00169] Duas moléculas de ligação têm a “mesma especificidade” se ligam ao mesmo antígeno e ao mesmo epítopo. Pode-se testar se uma molécula a ser testada reconhece o mesmo epítopo como uma determinada molécula de ligação, ou seja, se as moléculas de ligação se ligam ao mesmo epítopo, por diferentes métodos conhecidos pelo versado, por exemplo, com base na competição das moléculas de ligação, tais como anticorpos para o mesmo epítopo. A competição entre as moléculas de ligação pode ser detectada por um ensaio de bloqueio cruzado. Por exemplo, um ensaio ELISA competitivo pode ser usado como um ensaio de bloqueio cruzado. Por exemplo, o antígeno alvo pode ser revestido nos poços de uma placa de microtitulação e o anticorpo de ligação ao antígeno e o anticorpo de teste competidor candidato podem ser adicionados. A quantidade do anticorpo de ligação ao antígeno ligado ao antígeno no poço se correlaciona indiretamente com a capacidade de ligação do anticorpo de teste competidor candidato que compete com ele pela ligação ao mesmo epítopo. Especificamente, quanto maior for a afinidade do anticorpo de teste competidor candidato para o mesmo epítopo, menor será a quantidade do anticorpo de ligação ao antígeno ligado ao poço

revestido com antígeno. A quantidade do anticorpo de ligação ao antígeno ligado ao poço pode ser medida marcando o anticorpo com substâncias de marcação detectáveis ou mensuráveis.

[00170] De preferência, a fração de fração de ligação ao antígeno no CAR da invenção é scFV anti-CLDN6, em que o scFV anti-CLDN6 compreende preferencialmente a sequência estabelecida em SEQ ID NO: 35 ou uma variante funcional da mesma.

Domínio transmembranar

[00171] O CAR da invenção é projetado para compreender um domínio transmembranar que é fundido ao domínio extracelular do CAR. Em uma modalidade, o domínio transmembranar não está naturalmente associado a um dos domínios no CAR. Em uma modalidade, o domínio transmembranar está naturalmente associado a um dos domínios no CAR. Em uma modalidade, o domínio transmembranar é modificado por substituição de aminoácidos para evitar a ligação de tais domínios aos domínios transmembranares das mesmas ou diferentes proteínas da membrana de superfície para minimizar as interações com outros membros do complexo receptor. O domínio transmembranar pode ser derivado de uma fonte natural ou de uma fonte sintética. Onde a fonte é natural, o domínio pode ser derivado de qualquer proteína ligada à membrana ou transmembrana. As regiões transmembranares de uso particular nesta invenção podem ser derivadas (ou seja, compreender pelo menos a(s) região(ões) transmembranar(es) da cadeia alfa, beta ou zeta do receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Alternativamente, o domínio transmembranar pode ser sintético, caso em que compreenderá predominantemente resíduos hidrofóbicos, como leucina e valina. Preferivelmente, um tripleto de fenilalanina, triptofano e valina será encontrado em cada extremidade de um domínio transmembranar sintético.

[00172] De preferência, o domínio transmembranar no CAR da invenção é o domínio transmembranar CD8α. Em uma modalidade, o domínio transmembranar CD8α compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 ou uma variante funcional da mesma.

[00173] Em alguns casos, o CAR da invenção compreende o domínio de dobradiça CD8α que forma a ligação entre o domínio transmembranar e o domínio extracelular. Em uma modalidade, o domínio de dobradiça CD8α compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 ou uma variante funcional da mesma.

Domínio citoplasmático

[00174] O domínio citoplasmático ou de outra forma o domínio de sinalização intracelular do CAR da invenção é responsável pela ativação de pelo menos uma das funções efetoras normais da célula imune na qual o CAR foi colocado. O termo “função efetora” refere-se a uma função especializada de uma célula. A função efetora de uma célula T, por exemplo, pode ser atividade citolítica ou atividade auxiliar, incluindo a secreção de citocinas. Assim, o termo “domínio de sinalização intracelular” refere-se à parte de uma proteína que transduz o sinal da função efetora e direciona a célula para realizar uma função especializada. Embora geralmente todo o domínio de sinalização intracelular possa ser empregado, em muitos casos, não é necessário usar toda a cadeia. Na medida em que uma parte truncada do domínio de sinalização intracelular é usada, essa parte truncada pode ser usada no lugar da cadeia intacta, desde que transduza o sinal da função efetora. O termo domínio de sinalização intracelular pretende, portanto, incluir qualquer parte truncada do domínio de sinalização intracelular suficiente para transduzir o sinal da função efetora.

[00175] Sabe-se que os sinais gerados apenas pelo TCR são insuficientes para a ativação completa da célula T e que um sinal secundário ou coestimulatório também é necessário. Assim, pode-se

dizer que a ativação de células T é mediada por duas classes distintas de sequência de sinalização citoplasmática: aquelas que iniciam a ativação primária dependente de antígeno através do TCR (sequências primárias de sinalização citoplasmática) e aquelas que atuam de uma maneira independente de antígeno para fornecer um sinal secundário ou coestimulatório (sequências secundárias de sinalização citoplasmática).

[00176] O CAR da invenção compreende uma sequência de sinalização citoplasmática primária derivada de CD3-zeta. Além disso, o domínio citoplasmático do CAR da invenção é projetado para compreender o domínio de sinalização CD3-zeta combinado com uma região de sinalização coestimulatória derivada de 4-1BB.

[00177] O termo "4-1BB" refere-se a uma proteína receptora de membrana também denominada CD137, que é um membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) expressa na superfície de células T ativadas como um tipo de molécula acessória. 4-1BB tem um peso molecular de 55 kDa e é encontrado como um homodímero.

[00178] A cadeia CD3-zeta da glicoproteína de superfície das células T, também conhecida como cadeia zeta do receptor T3 das células T ou CD247, é uma proteína que em humanos é codificada pelo gene CD247. O receptor de células T zeta (ζ), junto com os heterodímeros do receptor de células T alfa/beta e gama/delta e CD3-gama, -delta e -epsilon, formam o complexo receptor de células T-CD3. A cadeia zeta desempenha um papel importante no reconhecimento de antígeno de acoplamento a várias vias de transdução de sinal intracelular. A baixa expressão do antígeno resulta em resposta imune prejudicada.

[00179] As sequências de sinalização citoplasmática dentro da parte de sinalização citoplasmática do CAR da invenção podem ser ligadas umas às outras em uma ordem aleatória ou especificada. Opcionalmente, um ligante oligo- ou polipeptídico curto, de preferência entre 2 e 10 aminoácidos de comprimento, pode formar a ligação. Um dupleto de glicina-serina fornece um ligante particularmente adequado.

[00180] Assim, o domínio citoplasmático no CAR da invenção é projetado para compreender o domínio de sinalização de CD3-zeta e o domínio de sinalização de 4-1BB. Em uma modalidade, o domínio citoplasmático no CAR da invenção é projetado para compreender o domínio de sinalização de 4-1BB e o domínio de sinalização de CD3-zeta, em que o domínio de sinalização de 4-1BB compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 ou uma variante funcional da mesma e o domínio de sinalização de CD3-zeta compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 31 ou uma variante funcional da mesma.

[00181] Em uma modalidade, o CAR da invenção compreende um peptídeo sinal que direciona a proteína nascente para o retículo endoplasmático. Em uma modalidade, o peptídeo sinal precede o domínio de ligação ao antígeno. Em uma modalidade, o peptídeo sinal é derivado de uma imunoglobulina, como IgG. Em uma modalidade, o peptídeo sinal compreende a sequência de acordo com a SEQ ID NO: 25 ou uma variante funcional da mesma.

[00182] Em uma modalidade, um CAR da invenção compreende os seguintes elementos na seguinte ordem: domínio de ligação ao antígeno NH2 – CLDN6 - domínio transmembranar – domínio coestimulatório 4-1BB - domínio de sinalização CD3 – COOH.

[00183] Em uma modalidade, um CAR da invenção compreende os seguintes elementos na seguinte ordem: domínio de ligação ao antígeno NH2 – CLDN6 - dobradiça CD8α - domínio transmembranar CD8α – domínio coestimulatório 4-1BB - domínio de sinalização CD3-zeta – COOH.

[00184] Em uma modalidade, o CAR da invenção compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 ou uma variante funcional da mesma.

Vetores

[00185] A presente invenção abrange um construto de ácido nucleico,

tal como um construto de DNA compreendendo sequências que codificam um CAR da invenção.

[00186] A presente invenção também fornece vetores nos quais um DNA da presente invenção é inserido. Vetores derivados de retrovírus, como o lentivírus, são ferramentas adequadas para alcançar a transferência de genes de longo prazo, uma vez que permitem a integração estável de longo prazo de um transgene e sua propagação em células-filhas. Os vetores lentivirais têm a vantagem adicional sobre os vetores derivados de onco-retrovírus, como os vírus da leucemia murina, na medida em que podem transduzir células não proliferantes, como os hepatócitos. Eles também têm a vantagem adicional de baixa imunogenicidade.

[00187] Em breve resumo, a expressão de ácidos nucleicos naturais ou sintéticos que codificam CARs é tipicamente alcançada ligando operacionalmente um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo CAR ou partes do mesmo a um promotor e incorporando o construto em um vetor de expressão. Os vetores podem ser adequados para replicação e integração em eucariotos. Os vetores de clonagem típicos contêm terminadores de transcrição e tradução, sequências de iniciação e promotores úteis para a regulação da expressão da sequência de ácido nucleico desejada.

[00188] O ácido nucleico da invenção pode ser clonado em vários tipos de vetores. Por exemplo, o ácido nucleico pode ser clonado em um vetor incluindo, entre outros, um plasmídeo, um fagoide, um derivado de fago, um vírus animal e um cosmídeo ou um transposon. Os vetores de interesse particular incluem vetores de expressão, vetores de replicação, vetores de geração de sonda e vetores de sequenciamento. Além disso, um vetor de expressão pode ser fornecido a uma célula na forma de um vetor viral. A tecnologia do vetor viral é bem conhecida na técnica e é descrita, por exemplo, em Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) e em outros manuais de virologia e biologia molecular. Os vírus, que são úteis

como vetores, incluem, entre outros, retrovírus, adenovírus, vírus adenoassociados, vírus do herpes e lentivírus. Em geral, um vetor adequado contém uma origem de replicação funcional em pelo menos um organismo, uma sequência promotora, sítios de endonuclease de restrição convenientes e um ou mais marcadores selecionáveis (por exemplo, WO 01/96584; WO 01/29058; e Pat. U.S. 6.326.193).

[00189] Vários sistemas baseados em vírus foram desenvolvidos para transferência de genes para células de mamíferos. Por exemplo, os retrovírus fornecem uma plataforma conveniente para sistemas de distribuição de genes. Um gene selecionado pode ser inserido em um vetor e empacotado em partículas retrovirais usando técnicas conhecidas na técnica. O vírus recombinante pode então ser isolado e entregue às células do sujeito *in vivo* ou *ex vivo*. Vários sistemas retrovirais são conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, vetores de adenovírus são usados. Vários vetores de adenovírus são conhecidos na técnica. Em uma modalidade, vetores de lentivírus são usados.

[00190] Elementos promotores adicionais, por exemplo, intensificadores, regulam a frequência do início da transcrição. Normalmente, eles estão localizados na região 30-110 pb a montante do local de início, embora vários tenha sido demonstrado recentemente promotores que contêm elementos funcionais a jusante do local de início. O espaçamento entre os elementos promotores é frequentemente flexível, de modo que a função do promotor seja preservada quando os elementos são invertidos ou movidos em relação um ao outro. No promotor da timidina quinase (tk), o espaçamento entre os elementos do promotor pode ser aumentado para 50 bp antes que a atividade comece a diminuir. Dependendo do promotor, parece que os elementos individuais podem funcionar de forma cooperativa ou independente para ativar a transcrição. Um exemplo de um promotor adequado é a sequência promotora imediata do citomegalovírus (CMV). Esta sequência promotora é uma sequência promotora constitutiva forte capaz de conduzir altos níveis de expressão de qualquer sequência polinucleotídica

operacionalmente ligada a ela. Outro exemplo de um promotor adequado é o Fator de Crescimento de Alongamento-1α (EF-1α). No entanto, outras sequências promotoras constitutivas também podem ser utilizadas incluindo, entre outras, o promotor inicial do vírus símio 40 (SV40), vírus de tumor mamário de camundongo (MMTV), promotor de repetição terminal (LTR) longo do vírus de imunodeficiência humana (HIV), promotor MoMuLV, promotor do vírus da leucemia aviária, promotor precoce imediato do vírus Epstein-Barr, promotor do vírus de sarcoma de Rous , bem como promotores de genes humanos como, mas sem limitação, o promotor de actina, o promotor de miosina, promotor de hemoglobina e promotor de creatina quinase. Além disso, a invenção não deve ser limitada ao uso de promotores constitutivos, promotores induzíveis também são contemplados como parte da invenção. A utilização de um promotor induzível proporciona um interruptor molecular capaz de ligar a expressão da sequência polinucleotídica que está operacionalmente ligada quando tal expressão é desejada, ou desligar a expressão quando a expressão não é desejada. Exemplos de promotores induzíveis incluem, entre outros, um promotor de metalotionina, um promotor de glicocorticoide, um promotor de progesterona e um promotor de tetraciclina.

[00191] A fim de avaliar a expressão de um polipeptídeo CAR ou de partes dele, o vetor de expressão a ser introduzido em uma célula também pode conter um gene marcador selecionável ou um gene repórter ou ambos para facilitar a identificação e seleção de células que expressam a população de células procurou ser transfectado ou infectado através de vetores virais. Em outros aspectos, o marcador selecionável pode ser carregado em um pedaço separado de DNA e usado em um procedimento de cotransfecção. Tanto os marcadores selecionáveis quanto os genes repórter podem ser flanqueados com sequências regulatórias apropriadas para permitir a expressão nas células hospedeiras. Marcadores selecionáveis úteis incluem, por exemplo, genes de resistência a antibióticos, como neo e semelhantes.

[00192] Os genes repórter são utilizados para identificar células potencialmente transfectadas e para avaliar a funcionalidade de sequências regulatórias. Em geral, um gene repórter é um gene que não está presente ou é expresso pelo organismo ou tecido receptor e que codifica um polipeptídeo cuja expressão se manifesta por alguma propriedade facilmente detectável, por exemplo, atividade enzimática. A expressão do gene repórter é ensaiada em um momento adequado após o DNA ter sido introduzido nas células receptoras. Os genes repórter adequados podem incluir genes que codificam luciferase, beta-galactosidase, cloranfenicol acetil transferase, fosfatase alcalina segregada ou o gene da proteína fluorescente verde. Os sistemas de expressão adequados são bem conhecidos e podem ser preparados utilizando técnicas conhecidas ou obtidas comercialmente.

[00193] Os métodos de introduzir e expressar genes em uma célula são conhecidos na técnica. No contexto de um vetor de expressão, o vetor pode ser prontamente introduzido em uma célula hospedeira, por exemplo, célula de mamífero, bacteriana, de levedura ou de inseto por qualquer método na técnica. Por exemplo, o vetor de expressão pode ser transferido para uma célula hospedeira por meios físicos, químicos ou biológicos.

[00194] Os métodos físicos para a introdução de um polinucleotídeo em uma célula hospedeira incluem precipitação com fosfato de cálcio, lipofecção, bombardeio de partículas, microinjeção, eletroporação e semelhantes. Um método preferido para a introdução de um polinucleotídeo em uma célula hospedeira é transfecção de fosfato de cálcio.

[00195] Os métodos biológicos para a introdução de um polinucleotídeo de interesse em uma célula hospedeira incluem o uso de vetores de DNA e RNA. Os vetores virais, e especialmente os vetores retrovirais, tornaram-se o método mais amplamente usado para inserir genes em mamíferos, por exemplo, células humanas. Outros vetores virais podem ser derivados de lentivírus, poxvírus, vírus do herpes

simplex I, adenovírus e vírus adenoassociados, e semelhantes.

[00196] Os meios químicos para a introdução do polinucleotídeo em uma célula hospedeira incluem sistemas de dispersão coloidal, tais como complexos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, grânulos e sistemas à base de lipídeos, incluindo emulsões óleo em água, micelas, micelas misturadas e lipossomas. Um sistema coloidal exemplificativo para uso como veículo de distribuição *in vitro* e *in vivo* é um lipossoma (por exemplo, uma vesícula de membrana artificial).

Células

[00197] As células utilizadas em conexão com o sistema CAR da presente invenção e nas quais os ácidos nucleicos (DNA ou RNA) que codificam o sistema CAR da presente invenção podem ser introduzidos incluem qualquer célula com potencial lítico, em particular células linfoides, e são preferencialmente células T, em particular linfócitos citotóxicos, preferencialmente selecionados de células T citotóxicas, células assassinas naturais (NK) e células assassinas ativadas por linfocina (LAK). Após a ativação, cada um desses linfócitos citotóxicos desencadeia a destruição das células-alvo. Por exemplo, as células T citotóxicas desencadeiam a destruição das células alvo por um ou ambos os seguintes meios. Primeiro, após a ativação, as células T liberam citotoxinas, como perforina, granzimas e granulisina. A perforina e a granulisina criam poros na célula-alvo e as granzimas entram na célula e desencadeiam uma cascata de caspases no citoplasma que induz a apoptose (morte celular programada) da célula. Em segundo lugar, a apoptose pode ser induzida por meio da interação do ligando Fas-Fas entre as células T e as células alvo. Os linfócitos citotóxicos serão preferencialmente células autólogas, embora possam ser utilizadas células heterólogas ou células alogênicas.

[00198] Os termos “célula T” e “linfócito T” são usados indistintamente aqui e incluem células T auxiliares (células T CD4+) e

células T citotóxicas (CTLs, células T CD8+) que compreendem células T citolíticas. O termo “célula T específica para o antígeno” ou termos semelhantes referem-se a uma célula T que reconhece o antígeno ao qual a célula T é direcionada e, de preferência, exerce funções efetoras das células T. As células T são consideradas específicas para o antígeno se as células matam as células-alvo que expressam um antígeno. A especificidade das células T pode ser avaliada usando qualquer uma de uma variedade de técnicas padrão, por exemplo, dentro de um ensaio de liberação de cromo ou ensaio de proliferação. Alternativamente, a síntese de linfocinas (como interferon-γ) pode ser medida.

[00199] Como utilizado neste documento, o termo “célula NK” ou “célula natural assassina” refere-se a um subconjunto de linfócitos do sangue periférico definido pela expressão de CD56 ou CD16 e a ausência do receptor de células T (CD3). Como utilizado neste documento, a célula NK também pode ser diferenciada de uma célula-tronco ou célula progenitora.

[00200] O termo “funções efetoras” no contexto da presente invenção inclui quaisquer funções mediadas por componentes do sistema imunológico que resultam, por exemplo, na morte de células doentes, como células tumorais, ou na inibição do crescimento tumoral e/ou inibição do desenvolvimento do tumor, incluindo a inibição da disseminação do tumor e metástases. De preferência, as funções efetoras no contexto da presente invenção são funções efetoras mediadas por células T. Tais funções compreendem no caso de uma célula T auxiliar (célula T $CD4^+$) a liberação de citocinas e/ou a ativação de linfócitos $CD8^+$ (CTLs) e/ou células B, e no caso de CTL a eliminação de células, ou seja, células caracterizadas pela expressão de um antígeno, por exemplo, via apoptose ou lise celular mediada por perforina, produção de citocinas, como IFN-γ e TNF-α, e morte citolítica específica de células alvo que expressam antígeno.

[00201] O termo “célula efetora imune” ou “célula imunorreativa” no contexto da presente invenção refere-se a uma célula que exerce funções

efetoras durante uma reação imune. Uma “célula efetora imune” preferencialmente é capaz de se ligar a um antígeno, tal como um antígeno expresso na superfície de uma célula e mediar uma resposta imune. Por exemplo, células efetoras imunes compreendem células T (células T citotóxicas, células T auxiliares, células T que se infiltram em tumor), células B, células assassinas naturais, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. De preferência, no contexto da presente invenção, “células efetoras imunes” são células T, de preferência células T $CD4^+$ e/ou $CD8^+$. De acordo com a invenção, o termo “célula efetora imune” também inclui uma célula que pode amadurecer em uma célula imune (tal como célula T, em particular célula T auxiliar ou célula T citolítica) com estimulação adequada. As células efetoras imunes compreendem células-tronco hematopoiéticas $CD34^+$, células T imaturas e maduras e células B imaturas e maduras. A diferenciação de precursores de células T em uma célula T citolítica, quando exposta a um antígeno, é semelhante à seleção clonal do sistema imunológico.

[00202] De preferência, uma “célula efetora imune” reconhece um antígeno com algum grau de especificidade, em particular se presente na superfície de células doentes, como células cancerígenas. De preferência, o referido reconhecimento permite que a célula que reconhece um antígeno seja responsiva ou reativa. Se a célula for uma célula T auxiliar (célula T $CD4^+$), tal responsividade ou reatividade pode envolver a liberação de citocinas e/ou a ativação de linfócitos $CD8^+$ (CTLs) e/ou células B. Se a célula for um CTL, tal responsividade ou reatividade pode envolver a eliminação de células, isto é, células caracterizadas pela expressão de um antígeno, por exemplo, via apoptose ou lise celular mediada por perforina. De acordo com a invenção, a responsividade de CTL pode incluir fluxo de cálcio sustentado, divisão celular, produção de citocinas, como IFN-γ e TNF-α, suprerregulação de marcadores de ativação, como CD44 e CD69, e morte citolítica específica de células alvo que expressam antígeno. A capacidade de resposta de CTL também pode ser determinada usando um repórter artificial que indica com precisão a

capacidade de resposta de CTL. Tais CTL que reconhecem um antígeno e são responsivos ou reativos também são aqui denominados “CTL responsivos a antígeno”.

[00203] Uma “célula linfoide” é uma célula que, opcionalmente após modificação adequada, por exemplo, após a transferência de um CAR, é capaz de produzir uma resposta imune, tal como uma resposta imune celular, ou uma célula precursora de tal célula, e inclui linfócitos, de preferência T linfócitos, linfoblastos e células plasmáticas. Uma célula linfoide pode ser uma célula efetora imune, conforme descrito neste documento. Uma célula linfoide preferida é uma célula T que pode ser modificada para expressar um CAR na superfície da célula. Em uma modalidade, a célula linfoide carece de expressão endógena de um receptor de células T.

[00204] Os termos “célula T” e “linfócito T” são usados indistintamente aqui e incluem células T auxiliares (células T CD4+) e células T citotóxicas (CTLs, células T CD8+) que compreendem células T citolíticas.

[00205] As células T pertencem a um grupo de células brancas do sangue conhecidas como linfócitos e desempenham um papel central na imunidade mediada por células. Eles podem ser diferenciados de outros tipos de linfócitos, como células B e células assassinas naturais pela presença de um receptor especial em sua superfície celular denominado receptor de células T (TCR). O timo é o principal órgão responsável pela maturação das células T. Vários subconjuntos diferentes de células T foram descobertos, cada um com uma função distinta.

[00206] As células T auxiliares auxiliam outras células brancas do sangue em processos imunológicos, incluindo a maturação de células B em células plasmáticas e a ativação de células T citotóxicas e macrófagos, entre outras funções. Essas células também são conhecidas como células T CD4+ porque expressam a proteína CD4 em sua superfície. As células T auxiliares são ativadas quando são apresentadas com antígenos peptídicos pelas moléculas do MHC classe II, que são expressas na

superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs). Uma vez ativadas, elas se dividem rapidamente e secretam pequenas proteínas chamadas citocinas que regulam ou auxiliam na resposta imunológica ativa.

[00207] As células T citotóxicas destroem as células infectadas por vírus e as células tumorais, e também estão implicadas na rejeição do transplante. Essas células também são conhecidas como células T CD8+ , pois expressam a glicoproteína CD8 em sua superfície. Essas células reconhecem seus alvos ligando-se ao antígeno associado ao MHC classe I, que está presente na superfície de quase todas as células do corpo.

[00208] A maioria das células T tem um receptor de células T (TCR) existindo como um complexo de várias proteínas. O receptor de células T real é composto por duas cadeias de peptídeos separadas, que são produzidas a partir dos genes alfa e beta do receptor de células T independentes (TCRα e TCRβ) e são chamadas de cadeias α e β-TCR. As células T γδ (células T gama delta) representam um pequeno subconjunto de células T que possuem um receptor de células T distinto (TCR) em sua superfície. No entanto, em células T γδ, o TCR é composto por uma cadeia γ e uma cadeia δ. Este grupo de células T é muito menos comum (2% do total de células T) do que as células T αβ.

[00209] Todas as células T se originam de células-tronco hematopoéticas na medula óssea. Os progenitores hematopoiéticos derivados de células-tronco hematopoiéticas povoam o timo e se expandem por divisão celular para gerar uma grande população de timócitos imaturos. Os primeiros timócitos não expressam CD4 nem CD8 e, portanto, são classificados como células duplo-negativas (CD4-CD8-). À medida que progridem em seu desenvolvimento, tornam-se timócitos duplo-positivos (CD4 + CD8 +) e, finalmente, amadurecem em timócitos positivos simples (CD4+ CD8- ou CD4-CD8+) que são então liberados do timo para os tecidos periféricos.

[00210] As células T podem geralmente ser preparadas *in vitro* ou *ex vivo*, usando procedimentos padrão. Por exemplo, as células T podem ser

isoladas da medula óssea, sangue periférico ou uma fração da medula óssea ou sangue periférico de um mamífero, como um paciente, usando um sistema de separação de células disponível comercialmente. Alternativamente, as células T podem ser derivadas de humanos, animais não humanos, linhagens celulares ou culturas relacionadas ou não. Uma amostra compreendendo células T pode, por exemplo, ser células mononucleares de sangue periférico (PBMC).

[00211] As células T a serem utilizadas de acordo com a invenção podem expressar um receptor de célula T endógeno ou podem não ter expressão de um receptor de célula T endógeno.

[00212] O termo "CAR direcionado a um antígeno" se refere a um CAR que, quando presente em uma célula efetora imune, como uma célula T , reconhece o antígeno, como na superfície de células que apresentam antígeno ou células doentes, como células cancerígenas, de modo que a célula efetora é estimulada, iniciada e/ou expandida ou exerce funções efetoras de células efetoras imunes conforme descrito acima.

Fontes de células T

[00213] Antes da expansão e modificação genética das células T da invenção, uma fonte de células T é obtida de um sujeito. As células T podem ser obtidas de várias fontes, incluindo células mononucleares do sangue periférico, medula óssea, tecido linfonodal, sangue do cordão umbilical, tecido do timo, tecido de um local de infecção, ascites, derrame pleural, tecido do baço e tumores. Em certas modalidades da presente invenção, qualquer número de linhagens de células T disponíveis na técnica pode ser usado. Em certas modalidades da presente invenção, as células T podem ser obtidas a partir de uma unidade de sangue coletada de um sujeito usando qualquer número de técnicas conhecidas pelo versado na técnica, tal como separação Ficoll™. Em uma modalidade preferida, as células do sangue circulante de um indivíduo são obtidas por aférese. O produto de aférese normalmente contém linfócitos,

incluindo células T, monócitos, granulócitos, células B, outros glóbulos brancos nucleados, glóbulos vermelhos e plaquetas. Em uma modalidade, as células coletadas por aférese podem ser lavadas para remover a fração de plasma e para colocar as células em um tampão ou meio apropriado para as etapas de processamento subsequentes. Em uma modalidade da invenção, as células são lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em uma modalidade alternativa, a solução de lavagem carece de cálcio e pode carecer de magnésio ou pode carecer de muitos, senão de todos os cátions divalentes. Mais uma vez, surpreendentemente, as etapas iniciais de ativação na ausência de cálcio levam a uma ativação ampliada. Como aqueles versados na técnica prontamente apreciariam, uma etapa de lavagem pode ser realizada por métodos conhecidos pelos versados na técnica, tais como usando uma centrífuga de "fluxo direto" semiautomática (por exemplo, o processador de células Cobe 2991, o Baxter CytoMate ou o Haemonetics Cell Saver 5) de acordo com as instruções do fabricante. Após a lavagem, as células podem ser ressuspensas em uma variedade de tampões biocompatíveis, tais como, por exemplo, Ca^{2+}-livre, Mg^{2+}-livre PBS, PlasmaLyte A, ou outra solução salina com ou sem tampão. Alternativamente, os componentes indesejáveis da amostra de aférese podem ser removidos e as células diretamente ressuspensas no meio de cultura.

[00214] Em outra modalidade, as células T são isoladas dos linfócitos do sangue periférico por lise dos glóbulos vermelhos e esgotamento dos monócitos, por exemplo, por centrifugação através de um gradiente PERCOLL™ ou por elutriação centrífuga de contrafluxo. Uma subpopulação específica de células T, como células $CD3^+$, $CD28^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD45RA^+$, e $CD45RO^+$T pode ser adicionalmente isolada por técnicas de seleção positiva ou negativa. Por exemplo, em uma modalidade, as células T são isoladas por incubação com esferas conjugadas com anti-CD3/anti-CD28 (ou seja, 3x28), como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, por um período de tempo suficiente para a seleção positiva das células T desejadas. Em uma modalidade, o

período de tempo varia de 30 minutos a 36 horas ou mais. O versado na técnica reconheceria que múltiplas rodadas de seleção também podem ser usadas no contexto desta invenção.

[00215] O enriquecimento de uma população de células T por seleção negativa pode ser realizado com uma combinação de anticorpos direcionados a marcadores de superfície únicos para as células selecionadas negativamente. Um método é a classificação e/ou seleção de células por meio de imunoaderência magnética negativa ou citometria de fluxo que usa um coquetel de anticorpos monoclonais direcionados a marcadores de superfície celular presentes nas células selecionadas negativamente. Por exemplo, para enriquecer células $CD4^+$ por seleção negativa, um coquetel de anticorpos monoclonais normalmente inclui anticorpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR e CD8. Em certas modalidades, pode ser desejável enriquecer ou selecionar positivamente para células T regulatórias que tipicamente expressam $CD4^+$, $CD25^+$, $CD62L^{hi}$, $GITR^+$, e $FoxP3^+$. Alternativamente, em certas modalidades, as células T regulatórias são esgotadas por grânulos conjugados com anti-CD25 ou outro método de seleção semelhante.

[00216] Uma variedade de métodos pode ser usada para introduzir construtos CAR em células T, incluindo transfecção de DNA não viral, sistemas baseados em transposon, sistemas baseados em vírus e sistemas baseados em RNA. A transfecção de DNA não viral tem baixo risco de mutagênese inserível. Os sistemas baseados em transposon podem integrar os transgenes de forma mais eficiente do que os plasmídeos que não contêm um elemento de integração. Os sistemas baseados em vírus incluem o uso de γ-retrovírus e vetores lentivirais. Os γ-retrovírus são relativamente fáceis de produzir, transduzem células T de forma eficiente e permanente e têm se mostrado preliminarmente seguros do ponto de vista de integração em células T humanas primárias. Os vetores lentivirais também transduzem células T de maneira eficiente e permanente, mas são mais caros de fabricar. Eles também são potencialmente mais seguros do que os sistemas baseados em retrovírus.

[00217] Em uma modalidade da invenção, células T ou progenitores de células T são transfectados *ex vivo* ou *in vivo* com um ácido nucleico que codifica o CAR para fornecer células T geneticamente modificadas para expressar um CAR.

[00218] As células CAR T podem ser produzidas *in vivo* e, portanto, quase instantaneamente, usando nanopartículas direcionadas às células T. Por exemplo, nanopartículas à base de poli (β-aminoéster) podem ser acopladas a fragmentos anti-CD3e f(ab) para ligação a CD3 em células T. Após a ligação às células T, essas nanopartículas são endocitadas. Seu conteúdo, por exemplo, DNA de plasmídeo que codifica um antígeno antitumoral CAR, pode ser direcionado ao núcleo da célula T devido à inclusão de peptídeos contendo sequências associadas a microtúbulos (MTAS) e sinais de localização nuclear (NLSs). A inclusão de transposons com repetições invertidas (IRs) flanqueando o cassete de expressão do gene CAR e um plasmídeo separado que codifica uma transposase hiperativa pode permitir a integração eficiente do vetor CAR nos cromossomos. Tal sistema que permite a produção *in vivo* de células T CAR após infusão de nanopartículas é descrito em Smith *et al.* (2017) Nat. Nanotechnol. 12:813-820.

[00219] Outra possibilidade é usar o método CRISPR/Cas9 para colocar deliberadamente uma sequência de codificação CAR em um locus específico. Por exemplo, os receptores de células T existentes (TCR) podem ser nocauteados, enquanto nocauteia no CAR e o coloca sob o controle regulatório dinâmico do promotor endógeno que, de outra forma, moderaria a expressão de TCR; c.f., por exemplo, Eyquem *et al.* (2017) Nature 543:113-117.

[00220] Em uma modalidade de todos os aspectos da invenção, as células T geneticamente modificadas para expressar um CAR são transfectadas de forma estável ou transitória com ácido nucleico que codifica o CAR. Assim, o ácido nucleico que codifica o CAR é integrado ou não integrado ao genoma das células T.

[00221] Em uma modalidade de todos os aspectos da invenção, as

células T ou progenitores de células T são do sujeito a ser tratado. Em uma modalidade de todos os aspectos da invenção, as células T ou progenitores de células T são de um sujeito que é diferente do sujeito a ser tratado.

[00222] Em uma modalidade de todos os aspectos da invenção, as células T podem ser autólogas, alogênicas ou singênicas para o sujeito a ser tratado. As células T podem ser geneticamente modificadas *in vitro* para expressar um receptor de antígeno quimérico (CAR).

[00223] Em uma modalidade de todos os aspectos da invenção, as células T geneticamente modificadas para expressar um CAR são inativadas para a expressão de um receptor de células T endógeno e/ou HLA endógeno.

Ativação e expansão de células T

[00224] Quer antes ou depois da modificação genética das células T para expressar um CAR desejável, as células T podem ser ativadas e expandidas geralmente usando métodos conhecidos na técnica.

Geralmente, as células T da invenção são expandidas por contato com uma superfície tendo ligado a elas um agente que estimula um sinal associado ao complexo CD3/TCR e um ligando que estimula uma molécula coestimulatória na superfície das células T. Em particular, as populações de células T podem ser estimuladas conforme descrito neste documento, tal como por contato com um anticorpo anti-CD3, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou um anticorpo anti-CD2 imobilizado em uma superfície, ou por contato com um ativador de proteína quinase C (por exemplo, briostatina) em conjunto com um ionóforo de cálcio. Para a coestimulação de uma molécula acessória na superfície das células T, um ligando que se liga à molécula acessória é usado. Por exemplo, uma população de células T pode ser contatada com um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28, sob condições apropriadas para estimular a proliferação das células T.

[00225] Em certas modalidades, o sinal estimulatório primário e o sinal coestimulatório para a célula T podem ser fornecidos por diferentes protocolos. Por exemplo, os agentes que fornecem cada sinal podem estar em solução ou acoplados a uma superfície. Quando acoplados a uma superfície, os agentes podem ser acoplados à mesma superfície (isto é, em formação "cis") ou a superfícies separadas (isto é, em formação "trans"). Alternativamente, um agente pode ser acoplado a uma superfície e o outro agente em solução. Em uma modalidade, o agente que fornece o sinal coestimulatório está ligado a uma superfície celular e o agente que fornece o sinal de ativação primário está em solução ou acoplado a uma superfície. Em certas modalidades, ambos os agentes podem estar em solução.

[00226] Em uma modalidade, os dois agentes são imobilizados em contas, na mesma conta, isto é, "cis", ou em contas separadas, isto é, "trans". A título de exemplo, o agente que fornece o sinal de ativação primário é um anticorpo anti-CD3 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e o agente que fornece o sinal coestimulatório é um anticorpo anti-CD28 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo; e ambos os agentes são coimobilizados na mesma esfera. Em uma modalidade, a razão de anticorpo CD3:CD28 ligado aos grânulos varia de 100:1 a 1:100.

[00227] Razões de partículas para células de 1:500 a 500:1 podem ser usadas para estimular células T ou outras células alvo. Como aqueles versados na técnica podem prontamente apreciar, a razão de partículas para células pode depender do tamanho de partícula em relação à célula alvo. Por exemplo, grânulos pequenos podem ligar apenas algumas células, enquanto grânulos maiores podem ligar muitas. Em certas modalidades, a razão de células para partículas varia de 1:100 a 100:1 e em outras modalidades a razão compreende 1:9 a 9:1.

[00228] As condições apropriadas para a cultura de células T incluem um meio apropriado (por exemplo, meio essencial mínimo ou meio RPMI 1640 ou, X-vivo 15, (Lonza)) que pode conter fatores necessários para a

proliferação e viabilidade, incluindo soro (por exemplo, soro fetal bovino ou humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-γ, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGFβ e TNF-α ou qualquer outros aditivos para o crescimento de células conhecidos do especialista na técnica. Outros aditivos para o crescimento de células incluem, mas sem limitação, tensoativo, plasmanato e agentes redutores, tais como N-acetil-cisteína e 2-mercaptoetanol. As células-alvo são mantidas sob as condições necessárias para suportar o crescimento, por exemplo, uma temperatura apropriada (por exemplo, 37°C) e atmosfera (por exemplo, ar mais 5% de CO_2).

Aplicação Terapêutica

[00229] A presente invenção abrange uma célula (por exemplo, célula T) compreendendo uma molécula de CAR da invenção, por exemplo, transduzida com um retroviral, tal como o vetor lentiviral (LV) que codifica um CAR da invenção. Portanto, em alguns casos, a célula T transduzida pode desencadear uma resposta de célula T mediada por CAR.

[00230] A invenção fornece o uso de um CAR para redirecionar a especificidade de uma célula T primária para o antígeno tumoral CLDN6. Assim, a presente invenção também fornece um método para estimular uma resposta imune mediada por células T a uma população de células alvo ou tecido em um mamífero, compreendendo a etapa de administração ao mamífero de uma célula T que expressa um CAR da invenção, em que o CAR compreende uma fração de ligação que interage especificamente com CLDN6 como um alvo predeterminado.

[00231] Em uma modalidade, a presente invenção inclui um tipo de terapia celular em que as células T são geneticamente modificadas para expressar um CAR da invenção e a célula CAR T é infundida em um receptor em necessidade do mesmo. A célula infundida é capaz de matar células tumorais no receptor. Ao contrário das terapias de anticorpos, as

células CAR T são capazes de se replicar *in vivo* , resultando em persistência de longo prazo que pode levar ao controle sustentado do tumor.

[00232] Em uma modalidade, as células T CAR da invenção podem sofrer expansão robusta de células T *in vivo* e podem persistir por um período de tempo prolongado. Em outra modalidade, as células T CAR da invenção evoluem para células T de memória específicas que podem ser reativadas para inibir qualquer formação ou crescimento tumoral adicional.

[00233] Os cânceres que podem ser tratados incluem tumores que não são vascularizados, ou ainda não substancialmente vascularizados, bem como tumores vascularizados. Os cânceres podem compreender tumores sólidos. Os tipos de cânceres a serem tratados com os CARs da invenção incluem, mas sem limitação, carcinoma, blastoma e sarcoma e certas malignidades de leucemia ou linfoides, tumores benignos e malignos e malignidades, por exemplo, sarcomas, carcinomas e melanomas. Tumores/cânceres adultos e tumores/cânceres pediátricos também estão incluídos.

[00234] Os tumores sólidos são massas anormais de tecido que geralmente não contêm cistos ou áreas líquidas. Os tumores sólidos podem ser benignos ou malignos. Diferentes tipos de tumores sólidos são nomeados de acordo com o tipo de células que os formam (como sarcomas, carcinomas e linfomas). Exemplos de tumores sólidos, como sarcomas e carcinomas, incluem fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, osteossarcoma e outros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, carcinoma do cólon, malignidade linfoide, câncer pancreático, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma das glândulas sudoríparas, carcinoma medular da tireoide, carcinoma de glândula sebácea feocromocitomas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar,

carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de células renais, hepatoma, carcinoma do duto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, câncer cervical, tumor testicular, seminoma, carcinoma da bexiga, melanoma e tumores do CNS (como um glioma (como glioma de tronco cerebral e gliomas mistos), glioblastoma (também conhecido como glioblastoma multiforme) astrocitoma, linfoma do CNS, germinoma, meduloblastoma, Schwannoma craniofariogioma, ependimoma, pineaioma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, neuroblastoma, retinoblastoma e metástases cerebrais).

[00235] Em uma modalidade, os cânceres que podem ser tratados são cânceres que expressam CLDN6, tais como aqueles que são descritos neste documento.

[00236] Em uma modalidade da invenção, as células são isoladas de um mamífero (de preferência um humano) e geneticamente modificadas (ou seja, transduzidas ou transfectadas *in vitro*) com um vetor que expressa um CAR aqui divulgado. A célula modificada com CAR pode ser administrada a um receptor mamífero para fornecer um benefício terapêutico. O receptor mamífero pode ser um humano e a célula modificada com CAR pode ser autóloga em relação ao receptor. Alternativamente, as células podem ser alogênicas, singênicas ou xenogênicas em relação ao receptor.

[00237] As células modificadas com CAR da presente invenção podem ser administradas sozinhas ou em combinação com outros componentes, como IL-2 ou outras citocinas ou populações de células. Em uma modalidade, as células modificadas com CAR da presente invenção são administradas em combinação com uma molécula de antígeno cognata, ou um ácido nucleico, em particular RNA, que codifica uma molécula de antígeno cognata. A molécula de antígeno cognata pode ser CLDN6, CLDN6 recombinante, um fragmento de CLDN6 ou uma variante de qualquer um dos anteriores. Em uma modalidade, um ácido nucleico, em particular RNA, que codifica a molécula de antígeno cognato (por exemplo, CLDN6, CLDN6 recombinante, um fragmento de CLDN6 ou

uma variante de qualquer um dos anteriores) é administrado. De preferência, o ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognato é expresso em células do sujeito que está sendo administrado com as células modificadas com CAR da presente invenção e o ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognato para fornecer a molécula de antígeno cognato para ligação pela ligação do domínio de ligação do antígeno CAR. Em uma modalidade, a expressão da molécula de antígeno cognato do domínio de ligação ao antígeno CAR está na superfície celular. Em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata é transitoriamente expresso nas células do sujeito. Em uma modalidade, o nucleico que codifica a molécula de antígeno cognato é RNA. De preferência, o contato das células modificadas com CAR da presente invenção com a molécula de antígeno cognato resulta na expansão e/ou ativação das células.

[00238] Os antígenos de peptídeo e proteína adequados para uso de acordo com a invenção incluem tipicamente um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo ao qual o domínio de ligação ao antígeno CLDN6 do CAR da invenção se liga. O peptídeo ou proteína ou epítopo pode ser derivado de CLDN6. Por exemplo, o peptídeo ou antígeno de proteína ou o epítopo contido no peptídeo ou antígeno de proteína pode ser CLDN6 ou um fragmento ou variante de CLDN6.

[00239] Um antígeno de peptídeo e proteína fornecido a um sujeito de acordo com a invenção (seja por administração do antígeno de peptídeo e proteína ou um ácido nucleico, em particular RNA, que codifica o antígeno de peptídeo e proteína), ou seja, um antígeno de vacina, preferencialmente resulta em estimulação, iniciação e/ou expansão de células modificadas por CAR no sujeito sendo administrado as células modificadas por CAR e o antígeno ou ácido nucleico. As referidas células modificadas com CAR estimuladas, iniciadas e/ou expandidas são preferencialmente direcionadas contra o antígeno alvo CLDN6, em particular o antígeno alvo expresso por células doentes, tecidos e/ou órgãos, isto é, o antígeno associado à doença. Assim, um

antígeno de vacina pode compreender o antígeno associado à doença, ou um fragmento ou variante do mesmo. Em uma modalidade, tal fragmento ou variante é imunologicamente equivalente ao antígeno associado à doença. No contexto da presente divulgação, o termo “fragmento de um antígeno” ou “variante de um antígeno” significa um agente que resulta em estimulação, iniciação e/ou expansão de células modificadas com CAR que estimularam, iniciaram e/ou expandiram as células modificadas por CAR expandidas direcionam o antígeno associado à doença, em particular quando expresso na superfície de células, tecidos e/ou órgãos doentes. Assim, o antígeno da vacina administrado de acordo com a divulgação pode corresponder a ou pode compreender o antígeno associado à doença, pode corresponder a ou pode compreender um fragmento do antígeno associado à doença ou pode corresponder a ou pode compreender um antígeno que é homólogo ao antígeno associado à doença ou um fragmento do mesmo. Se o antígeno da vacina administrado de acordo com a divulgação compreender um fragmento do antígeno associado à doença ou uma sequência de aminoácidos que é homóloga a um fragmento do antígeno associado à doença, o referido fragmento ou sequência de aminoácidos pode compreender um epítopo do antígeno associado à doença ou uma sequência que é homóloga a um epítopo do antígeno associado à doença, em que as células modificadas com CAR se ligam ao referido epítopo. Assim, de acordo com a divulgação, um antígeno pode compreender um fragmento imunogênico do antígeno associado à doença ou uma sequência de aminoácidos sendo homóloga a um fragmento imunogênico do antígeno associado à doença. Um “fragmento imunogênico de um antígeno”, de acordo com a divulgação, preferencialmente se refere a um fragmento de um antígeno que é capaz de estimular, iniciar e/ou expandir células modificadas com CAR. É preferido que o antígeno da vacina (semelhante ao antígeno associado à doença) forneça o epítopo relevante para ligação pelo domínio de ligação ao antígeno CLDN6 presente no CAR das células modificadas com CAR. Também é preferido que o antígeno da vacina (semelhante ao antígeno

associado à doença) seja expresso na superfície de uma célula, como uma célula apresentadora de antígeno, de modo a fornecer o epítopo relevante para ligação ao CAR. O antígeno da vacina de acordo com a invenção pode ser um antígeno recombinante.

[00240] O termo “imunologicamente equivalente” significa que a molécula imunologicamente equivalente, tal como a sequência de aminoácidos imunologicamente equivalente exibe as mesmas ou essencialmente as mesmas propriedades imunológicas e/ou exerce os mesmos ou essencialmente os mesmos efeitos imunológicos, por exemplo, em relação ao tipo de efeito imunológico. No contexto da presente divulgação, o termo “imunologicamente equivalente” é preferencialmente usado com relação aos efeitos imunológicos ou propriedades de antígenos ou variantes de antígenos. Por exemplo, uma sequência de aminoácidos é imunologicamente equivalente a uma sequência de aminoácidos de referência, por exemplo, CLDN6, se a referida sequência de aminoácidos quando exposta à ligação de células modificadas por CAR à sequência de aminoácidos de referência ou células que expressam a sequência de aminoácidos de referência induzir um reação imune tendo uma especificidade de reação com a sequência de aminoácidos de referência, em particular estimulação, iniciação e/ou expansão de células modificadas com CAR. Assim, uma molécula que é imunologicamente equivalente a um antígeno exibe as mesmas ou essencialmente as mesmas propriedades e/ou exerce os mesmos ou essencialmente os mesmos efeitos em relação à estimulação, iniciação e/ou expansão de células modificadas por CAR como o antígeno para o qual o as células modificadas por CAR são direcionadas.

[00241] “Ativação” ou “estimulação”, como utilizado neste documento, refere-se ao estado de uma célula T que foi suficientemente estimulada para induzir proliferação celular detectável. Ativação também pode estar associada à produção de citocina induzida e funções efetoras detectáveis. O termo “células T ativadas” se refere a, dentre outras coisas, células T que estão sofrendo divisão celular.

[00242] O termo “iniciação” refere-se a um processo em que uma célula T tem seu primeiro contato com seu antígeno específico e causa a diferenciação em células T efetoras.

[00243] O termo “expansão clonal” ou “expansão” refere-se a um processo em que uma entidade específica é multiplicada. No contexto da presente divulgação, o termo é preferencialmente usado no contexto de uma resposta imunológica na qual os linfócitos são estimulados por um antígeno, proliferam e o linfócito específico que reconhece o referido antígeno é amplificado. De preferência, a expansão clonal leva à diferenciação dos linfócitos.

[00244] É particularmente preferido de acordo com a invenção que o antígeno cognato seja administrado na forma de RNA que codifica o antígeno. Após a administração do RNA, pelo menos uma parte do RNA é distribuída a uma célula-alvo. Em uma modalidade, pelo menos uma parte do RNA é distribuída ao citosol da célula alvo. Em uma modalidade, o RNA é traduzido pela célula alvo para produzir o peptídeo ou proteína codificada. Algumas modalidades envolvem a distribuição direcionada do RNA a certos tecidos. Em uma modalidade, a distribuição envolve direcionar o sistema linfático, em particular os órgãos linfoides secundários, mais especificamente o baço. Em uma modalidade, a célula alvo é uma célula do baço. Em uma modalidade, a célula alvo é uma célula de apresentação de antígeno, como uma célula de apresentação de antígeno profissional no baço. Em uma modalidade, a célula alvo é uma célula dendrítica no baço.

[00245] O “sistema linfático” faz parte do sistema circulatório e é uma parte importante do sistema imunológico, compreendendo uma rede de vasos linfáticos que transportam a linfa. O sistema linfático consiste em órgãos linfáticos, uma rede condutora de vasos linfáticos e a linfa circulante. Os órgãos linfoides primários ou centrais geram linfócitos a partir de células progenitoras imaturas. O timo e a medula óssea constituem os órgãos linfoides primários. Os órgãos linfoides secundários ou periféricos, que incluem os nódulos linfáticos e o baço, mantêm os

linfócitos ingênuos maduros e iniciam uma resposta imune adaptativa.

[00246] O RNA pode ser distribuído ao baço pelas chamadas formulações de lipoplexo, nas quais o RNA está ligado a lipossomas que compreendem um lipídeo catiônico e, opcionalmente, um lipídeo adicional ou auxiliar para formar formulações de nanopartículas injetáveis. Os lipossomas podem ser obtidos por injeção de uma solução dos lipídeos em etanol em água ou numa fase aquosa adequada. Partículas de lipoplexo de RNA podem ser preparadas misturando os lipossomas com RNA. As partículas de lipoplexo de RNA de direcionamento de baço são descritas em WO 2013/143683, aqui incorporado por referência. Verificou-se que as partículas de lipoplexo de RNA com uma carga líquida negativa podem ser utilizadas para direcionar preferencialmente o tecido do baço ou células do baço, tais como células apresentadoras de antígeno, em particular células dendríticas. Consequentemente, após a administração das partículas de lipoplexo de RNA, ocorre a acumulação de RNA e/ou a expressão de RNA no baço. Assim, as partículas de lipoplexo de RNA da divulgação podem ser usadas para expressar RNA no baço. Em uma modalidade, após a administração das partículas de lipoplexo de RNA, nenhuma ou essencialmente nenhuma acumulação de RNA e/ou expressão de RNA no pulmão e/ou fígado ocorre. Em uma modalidade, após a administração das partículas de lipoplexo de RNA, ocorre o acúmulo de RNA e/ou a expressão de RNA em células de apresentação de antígeno, tais como células de apresentação de antígeno profissionais no baço. Assim, as partículas de lipoplexo de RNA da divulgação podem ser usadas para expressar RNA em tais células de apresentação de antígeno. Em uma modalidade, as células de apresentação de antígeno são células dendríticas e/ou macrófagos.

[00247] No contexto da presente divulgação, o termo “partícula de lipoplexo de RNA” se refere a uma partícula que contém lipídeo, em particular lipídeo catiônico e RNA. As interações eletrostáticas entre lipossomas carregados positivamente e RNA carregado negativamente

resultam na complexação e formação espontânea de partículas de lipoplexo de RNA. Lipossomas carregados positivamente podem ser geralmente sintetizados usando um lipídeo catiônico, como DOTMA, e lipídeos adicionais, como DOPE. Em uma modalidade, uma partícula de lipoplexo de RNA é uma nanopartícula.

[00248] Como utilizado neste documento, um "lipídeo catiônico" refere-se a um lipídeo com uma carga líquida positiva. Os lipídeos catiônicos se ligam ao RNA carregado negativamente por interação eletrostática à matriz lipídica. Geralmente, os lipídeos catiônicos possuem uma fração lipofílica, como um esterol, uma cadeia de acil ou diacil, e o grupo principal do lipídeo normalmente carrega a carga positiva. Exemplos de lipídeos catiônicos incluem, mas sem limitação, 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamônio propano (DOTMA), dimetildioctadecilamônio (DDAB); 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio propano (DOTAP); 1,2-dioleoil-3-dimetilamônio-propano (DODAP); 1,2-diaciloxi-3-dimetilamônio propanos; 1,2-dialquiloxi-3-dimetilamônio propanos; cloreto de dioctadecildimetil amônio (DODAC), 2,3-di(tetradecoxi)propil-(2-hidroxietil)-dimetilazânio (DMRIE), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DMEPC), 1,2-dimiristoil-3-trimetilamônio propano (DMTAP), brometo de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxietil amônio (DORIE) e 2,3-dioleoiloxi-N-[2(espermina carboxamida)etil]-N,N-dimetil-1-propanâmio trifluoroacetato (DOSPA). Os preferidos são DOTMA, DOTAP, DODAC e DOSPA. Em modalidades específicas, o lipídeo catiônico é DOTMA e/ou DOTAP.

[00249] Um lipídeo adicional pode ser incorporado para ajustar a razão geral de carga positiva para negativa e a estabilidade física das partículas de lipoplexo de RNA. Em certas modalidades, o lipídeo adicional é um lipídeo neutro. Como utilizado neste documento, um "lipídeo neutro" refere-se a um lipídeo com uma carga líquida igual a zero. Exemplos de lipídeos neutros incluem, mas sem limitação, 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidil etanol

amina, ceramida, esfingoemielina, cefalina, colesterol e cerebrosídeo. Em modalidades específicas, o lipídro adicional é DOPE, colesterol e/ou DOPC.

[00250] Em certas modalidades, as partículas de lipoplexo de RNA incluem um lipídeo catiônico e um lipídeo adicional. Em uma modalidade exemplificativa, o lipídeo catiônico é DOTMA e o lipídeo adicional é DOPE.

[00251] Em algumas modalidades, a razão molar do pelo menos um lipídeo catiônico para pelo menos um lipídeo adicional é de cerca de 10:0 a cerca de 1:9, cerca de 4:1 a cerca de 1:2, ou cerca de 3:1 a cerca de 1:1. Em modalidades específicas, a razão molar pode ser cerca de 3:1, cerca de 2,75:1, cerca de 2,5:1, cerca de 2,25:1, cerca de 2:1, cerca de 1,75:1, cerca de 1,5:1, cerca de 1,25:1, ou cerca de 1:1. Em uma modalidade exemplificativa, a razão molar de pelo menos um lipídeo catiônico para pelo menos um lipídeo adicional é de cerca de 2:1.

[00252] Partículas de lipoplexo de RNA aqui descritas têm um diâmetro médio que em uma modalidade varia de cerca de 200 nm a cerca de 1000 nm, de cerca de 200 nm a cerca de 800 nm, de cerca de 250 a cerca de 700 nm, de cerca de 400 a cerca de 600 nm, de cerca de 300 nm a cerca de 500 nm, ou de cerca de 350 nm a cerca de 400 nm. Em modalidades específicas, as partículas de lipoplexo de RNA têm um diâmetro médio de cerca de 200 nm, cerca de 225 nm, cerca de 250 nm, cerca de 275 nm, cerca de 300 nm, cerca de 325 nm, cerca de 350 nm, cerca de 375 nm, cerca de 400 nm, cerca de 425 nm, cerca de 450 nm, cerca de 475 nm, cerca de 500 nm, cerca de 525 nm, cerca de 550 nm, cerca de 575 nm, cerca de 600 nm, cerca de 625 nm, cerca de 650 nm, cerca de 700 nm, cerca de 725 nm, cerca de 750 nm , cerca de 775 nm, cerca de 800 nm, cerca de 825 nm, cerca de 850 nm, cerca de 875 nm, cerca de 900 nm, cerca de 925 nm, cerca de 950 nm, cerca de 975 nm ou cerca de 1000 nm. Em uma modalidade, as partículas de lipoplexo de RNA têm um diâmetro médio que varia de cerca de 250 nm a cerca de 700 nm. Em outra modalidade, as partículas de lipoplexo de RNA têm um diâmetro médio que varia de cerca de 300 nm a cerca de 500 nm. Em

uma modalidade exemplificativa, as partículas de lipoplexo de RNA têm um diâmetro médio de cerca de 400 nm.

[00253] A carga elétrica das partículas de lipoplexo de RNA da presente divulgação é a soma das cargas elétricas presentes em pelo menos um lipídeo catiônico e as cargas elétricas presentes no RNA. A razão de carga é a razão entre as cargas positivas presentes em pelo menos um lipídeo catiônico e as cargas negativas presentes no RNA. A razão de carga das cargas positivas presentes em pelo menos um lipídeo catiônico para as cargas negativas presentes no RNA é calculada pela seguinte equação: razão de carga = [(concentração de lipídeo catiônico (mol)) * (o número total de cargas positivas no lipídeo catiônico)]/[(concentração de RNA (mol)) * (o número total de cargas negativas no RNA)].

[00254] O baço que direciona as partículas de lipoplexo de RNA aqui descritas em pH fisiológico, de preferência têm uma carga negativa líquida, tal como uma razão de carga de cargas positivas para cargas negativas de cerca de 1,9:2 a cerca de 1:2. Em modalidades específicas, a razão de carga de cargas positivas para cargas negativas nas partículas de lipoplexo de RNA em pH fisiológico é de cerca de 1,9:2,0, cerca de 1,8:2,0, cerca de 1,7:2,0, cerca de 1,6:2,0, cerca de 1,5:2,0, cerca de 1,4:2,0, cerca de 1,3:2,0, cerca de 1,2:2,0, cerca de 1,1:2,0 ou cerca de 1:2,0.

[00255] As células modificadas com CAR e outros agentes aqui descritos podem ser administrados em composições farmacêuticas ou medicamentos para tratamentos terapêuticos ou profiláticos e podem ser administrados na forma de qualquer composição farmacêutica adequada.

[00256] O termo “composição farmacêutica” refere-se a uma formulação compreendendo um agente terapeuticamente eficaz, de preferência junto com transportadores, diluentes e/ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis. A referida composição farmacêutica é útil para tratar, prevenir ou reduzir a gravidade de uma doença ou distúrbio por administração da referida composição farmacêutica a um sujeito.

Uma composição farmacêutica também é conhecida na técnica como uma formulação farmacêutica.

[00257] As composições farmacêuticas da presente divulgação podem compreender um ou mais adjuvantes ou podem ser administradas com um ou mais adjuvantes. O termo “adjuvante” refere-se a um composto que prolonga, intensifica ou acelera uma resposta imune. Os adjuvantes compreendem um grupo heterogêneo de compostos, como emulsões de óleo (por exemplo, adjuvantes de Freund), compostos minerais (como alúmen), produtos bacterianos (como a toxina de Bordetella pertussis) ou complexos imunoestimulantes. Exemplos de adjuvantes incluem, sem limitação, LPS, GP96, oligodesoxinucleotídeos CpG, fatores de crescimento e citocinas, tais como monocinas, linfocinas, interleucinas, quimiocinas. As quimiocinas podem ser IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL12, IFNα, IFNγ, GM-CSF, LT-a. Outros adjuvantes conhecidos são hidróxido de alumínio, adjuvante de Freund ou óleo, como Montanide® ISA51. Outros adjuvantes adequados para uso na presente divulgação incluem lipopeptídeos, como Pam3Cys.

[00258] As composições farmacêuticas de acordo com a presente divulgação são geralmente aplicadas em uma “quantidade farmaceuticamente eficaz” e em “uma preparação farmaceuticamente aceitável”.

[00259] O termo “farmaceuticamente aceitável” refere-se à não toxicidade de um material que não interage com a ação do componente ativo da composição farmacêutica.

[00260] O termo “quantidade farmaceuticamente eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” refere-se à quantidade que atinge uma reação desejada ou um efeito desejado sozinho ou em conjunto com outras doses. No caso do tratamento de uma doença particular, a reação desejada refere-se preferencialmente à inibição do curso da doença. Isso consiste em retardar o progresso da doença e, em particular, interromper ou reverter o progresso da doença. A reação desejada no tratamento de uma doença também pode ser o retardo do início ou a prevenção do início

da referida doença ou condição. Uma quantidade eficaz das composições aqui descritas dependerá da condição a ser tratada, da gravidade da doença, dos parâmetros individuais do paciente, incluindo idade, condição fisiológica, tamanho e peso, a duração do tratamento, o tipo de terapia (se presente), a via de administração específica e fatores semelhantes. Consequentemente, as doses administradas das composições aqui descritas podem depender de vários desses parâmetros. No caso de uma reação em um paciente ser insuficiente com uma dose inicial, doses mais altas (ou doses efetivamente mais altas alcançadas por uma via de administração diferente e mais localizada) podem ser usadas.

[00261] As composições farmacêuticas da presente divulgação podem conter sais, tampões, conservantes e, opcionalmente, outros agentes terapêuticos. Em uma modalidade, as composições farmacêuticas da presente divulgação compreendem um ou mais carreadores, diluentes e/ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

[00262] Conservantes adequados para uso nas composições farmacêuticas da presente divulgação incluem, sem limitação, cloreto de benzalcônio, clorobutanol, parabeno e timerosal.

[00263] O termo “excipiente”, como utilizado neste documento, refere-se a uma substância que pode estar presente em uma composição farmacêutica da presente divulgação, mas não é um ingrediente ativo. Exemplos de excipientes incluem, sem limitação, transportadores, aglutinantes, diluentes, lubrificantes, espessantes, agentes tensoativos, conservantes, estabilizantes, emulsificantes, tampões, agentes aromatizantes ou corantes.

[00264] O termo “diluente” refere-se a um agente diluente e/ou de desbaste. Além disso, o termo “diluente” inclui qualquer um ou mais de fluido, suspensão líquida ou sólida e/ou meios de mistura. Exemplos de diluentes adequados incluem etanol, glicerol e água.

[00265] O termo “transportador” refere-se a um componente que pode ser natural, sintético, orgânico, inorgânico em que o componente

ativo é combinado para facilitar, intensificar ou permitir a administração da composição farmacêutica. Um transportador, como utilizado neste documento, pode ser um ou mais enchimentos, diluentes ou substâncias encapsulantes sólidos ou líquidos compatíveis, que são adequados para administração a um sujeito. Transportador adequado inclui, sem limitação, água estéril, Ringer, Ringer lactato, solução de cloreto de sódio estéril, solução salina isotônica, polialquilenoglicóis, naftalenos hidrogenados e, em particular, polímeros de lactídeo biocompatíveis, copolímeros de lactídeo/glicolídeo ou copolímeros de polioxietileno / polioxi-propileno. Em uma modalidade, a composição farmacêutica da presente divulgação inclui solução salina isotônica.

[00266] Os transportadores, excipientes ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis para uso terapêutico são bem conhecidos na técnica farmacêutica e são descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R Gennaro edit. 1985).

[00267] Os transportadores, excipientes ou diluentes farmacêuticos podem ser selecionados em relação à via de administração pretendida e à prática farmacêutica padrão.

[00268] Em uma modalidade, as composições farmacêuticas aqui descritas podem ser administradas por via intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intradérmica ou intramuscular. Em certas modalidades, a composição farmacêutica é formulada para administração local ou administração sistêmica. A administração sistêmica pode incluir a administração enteral, que envolve a absorção através do trato gastrointestinal, ou a administração parenteral. Como utilizado neste documento, "administração parenteral" refere-se à administração de qualquer maneira que não seja através do trato gastrointestinal, tal como por injeção intravenosa. Em uma modalidade preferida, as composições farmacêuticas são formuladas para administração sistêmica. Em outra modalidade preferida, a administração sistêmica é por administração intravenosa. As composições podem ser injetadas diretamente em um tumor ou nódulo linfático.

[00269] O termo “coadministração”, como utilizado neste documento, significa um processo pelo qual diferentes compostos ou composições são administrados ao mesmo paciente. Por exemplo, as células modificadas com CAR e o antígeno ou ácido nucleico que codificam as mesmas aqui descritos podem ser administrados simultaneamente, essencialmente ao mesmo tempo ou sequencialmente. Se a administração ocorrer sequencialmente, as células modificadas com CAR podem ser administradas antes ou após a administração do antígeno ou ácido nucleico que o codifica. Se a administração ocorrer simultaneamente, as células modificadas com CAR e o antígeno ou ácido nucleico que as codificam não precisam ser administrados na mesma composição. As células modificadas por CAR e o antígeno ou ácido nucleico que as codificam podem ser administrados uma ou mais vezes e o número de administrações de cada componente pode ser o mesmo ou diferente. Além disso, as células modificadas com CAR e o antígeno ou ácido nucleico que as codificam não precisam ser administrados no mesmo local.

[00270] O termo “doença” refere-se a uma condição anormal que afeta o corpo de um indivíduo. Uma doença geralmente é interpretada como uma condição médica associada a sinais e sintomas específicos. Uma doença pode ser causada por fatores originários de uma fonte externa, como doenças infecciosas, ou pode ser causada por disfunções internas, como doenças autoimunes. Em humanos, “doença” é frequentemente usada de forma mais ampla para se referir a qualquer condição que causa dor, disfunção, angústia, problemas sociais ou morte para o indivíduo afetado, ou problemas semelhantes para aqueles em contato com o indivíduo. Nesse sentido mais amplo, às vezes inclui lesões, deficiências, distúrbios, síndromes, infecções, sintomas isolados, comportamentos desviantes e variações atípicas de estrutura e função, enquanto em outros contextos e para outros fins, essas podem ser consideradas categorias distintas. As doenças geralmente afetam os indivíduos não só fisicamente, mas também emocionalmente, pois contrair e conviver com muitas doenças pode alterar a perspectiva de vida

e a personalidade de alguém.

[00271] No presente contexto, o termo “tratamento”, “tratar” ou “intervenção terapêutica” refere-se ao manejo e cuidado de um sujeito com o propósito de combater uma condição, tal como uma doença ou distúrbio. O termo se destina a incluir o espectro completo de tratamentos para uma determinada condição da qual o sujeito está sofrendo, como a administração do composto terapeuticamente eficaz para aliviar os sintomas ou complicações, para atrasar a progressão da doença, distúrbio ou condição, para aliviar ou remediar os sintomas e complicações e/ou curar ou eliminar a doença, distúrbio ou condição, bem como prevenir a condição, em que a prevenção deve ser entendida como o manejo e cuidado de um indivíduo com a finalidade de combater a doença , condição ou distúrbio e inclui administrar compostos ativos para prevenir o aparecimento dos sintomas ou complicações.

[00272] O termo “tratamento terapêutico” refere-se a qualquer tratamento que melhora o estado de saúde e/ou prolonga (aumenta) a expectativa de vida de um indivíduo. O referido tratamento pode eliminar a doença em um indivíduo, interromper ou retardar o desenvolvimento de uma doença em um indivíduo, inibir ou retardar o desenvolvimento de uma doença em um indivíduo, diminuir a frequência ou gravidade dos sintomas em um indivíduo e/ou diminuir a recorrência em um indivíduo que atualmente tem ou já teve uma doença.

[00273] Os termos “tratamento profilático” ou “tratamento preventivo” referem-se a qualquer tratamento que se destina a prevenir a ocorrência de uma doença em um indivíduo. Os termos “tratamento profilático” ou “tratamento preventivo” são usados aqui indistintamente.

[00274] Os termos “indivíduo” e “sujeito” são usados aqui indistintamente. Eles se referem a um humano ou outro mamífero (por exemplo, camundongo, rato, coelho, cão, gato, gado, suíno, ovelha, cavalo ou primata) que pode ser afetado ou é suscetível a uma doença ou distúrbio (por exemplo, câncer), mas pode ou pode não ter a doença ou distúrbio. Em muitas modalidades, o indivíduo é um ser humano. Salvo

indicação em contrário, os termos “indivíduo” e “sujeito” não denotam uma idade específica e, portanto, abrangem adultos, idosos, crianças e recém-nascidos. Em modalidades da presente divulgação, o “indivíduo” ou “sujeito” é um “paciente”.

[00275] O termo “paciente” significa um indivíduo ou sujeito para tratamento, em particular um indivíduo ou sujeito doente.

[00276] As estratégias de combinação no tratamento do câncer podem ser desejáveis devido a um efeito sinérgico resultante, que pode ser consideravelmente mais forte do que o impacto de uma abordagem monoterapêutica. Em uma modalidade, a composição farmacêutica é administrada com um agente imunoterapêutico. Como utilizado neste documento, “agente imunoterapêutico” refere-se a qualquer agente que pode estar envolvido na ativação de uma resposta imune específica e/ou função (ões) efetoras imunes. A presente divulgação contempla o uso de um anticorpo como agente imunoterapêutico. Sem desejar estar limitado pela teoria, os anticorpos são capazes de atingir um efeito terapêutico contra as células cancerígenas por meio de vários mecanismos, incluindo indução de apoptose, bloqueio de componentes das vias de transdução de sinal ou inibição da proliferação de células tumorais. Em certas modalidades, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Um anticorpo monoclonal pode induzir a morte celular via citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC), ou ligar proteínas do complemento, levando à toxicidade celular direta, conhecida como citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Exemplos não limitativos de anticorpos anticâncer e alvos de anticorpos potenciais (entre colchetes) que podem ser usados em combinação com a presente divulgação incluem: Abagovomabe (CA-125), Abciximabe (CD41), Adecatumumabe (EpCAM), Afutuzumabe (CD20), Alacizumabe pegol (VEGFR2), Altumomabe pentetato (CEA), Amatuximabe (MORAb- 009), Anatumomabe mafenatox (TAG-72), Apolizumabe (HLA-DR), Arcitumomabe (CEA), Atezolizumabe (PD-L1), Bavituximabe (fosfatidilserina), Bectumomabe (CD22), Belimumabe (BAFF),

Bevacizumabe (VEGF-A), Bivatuzumabe mertansina (CD44 v6), Blinatumomabe (CD 19), Brentuximabe vedotina (CD30 TNFRSF8), Cantuzumabe mertansina (mucina CanAg), Cantuzumabe ravtansina (MUC1), Capromabe pendetídeo (células de carcinoma prostático), Carlumabe (CNT0888), Catumaxomabe (EpCAM, CD3), Cetuximabe (EGFR), Citatuzumabe bogatox (EpCAM), Cixutumumabe (IGF-1 receptor), Claudiximabe (Claudin), Clivatuzumabe tetraxetano (MUC1), Conatumumabe (TRAIL-R2), Dacetuzumabe (CD40), Dalotuzumabe (receptor do fator de crescimento semelhante à insulina I), Denosumabe (RANKL), Detumomabe (célula de linfoma B), Drozitumabe (DR5), Ecromeximabe (GD3 gangliosídeo), Edrecolomabe (EpCAM), Elotuzumabe (SLAMF7), Enavatuzumabe (PDL192), Ensituximabe (NPC-1C), Epratuzumabe (CD22), Ertumaxomabe (HER2/neu, CD3), Etaracizumabe (integrina αvβ3), Farletuzumabe (receptor de folato), FBTA05 (CD20), Ficlatuzumabe (SCH 900105), Figitumumabe (receptor IGF-1), Flanvotumabe (glicoproteína 75), Fresolimumabe (TGF-β), Galiximabe (CD80), Ganitumabe (IGF-I), Gemtuzumabe ozogamicina (CD33), Gevokizumabe (ILIβ), Girentuximabe (anidrase carbônica 9 (CA-IX)), glembatumumabe vedotina (GPNMB), Ibritumomabe tiuxetano (CD20), Icrucumabe (VEGFR-1), Igovoma (CA-125), Indatuximabe ravtansina (SDC1), Intetumumabe (CD51), Inotuzumabe ozogamicina (CD22), Ipilimumabe (CD 152), Iratumumabe (CD30), Labetuzumabe (CEA), Lexatumumabe (TRAIL-R2), Libivirumabe (antígeno de superfície da hepatite B), Lintuzumabe (CD33), Lorvotuzumabe mertansina (CD56), Lucatumumabe (CD40), Lumiliximabe (CD23), Mapatumumabe (TRAIL-R1), Matuzumabe (EGFR), Mepolizumabe (IL5), Milatuzumabe (CD74), Mitumomabe (GD3 gangliosídeo), Mogamulizumabe (CCR4), Moxetumomabe pasudotox (CD22), Nacolomabe tafenatox (antígeno C242), Naptumomabe estafenatox (5T4), Namatumabe (RON), Necitumumabe (EGFR), Nimotuzumabe (EGFR), Nivolumabe (IgG4), Ofatumumabe (CD20), Olaratumabe (PDGF-R a), Onartuzumabe (receptor quinase do fator de dispersão humano), Oportuzumabe

monatox (EpCAM), Oregovomabe (CA-125), Oxelumabe (OX-40), Panitumumabe (EGFR), Patritumabe (HER3), Pemtumoma (MUC1), Pertuzuma (HER2/neu), Pintumomabe (antígeno de adenocarcinoma), Pritumumabe (vimentina), Racotumomabe (ácido N-glicolilneuramínico), Radretumabe (fibronectina domínio B extra), Rafivirumabe (glicoproteína do vírus da raiva), Ramucirumabe (VEGFR2), Rilotumumabe (HGF), Rituximabe (CD20), Robatumumabe (receptor IGF-1), Samalizumabe (CD200), Sibrotuzumabe (FAP), Siltuximabe (IL6), Tabalumabe (BAFF), Tacatuzumabe tetraxetano (alfa fetoproteína), Taplitumomabe paptox (CD 19), Tenatumomabe (tenascina C), Teprotumumabe (CD221), Ticilimumabe (CTLA- 4), Tigatuzumabe (TRAIL-R2), TNX-650 (IL13), Tositumomabe (CD20), Trastuzumabe (HER2/neu), TRBS07 (GD2), Tremelimumabe (CTLA-4), Tucotuzumabe celmoleuquina (EpCAM), Ublituximabe (MS4A1), Urelumabe (4-1BB), Volociximabe (integrina α5β1), Votumumabe (antígeno de tumor CTAA 16.88), Zalutumumabe (EGFR), e Zanolimumabe (CD4).

[00277] A citação de documentos e estudos aqui referenciados não pretende ser uma admissão de que qualquer um dos itens anteriores é a técnica anterior pertinente. Todas as declarações quanto ao conteúdo destes documentos baseiam-se nas informações de que os candidatos dispõem e não constituem qualquer admissão quanto à correção do conteúdo dos mesmos.

EXEMPLOS

[00278] A invenção é adicionalmente descrita em detalhes por referência aos seguintes exemplos experimentais. Esses exemplos são proporcionados apenas para fins ilustrativos e não devem ser limitados, a menos que especificado de outra forma. Assim, a invenção não deve, de modo algum, ser interpretada como estando limitada aos exemplos seguintes, mas deve ser interpretada de modo a abranger todas e quaisquer variações que se tornam evidentes como resultado do ensino

aqui provido.

[00279] Sem descrição adicional, acredita-se que um versado na técnica pode, usando a descrição anterior e os seguintes exemplos ilustrativos, fazer e utilizar os compostos da presente invenção e praticar os métodos reivindicados. Os seguintes exemplos de trabalho, portanto, apontam especificamente as modalidades preferidas da presente invenção, e não devem ser interpretados como limitando de qualquer forma o restante da divulgação.

Exemplo 1: Materiais e Métodos

[00280] As técnicas e métodos aqui utilizados são aqui descritos ou realizados de uma maneira conhecida per se e conforme descrito, por exemplo, em Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Todos os métodos, incluindo o uso de kits e reagentes, são realizados de acordo com as informações do fabricante, a menos que especificamente indicado.

Construto CAR

[00281] Vetor pES de autoinativação retroviral gama (SIN).12-6 foi usado para superexpressar de forma estável o CLDN6-CAR-BBz em células T humanas sob o controle de um promotor eucariótico interno, a versão curta sem íntron do promotor do fator de alongamento 1-alfa humano (EFS –213/+ 31). A espinha dorsal do vetor contém as sequências de tipo selvagem de MLV das regiões R- e U5 nas LTRs 5’ e 3’, bem como a região de empacotamento (psi e psi +). Os elementos intensificadores na região U3 da 3’-LTR foram eliminados (incluindo CAAT-Box) e a sequência TATA-Box foi mutada para prevenir o início da transcrição. A versão truncada do elemento regulatório pós-transcricional (PRE) do vírus da hepatite da marmota (WHV) é usada para prevenir a expressão de proteínas virais indesejadas.

[00282] O CLDN6-CAR-BBz compreende um peptídeo de sinalização de IgG humana, um fragmento Fv de cadeia única do anticorpo específico de CLDN6 IMAB206 (Ganymed Pharmaceuticals) com um ligante $(G_4S)_3$ entre a cadeia pesada (V_H) e a leve (V_L) contendo uma substituição de cisteína por serina na posição 46 do V_L (posição 45 do V_L mostrada na listagem de sequências). O fragmento scFv é fundido à dobradiça CD8α humana e região transmembranar seguida por frações de sinalização de 4-1BB humano e CD3zeta (Q14K) humano.

Linhagens celulares e reagentes

[00283] O CLDN6 humano que expressa a linhagem celular de teratoma PA-1-SC12_A0201_luc_gfp foi cultivado em meio MEM-GlutaMAX suplementado com 10% (*v/v*) FCS (Biochrom), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco), 1 mM de solução de aminoácidos MEM não essenciais (Gibco) e solução de bicarbonato de sódio a 2% (*v/v*) (Gibco). A linhagem celular superexpressa HLA-A*0201, luciferase e GFP.

[00284] A linhagem celular de carcinoma do ovário OV-90-SC12 foi cultivada em 41,5% (*v/v*) meio MCDB 105 (Sigma-Aldrich), 41,5% (*v/v*) Meio 199 (Sigma Aldrich) suplementado com 15% (*v/v*) FCS e 2% (*v/v*) de solução de bicarbonato de sódio 7,5%.

[00285] O meio de cultura da linhagem celular de melanoma humano SK-MEL-37 é composto por 90% de DMEM GlutaMAX™ (Gibco) suplementado com 10% (*v/v*) de FCS.

[00286] O meio de cultura para MDA-MB-231 é composto por 88% (v/v) de RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) e foi suplementado com 10% de FCS, piruvato de sódio 1 mM, solução de aminoácidos não essenciais MEM 1 mM.

[00287] A linhagem de células de adenocarcinoma humano 23132-87 e a linhagem de células de melanoma humano MEL-526 foram cultivadas em 90% *(v/v)* RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) suplementado com 10% (*v/v*) de FCS inativado pelo calor.

[00288] O meio de cultura para HEK-293 era composto por 90% *(v/v)* de Meio Essencial Mínimo de Eagle (EMEM) (ATCC) e 10% (*v/v*) FCS.

[00289] SKOV-3 foi cultivado em 90% *(v/v)* Meio McCoy 5A (ATCC) suplementado com 10% (*v/v*) FCS.

[00290] A linhagem celular de ovário humano NIH-OVCAR-3 foi cultivada em 80% *(v/v)* RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco, Cat-No. 61870) suplementado com 20% (*v/v*) de FCS e 0,1% (p/v) Insulina (Sigma-Aldrich).

[00291] As linhagens de células tumorais humanas LCLC-103H, COLO-699-N, JAR e NEC-8 foram cultivadas em 90% *(v/v)* RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) suplementado com 10% (*v/v*) FCS.

[00292] A semeadura e/ou divisão das linhagens celulares foram feitas a cada 2 ou 3 dias.

Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) e células dendríticas (DCs)

[00293] PBMCs foram isolados por centrifugação de gradiente de densidade Ficoll®-Hypaque (1,077 g/mL Amersham Biosciences) a partir de películas amareladas. Os monócitos foram enriquecidos com microesferas anti-CD14 (Miltenyi Biotec). DCs imaturos (iDCs) foram diferenciados por cultura em meio DC consistindo em RPMI 1640 GlutaMAX™, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 1 mM de piruvato de sódio, aminoácidos não essenciais e 5% (*v/v*) de soro AB humano inativado por calor (todos da Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) suplementado com 1000 U/mL h GM-CSF (Essex, Lucerne, Suíça) e 1000 U/mL h IL-4 (Strathmann Biotech, Hamburgo, Alemanha).

Transdução de células T

[00294] As células T foram enriquecidas a partir de PBMCs por separação magnética de células T $CD3^{+}/CD28^{high+}$ usando Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28 CTS. As células foram incubadas com

esferas para razão de células T $CD3^+$ de três para um e separadas usando um ímã CTS DynaMag. As células T enriquecidas foram cultivadas em meio X-VIVO 15 suplementado com 5% (*v/v)* de soro humano na presença de 450 U/mL de rh IL-7 e 50 U/mL de rh IL-15 (ambos da Miltenyi Biotec). Três dias depois, as esferas de CD3/CD28 foram removidas usando um ímã e as células T pré-ativadas foram transduzidas com vetores retrovirais na presença de Protransduzin®-A em uma concentração final de 25 µg/mL. As células foram expandidas até o dia 7 ou dia 10 em meio de cultura completo e foram usadas diretamente para avaliar a expressão de superfície do CAR, fenótipo de células T e funções efetoras ou foram criopreservadas.

Análises de citometria de fluxo de células cultivadas *in vitro*

[00295] A expressão da superfície celular de CARs transduzidos foi analisada usando um anticorpo específico de idiotipo conjugado com Alexa-Fluor-647 (Ganymed Pharmaceuticals) que reconhece o fragmento *scFv* contido em todos os construtos CLDN6-CAR. A expressão de superfície de CLDN6 em células alvo foi analisada por coloração com um anticorpo IMAB027 específico de CLDN6 conjugado com Alexa-Fluor647 (Ganymed Pharmaceuticals). A medição citométrica de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCanto™II usando o software FACSDiva™ (BD Biosciences) e a análise realizada usando FlowJo® V10 (treestar inc.).

PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

[00296] O RNA total foi isolado das linhagens celulares indicadas usando RNeasy® Mini Kit (QIAGEN). Para a transcrição reversa de RNA a fim de obter cDNA para qRT-PCR, o PrimeScript™ RT Reagent Kit com gDNA Eraser (TAKARA) foi usado começando com 1 µg de RNA total. A PCR quantitativa em tempo real foi realizada usando o kit QuantiTect SYBR® Green PCR (QIAGEN) com os seguintes iniciadores (5'-3'): *CLDN6*-para: CTT ATC TCC TTC GCA GTG CAG, *CLDN6*-rev: AAG GAG GGC GAT

GAC ACA GAG, *HPRT1*-para: TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA, *HPRT1*-rev: GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT (temperatura de recozimento: 62°C).

Ensaio de citotoxicidade xCELLigence

[00297] Para avaliação da citotoxicidade mediada por CAR, foi usado o sistema xCELLigence (OMNI Life Science). As medições de impedância do índice celular (CI) foram realizadas de acordo com as instruções do fornecedor. A densidade celular ideal, resultando em uma curva de crescimento exponencial, foi determinada para cada linhagem de células tumorais. As células alvo foram semeadas em concentrações de 2-10^4 células por poço em E-plate 96 PET (ACEA Biosciences Inc.). Após 24 h, vários números de células T transduzidas por CAR foram adicionados em um volume final de 200 µL e monitorados a cada 30 min por um período de até 48 h pelo sistema xCELLigence.

[00298] A porcentagem de lise específica foi calculada da seguinte forma:

$$(\text{CI } L_{min} - \text{CI }_{\text{amostra}})/\text{CI } L_{min} \times 100$$

O desvio padrão foi calculado da seguinte forma:

$$100 \times (\text{CI }_{\text{amostra}}/\text{CI } L_{min}) \times \{ \sqrt{} [(STDEV \text{ de CI }_{\text{amostra}}/ \text{ CI }_{\text{amostra}})^2 + (STDEV \text{ de CI } L_{min}/\text{CI } L_{min})^2]\}$$

[00299] O índice celular máximo correspondente à lise mínima (L_{min}) foi avaliado após incubar as células alvo com células T efetoras que expressam um antígeno de controle (por exemplo, eGFP, controle-CAR).

Ensaio de proliferação de CFSE (Éster succinimidílico de carboxifluoresceína)

[00300] Para determinar a porcentagem de células T em proliferação

após estimulação específica do antígeno, células T que expressam CAR foram marcadas com 1,6 µM do corante fluorescente carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE) por 10 min a 37°C (protegido da luz). Para remover qualquer corante livre, FCS puro foi adicionado às células e incubado por mais 5 minutos. As células foram lavadas, ressuspensas em meio de cultura e cocultivadas com células alvo usando diferentes proporções de efetor para alvo (E:T) em um volume total de 200 µL de meio DC em placas de fundo redondo de 96 poços. Após 5 dias de cocultura, as células foram coradas com anticorpos conjugados com fluorocromo direcionados, por exemplo, contra CD4, CD8 e o CAR. A porcentagem de células T em proliferação foi analisada por citometria de fluxo com base na redução progressiva para metade da fluorescência CFSE dentro das células filhas após as divisões celulares utilizando um citômetro de fluxo BD FACSCanto™II (Becton Dickinson).

Ensaio de esferoide (IncuCyte®)

[00301] Os esferoides do tumor foram gerados pela cultura de $1x10^4$ células PA1-SC12-A2-eGFP por poço em meio MEM-GlutaMAX suplementado com 10% *(v/v)* FCS, 1% *(v/v)* Na-Pyruvat, 1% *(v/v)* MEM NEAA e 2% *(v/v)* Na-Bicarbonat em uma placa de 96 poços de fundo redondo Corning® Costar® Ultra-Low Attachment por 48 h após a centrifugação. Células CAR T foram adicionadas ($1x10^5$/poço) e esferoides tumorais que expressam eGFP foram fotografados com ampliação de 4 vezes e um tempo de exposição de 300 ms para detectar fluorescência verde em um sistema de imageamento de conteúdo IncuCyte Zoom Live (Essen Bioscience) a 37°C, cinco $\%CO_2$. As imagens foram adquiridas a cada hora durante 10 dias. Os dados foram analisados usando o software de análise IncuCyte para detectar e quantificar a intensidade total integrada do objeto verde (GCU x μm^2/Imagem). As médias das contagens de objetos verdes com SD em cada ponto de tempo foram plotadas usando o software de análise

IncuCyte.

Geração de mRNA transcrito *in vitro* (IVT)

[00302] As transcrições *in vitro* de mRNAs que codificam antígeno foram baseadas nas espinhas dorsais do plasmídeo pST1-T7-GG-hAg-MCS-2hBg-A30LA70 e nos construtos de DNA derivados. Estes construtos de plasmídeo contêm além da ORF de comprimento total a α-globina 5' humana, duas UTR de β-globina humana 3' em série e uma cauda poli (A) de 100 nucleotídeos, com um ligante após 70 nucleotídeos. Os mRNAs que codificam o antígeno foram gerados por transcrição *in vitro* , conforme descrito por Holtkamp S. *et al.* (2006) Blood 108(13):4009-17. A transcrição *in vitro* de todas os construtos de mRNA descritas foi realizada na BioNTech RNA Pharmaceuticals GmbH.

Geração de antígeno formulado lipossômico que codifica IVT RNA ($RNA_{(LIP)}$) e transfecção *in vitro* de células dendríticas

[00303] A complexação do antígeno que codifica o RNA IVT com lipossomas foi previamente descrito em Kranz et al (2016) Nature 534(7607):396-401. Foi utilizada uma razão de carga de 1,3 para 2 de DOTMA catiônico e RNA. Além do DOTMA, a fração lipídica contém o lipídeo auxiliar DOPE em uma razão molar de 2:1 DOTMA por DOPE.

Técnicas Experimentais com Animais

Animais

[00304] Camundongos imunodeficientes fêmeas NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) de nove a 21 semanas de idade foram usados para estudos *in vivo* . Os pares reprodutores foram adquiridos do laboratório Jackson (Bar Harbor, ME, EUA) e criados no biotério da BioNTech AG, Alemanha. Camundongos C57BL/6BrdCrHsd-*Tyr*^{c} foram adquiridos da Envigo Labs. Animais pareados por idade (8-10 semanas) e sexo (macho

ou fêmea) foram usados ao longo dos experimentos. Camundongos C57Bl/6-Thy1.1 congênicos foram criados nas instalações de animais da BioNTech AG, Alemanha. Todos os experimentos foram realizados em condições livres de patógenos específicos (SPF) e de acordo com os regulamentos alemães de experimentação animal.

Enxerto de células tumorais

[00305] Qualquer de células tumorais 5x10^6 OV90-SC12 ou 5x10^5 CT26 foram injetadas subcutaneamente (em 100 µL de PBS) no lado direito do flanco posterior dos camundongos. O monitoramento do crescimento do tumor e o cálculo do volume foram determinados usando um paquímetro e inseridos na fórmula V = ½ (comprimento x largura²). Antes da transferência adotiva de células T humanas projetadas por CAR, portadores de tumor foram estratificados usando o suplemento XL Toolbox de Daniels para Microsoft Excel para atingir enormes distribuições de volume tumoral entre diferentes grupos de tratamento.

Transferência de células adotivas (ACT) de células T humanas

[00306] Diferentes quantidades de células T humanas totais transduzidas por gama-retroviral (número e frequência de células T que expressam o transgene CAR ou GFP estão indicadas nas respectivas figuras) foram injetadas por via intravenosa no plexo retrobular em 200 µL de PBS. Dependendo do cenário experimental, as células T transduzidas foram usadas diretamente após a ativação *in vitro* e o processo de transdução ou as células T transduzidas criopreservadas foram descongeladas e transferidas diretamente de forma adotiva após 2 vezes de lavagem com PBS em camundongos, respectivamente. A viabilidade de todos os produtos de células T usados na experiência foi > 90%.

Monitoramento de células T CAR humanas *in vivo* no sangue

[00307] Nos pontos de tempo indicados, 50 µL de sangue periférico foram recuperados da veia retro-orbital e coletados em tubos de reação contendo heparina (Sarstedt). Os glóbulos vermelhos foram lisados usando solução BD FACS Lysing (BD). A expressão de CAR na superfície de células T humanas transferidas foi analisada usando hCD45-PE-Cy7 (HI30, BD), hCD4-APC-Cy7 (OKT4, BioLegend), hCD8-BV421 (RPA-T8, BD) e Alexa-Fluor 647-anticorpo específico de idiotipo conjugado (Ganymed Pharmaceuticals). As células mortas foram discriminadas da análise usando 7-AAD (Beckmann Coulter). A medição citométrica de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCanto™II usando o software FACSDiva™ (BD Biosciences) e a análise realizada usando FlowJo® V10 (Treestar inc.).

Manipulação de genes retrovirais e preparação de células T CAR para transferência adotiva de células T

[00308] Esplenócitos de C57Bl/6-Thy1.1+ naïve ou Balb/c-Thy1.1+ foram isolados e pré-ativados por Dynabeads™ Mouse T-Activator CD3/CD28 em uma razão de esferas para células T de 1:1 (Invitrogen) na presença de 5 ng/mL de IL-7 humana (rh) recombinante e 5 ng/mL de rh IL-15 (Miltenyi Biotec). Para a transdução de células murinas, os sobrenadantes retrovirais pseudotipados com MLV-E foram carregados em placas de poços tratados com cultura não revestida com RetroNectin (2 µg/cm^2) de acordo com as instruções do fabricante (Takara Bio Inc., Otsu, Japão), com 3 ciclos repetidos de carregamento de vírus e centrifugação (1.300 xg, 15°C, 15 min) para aumentar a ligação. 24h após a pré-ativação, 0,5-0,6x10^6 células/cm^2 (300 xg, 37°C, 1h) em poços revestidos com partículas virais. Após o cultivo durante a noite, a transdução spin-down foi repetida com placas recém-revestidas com partículas virais. 72h após a pré-ativação, Dynabeads™ Mouse T-Activator CD3/CD28 foram removidos da cultura e as células foram expandidas na presença de 5 ng/mL rh IL-7 e 5 ng/mL rh IL-15. Após a

limpeza de ficoll, as células foram lavadas duas vezes com PBS para remover as proteínas séricas e, em seguida, foram preparadas para a transferência adotiva de células (ACT). Vetores retrovirais baseados em pES12.6 contendo CLDN6-CAR-BBz codificado como luciferase de vagalume intensificada (effLuc; Rabinovich *et al.*BA, PNAS (2008) PNAS 105(38):14342-6) e gene repórter eGFP (proteína de fluorescência verde intensificada), que é expresso separadamente usando elementos de emenda 2A (Szymczak *et al.* AL, Nature Biotechnology, (2004) Nat Biotechnol. 22(5):589-94) foram usados para a transdução.

Transferência de células T adotivas de células T murinas e vacinação de RNA$_{(LIP)}$

[00309] Células T Thy1.1^{+} congênicas com CAR transduzidas por gama retroviral foram transferidas por viaintravenosa (*i.v.*) para camundongos doadores irradiados com corpo total (XRAD320) C57BL/6BrdCrHsd-*Tyr^{c}* ou BALB/c, respectivamente. Posteriormente, os camundongos foram vacinados por via intravenosa (*i.v.*) com uma razão F12:RNA de 1,3:2 de RNA que codifica o antígeno$_{(LIP)}$ em vários pontos de tempo após ACT. A expansão do CAR *in vivo* foi analisada por meio de imageamento de bioluminescência de corpo inteiro e a eficácia antitumoral foi analisada por monitoramento do tumor.

Imageamento de luciferase *in vivo* (BLI)

[00310] A expansão e distribuição de células T transduzidas por CAR-effLuc-GFP foram avaliadas por imageamento de bioluminescência *in vivo* usando o sistema de imageamento IVIS Lumina (Caliper Life Sciences). Resumidamente, uma solução aquosa de D-luciferina (80 mg/kg de peso corporal; Perkin Elmer) foi injetada *i.p.* em pontos de tempo indicados após a transferência adotiva de células T transduzidas. 5 min depois disso, os fótons emitidos foram quantificados (tempo de integração de 1 min, armazenamento 8). A bioluminescência *in vivo* nas regiões de

interesse (ROI) foi quantificada como fluxo total (fótons/s) usando o Software IVIS Living Image 4.0. A intensidade da luz transmitida proveniente de células que expressam luciferase dentro do animal foi representada como uma imagem em tons de cinza, onde o preto é o menos intenso e o branco a cinza escuro o sinal de bioluminescência mais intenso. Imagens de referência em escala de cinza de camundongos foram obtidas sob iluminação LED de baixa luminosidade. As imagens foram sobrepostas por meio do software Living Image 4.0.

Análise Estatística e Representação de Dados

[00311] Todos os resultados são representados com média +/- SD de réplicas técnicas ou média +/- SEM de réplicas biológicas. O número de amostras replicadas é indicado na descrição da figura de cada experimento. O teste t de Student bicaudal não pareado foi usado para a comparação da área sob a curva (AUC) de dois grupos. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad PRISM 6.04. *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$.

Exemplo 2: Geração e caracterização *in vitro* de CARs específicos de CLDN6

[00312] Para a seleção da estrutura principal, geramos diferentes espinhas dorsais CAR que compartilham o mesmo fragmento scFv derivado do anticorpo específico de CLDN6 IMAB206-C46S, mas diferem em seus domínios de dobradiça e coestimulatórios (Figura 1A). Como a coestimulação 4-1BB demonstrou aumentar a persistência e a eficácia antitumoral das células CAR T, incluímos espinhas dorsais do CAR de 2ª e 3ª geração contendo o endodomínio 4-1BB. Alternativamente ou além disso, um domínio CD28 modificado (Kofler D.M. *et al.*, (2011) Molecular Therapy 19 (4), 760–767) foi incorporado conhecido por fornecer coestimulação mediada por CD28 à célula T modificada na ausência de ligandos agonísticos CD28, como B7.1 e B7.2. Os fragmentos scFv foram

fundidos aos domínios coestimulatórios 4-1BB ou CD28 por meio de um IgG Fc modificado (Hombach A. *et al.*, (2010) Gene Therapy 17, 1206–1213) ou uma região de dobradiça CD8α.

[00313] Os diferentes CLDN6-CARs foram extensivamente caracterizados *in vitro* por seu potencial para reconhecer e matar de forma sensível e específica células tumorais que expressam CLDN6. Entre outras experiências, um ensaio de esferoide tumoral foi realizado utilizando células T transduzidas por CAR em combinação com eGFP expressando esferoides tumorais PA1. Na verdade, uma lise acelerada de esferoides tumorais que expressam CLDN6 por 4-1BB contendo CARs em comparação com um CAR carregando o domínio CD28 poderia ser detectada usando imageamento em tempo real IncuCyte® (Figura 1B).

[00314] Com base no resumo dos resultados de diferentes estudos de caracterização funcional, selecionamos o CLDN6-CAR-CD8h-BBz como estrutura principal para testes pré-clínicos e clínicos, pois poderíamos demonstrar um reconhecimento altamente específico e sensível de CLDN6, bem como um alto potencial de sobrevivência e estimulação repetitiva de células T CAR engenheiradas. É importante ressaltar que esta espinha dorsal de CAR já foi usada com sucesso em vários ensaios de células T CD19-CAR. Para integração estável de nosso CLDN6-CAR no genoma de células T, selecionamos o vetor γ-retroviral autoinativador (SIN) pES12.6 para integração estável do CLDN6-CAR terapêutico no genoma de células T (Loew *et al.*, Gene Therapy (2010) 17, 272–280).

Exemplo 3: Sensibilidade do CLDN6-CAR-BBz

[00315] A fim de analisar a sensibilidade do reconhecimento mediado por CAR em mais detalhes, um experimento de titulação de RNA CLDN6 foi conduzido. Para esse fim, a linhagem celular de carcinoma do pulmão negativa para CLDN6 Colo699-N foi transfectada com quantidades tituladas de CLDN6-RNA e a lise de células alvo mediada por CLDN6-CAR foi avaliada por ensaio de citotoxicidade xCELLigence. A expressão de

superfície CLDN6-CAR em células T transduzidas (Figura 2A) e os níveis de expressão da proteína CLDN6 em células Colo699-N transfectadas (Figura 2B) foram avaliados por citometria de fluxo após coloração com anticorpos específicos de CLDN6-CAR e CLDN6. A morte específica de células alvo transfectadas com CLDN6-RNA por células T que expressam CLDN6-CAR pode ser observada dependente da dose de CLDN6-RNA utilizada para transfecção de células Colo699-N correlacionando com o número de moléculas CLDN6 na superfície da célula alvo conforme avaliado por citometria de fluxo (Figura 2C). As células CAR T mesmo mediaram a lise, se números muito baixos de moléculas CLDN6 foram expressos na superfície da célula alvo após a transfecção de apenas 0,01 µg de CLDN6-RNA, que foram dificilmente detectáveis por citometria de fluxo.

Exemplo 4: Segurança do CLDN6-CAR-BBz

[00316] A fim de avaliar a segurança do CLDN6-CAR-BBz, foi realizado um ensaio de triagem de linhagem celular. Para esse fim, células T transduzidas por CLDN6-CAR-BBz (Figura 3A) foram cultivadas com um painel de linhagens de células tumorais CLDN6-positivas e CLDN6-negativas de diferentes origens de tecido (Figura 3B) e o reconhecimento e lise de células alvo foram analisados por ensaio de citotoxicidade xCELLigence (Figura 3C). Em paralelo CLDN6-mRNA e nível de expressão de proteína nas linhagens de células alvo foram avaliados por qRT-PCR e citometria de fluxo, respectivamente (Figura 3D, E). Pode ser demonstrado que o reconhecimento e a lise de linhas de células alvo estão estritamente correlacionadas com o mRNA de CLDN6 e os níveis de expressão de proteína.

Exemplo 5: Proliferação de células T CAR

[00317] Um pré-requisito essencial para a eficácia antitumoral das células T engenheiradas por CLDN6-CAR-BBz é sua capacidade de

proliferar e persistir no paciente. A fim de analisar, se as células T CLDN6-CAR proliferam de forma eficiente em resposta a CLDN6 ectopicamente expresso em iDCs, foi realizado um ensaio de cocultura *in vitro* baseado em CFSE. As células T transduzidas por CLDN6-CAR foram marcadas com CFSE e cocultivadas com iDCs autólogos transfectados com quantidades tituladas de lipoplexos de RNA ($RNA_{(LIP)}$) que codificam CLDN6 ou um antígeno de controle. A expressão de superfície do CLDN6-CAR em células T e CLDN6 em células alvo foi verificada por citometria de fluxo (Figura 4A, B). Após cinco dias de cocultura, a proliferação específica do antígeno de células T CD4+ e CD8+ expressando CAR marcadas com CFSE foi analisada por citometria de fluxo (Figura 4C).

[00318] A proliferação dependente da dose mediada por CLDN6-CAR correlacionando-se com a quantidade de CLDN6-$RNA_{(LIP)}$ transfectadas, enquanto apenas a proliferação de fundo poderia ser observada, se os iDCs fossem transfectados com RNA de $controle_{(LIP)}$. Estes dados confirmam que a expansão específica do antígeno eficiente de células T CLDN6-CAR-BBz é induzida após a estimulação específica do antígeno.

Exemplo 6: Eficácia antitumoral *in vivo* do CLDN6-CAR-BBz

[00319] Após a indução de funções efetoras específicas do antígeno mediada por CAR ter sido demonstrada *in vitro*, o potencial terapêutico das células T CLDN6-CAR-BBz humanas foi investigado *in vivo* em um modelo de tumor de xenoenxerto avançado. Nesta extensão, camundongos imunodeficientes NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) foram enxertados subcutaneamente com células de carcinoma de ovário humano que expressam CLDN6 endogenamente (OV90). Os camundongos NSG portadores de tumor OV90 foram então tratados com uma dose única de $1x10^7$ células T CLDN6-CAR ou eGFP transduzidas (aproximadamente $5x10^8$ células T/kg) administradas i.v. (Figura 5 A). O CLDN6-CAR foi expresso em cerca de 16-18% das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ humanas (Figura 5B). Digno de nota, a transferência adotiva de

células T CLDN6-CAR levou à regressão completa de grandes tumores com um volume tumoral médio de 170 mm^3 no dia da transferência adotiva, enquanto nenhum efeito antitumoral pôde ser observado no grupo de controle (Figura 5C) . Este efeito antitumoral significativo se correlacionou com a persistência de células T CLDN6-CAR-BBz no sangue periférico de camundongos tratados (Figura 5D).

Exemplo 7: Funcionalidade *in vitro* de células T CAR cultivadas de curto e longo prazo

[00320] Como a fabricação reproduzível de produtos de células T CAR de grau clínico de alta qualidade é um pré-requisito para os testes clínicos, o processo de fabricação de GMP foi otimizado para alcançar altas eficiências de transdução e número e qualidade suficientes de células T expressando CLDN6-CAR. O procedimento de transdução também foi simplificado reduzindo o número de transduções de duas para uma e encurtando o tempo de cultura *ex vivo* de 10 para 7 dias. Foi demonstrado que as células T cultivadas por um curto período de tempo exibem eficácia melhorada em comparação com as células T expandidas e exauridas de longo prazo (PMID: 30030295). Consequentemente, o encurtamento do tempo de cultura não só economiza tempo e custo, mas o mais importante, deve levar a um potencial intensificado de células T modificadas para expandir e persistir no paciente.

[00321] A fim de comparar a eficácia antitumoral *in vitro* de células T CLDN6-CAR-BBz cultivadas de curto prazo (7 dias) e longo prazo (10 dias), foi conduzido um experimento de esferoide de longo prazo. A avaliação da expressão de superfície de CAR por citometria de fluxo revelou níveis de expressão de CAR quase comparáveis, enquanto a frequência de células T positivas para CAR foi ligeiramente menor na amostra de células T cultivadas em 7 dias (Figura 6A). A fim de analisar o potencial de morte repetitiva, as células CAR T foram cocultivadas com CLDN6 e eGFP expressando esferoides tumorais PA1-SC12-A2-eGFP e a

morte de esferoides tumorais foi monitorada em tempo real com base no sinal de eGFP usando o sistema IncuCyte®. Após a erradicação completa do esferoide tumoral, um novo esferoide tumoral foi adicionado (Figura 6B). Pode ser demonstrado que as células T CAR cultivadas a curto prazo têm um potencial comparável para morte repetitiva como células T cultivadas a longo prazo.

Exemplo 8: Funcionalidade *in vivo* de células T CAR descongeladas fabricadas com GMP

[00322] Como o processo de transdução de GMP destinado ao uso clínico gera um produto de células T CAR criopreservadas, foi de importância seminal validar o potencial antitumoral de células T CLDN6-CAR-BBz descongeladas engenheiradas nas instalações de GMP. Além disso, como o processo final de fabricação do GMP poderia ser encurtado (colheita no dia 7 em vez do dia 10), essa modificação no protocolo final teve que ser avaliada através da realização de um estudo *in vivo* . Mais importante ainda, as células T CLDN6-CAR-BBz humanas descongeladas demonstraram eficácia antitumoral significativa comparável às células T CAR recém-geradas e tumores avançados erradicados com um volume tumoral médio de 160 mm^3 no modelo de xenoenxerto de carcinoma ovariano (Figura 7A). Além disso, as células CAR T colhidas no dia 7 ou 10 que mostraram expressão de superfície CAR semelhante (Figura 7B) foram comparadas quanto à sua eficácia antitumoral neste experimento (Figura 7C). Em correlação com os resultados da experiência de esferoide tumoral de longo prazo, ambos os produtos de células T CAR mediaram a rejeição completa do tumor com cinética comparável. As respostas antitumorais de ambos os produtos se correlacionaram com a persistência das células T CLDN6-CAR-BBz no sangue periférico duas semanas após a transferência adotiva (Figura 7D).

Exemplo 9: Aumento da persistência de células T transduzidas CLDN6-CAR-BBz

[00323] O sucesso clínico da terapia com células T reativas ao tumor transferido de forma adotiva também foi positivamente correlacionado com a persistência dessas células *in vivo* (Robbins *et al.* (2004) J Immunol. 173(12):7125-30, Huang *et al.* (2005) 28(3):258-67). Por isso, analisamos se a exposição ao antígeno *in situ* poderia intensificar a persistência de células T CLDN6-CAR-BBz *in vivo*. Uma vez que um modelo de xenoenxerto não é suficiente para estudar a persistência de longo prazo de células T CAR devido à doença de enxerto contra hospedeiro de células T humanas em tecidos murinos, bem como a falta de células imunes endógenas concorrentes, estudos de persistência de células T CLDN6-CAR-BBz foram conduzidas em um modelo de camundongo singênico murino. Portanto, células T murinas de luciferase transduzidas por CAR coexpressando CLDN6-CAR-BBz foram transferidas de forma adotiva para camundongos levemente irritados (2,5 Gy) seguidos por administração repetitiva de $RNA_{(LIP)}$ que codifica CLDN6 ou um antígeno de controle e expansão da população de células T CAR foi monitorada sequencialmente por imageamento de bioluminescência (Figura 8 A).

[00324] As células T CLDN6-CAR-BBz são capazes de persistir (mais de 3 meses) *in vivo* após vacinação repetitiva com antígeno CAR formulado em lipossomas *in vivo*. As células CART desaparecem ao longo do tempo no grupo de controle enquanto as células CAR T re-estimuladas específicas do antígeno proliferam após cada tratamento com $RNA_{(LIP)}$, mesmo após uma pausa de tratamento de 3-4 semanas após a 3ª e 4ª rodadas de reforço (Fig 8 B e C). Estes dados demonstram que a tecnologia de $RNA_{(LIP)}$ da BioNTech suporta a ativação e proliferação de células T CLDN6-CAR-BBz adequadas, fornecendo coestimulação natural *in situ*, que também leva a um aumento da persistência de células T CLDN6-CAR-BBz expandidas *in vivo*.

Exemplo 10: Atividade antitumoral melhorada de células T CLDN6-CAR-BBz expandidas *in vivo*

[00325] Depois que a expansão e a persistência específicas do antígeno mediadas por CAR foram demonstradas, surgiu a questão, se aquelas células T CLDN6-CAR-BBz expandidas *in vivo* também mostram um potencial antitumoral intensificado em comparação com as contrapartes não expandidas. Para este propósito, camundongos Balb/c inoculados com $CLDN6^{dim}$ - expressando a linhagem celular de carcinoma do cólon CT26 foram tratados com uma dose moderada de $1x10^6$ células T murinas transduzidas com CLDN6-CAR-BBz ou Controle-CAR-BBz (3-$4x10^5$ células T expressando CAR). Após a administração *i.v.* de células T CAR, os camundongos receberam uma vacinação adicional com 20 µg de $RNA_{(LIP)}$ que codifica para CLDN6 de comprimento total ou antígeno de controle de comprimento total (Figura 9A). Nenhum efeito antitumoral foi observado em animais tratados com Control-CAR-BBz tratados com CLDN6-$RNA_{(LIP)}$ e apenas uma ligeira regressão do tumor pôde ser alcançada quando os camundongos foram tratados com a dose moderada de células T CLDN6-CAR-BBz em combinação com $RNA_{(LIP)}$ ctrl não relevante. No entanto, os camundongos que receberam a combinação da dose moderada de células T CAR juntamente com a vacinação de CLDN6-$RNA_{(LIP)}$ para alcançar a expansão *in vivo* de células T CLDN6-CAR-BBz mostraram uma regressão tumoral notavelmente intensificada (Figura 9B).

Exemplo 11: Eficácia antitumoral restaurada de células T CAR expandidas *in vivo* de baixa dose

[00326] Além do potencial de expansão de células T baseadas em $RNA_{(LIP)}$ *in vivo* para melhorar uma resposta antitumoral contínua, também pode ser demonstrado que esta tecnologia é bem adequada para restaurar o potencial antitumoral de uma dose de célula T CAR insuficiente. Os camundongos com tumor foram tratados com uma dose de células T CAR 10 vezes menor do que a necessária para a rejeição do tumor (Figura 10A). Enquanto o crescimento do tumor foi observado em

camundongos tratados com $RNA_{(LIP)}$ de controle, todos os animais mostraram rejeição do tumor que recebeu codificação do $RNA_{(LIP)}$ para o antígeno CAR após o transplante inicial (Figura 10C). Em consequência, as frequências de células T CAR transplantadas no sangue periférico foram notavelmente mais altas após a vacinação (Figura 10D). Compensar uma dose insuficiente de células T CAR após o transplante por tratamento adicional com $RNA_{(LIP)}$ para atingir uma expansão *in vivo* pode ser altamente útil para pelo menos dois cenários diferentes: 1) baixo rendimento do produto de células T CAR fabricadas por GMP (por exemplo, devido à baixa contagem de linfócitos na aférese inicial ou outras razões não influenciáveis) ou 2) evitar SAEs por redução da dose inicial de células T CAR (especialmente, se o CAR necessário for conhecido por causar toxicidades ou no caso de primeiros estudos de escalonamento de dose em humanos).

[00327] As divulgações de cada patente, pedido de patente e publicações aqui citadas são aqui incorporadas por referência na sua totalidade. Embora esta invenção tenha sido descrita com referência a modalidades específicas, é evidente que outras modalidades e variações desta invenção podem ser concebidas por outros versados na técnica sem afastamento do verdadeiro espírito e escopo da invenção. As Reivindicações anexas se destinam a ser interpretadas para incluir todas essas modalidades e variações equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, **caracterizada** por que compreende:

i) um domínio de ligação ao antígeno CLDN6;

ii) um domínio transmembranar; e

iii) um domínio intracelular que compreende um domínio coestimulatório 4-1BB e um domínio de sinalização CD3-zeta.

2. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** por que o domínio de ligação ao antígeno CLDN6 compreende um anticorpo, um fragmento de anticorpo, um scFv, um Fv, um Fab, um (Fab')2, um anticorpo de domínio único (SDAB), um domínio VH ou VL ou um domínio VHH de camelídeo.

3. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com a Reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** por que o domínio de ligação ao antígeno CLDN6 compreende um scFv.

4. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 3, **caracterizada** por que o domínio de ligação ao antígeno CLDN6 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 ou uma variante funcional da mesma.

5. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 4, **caracterizada** por que o domínio coestimulatório 4-1BB compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 ou uma variante funcional da mesma.

6. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 5, **caracterizada** por que deixa de compreender um domínio coestimulatório adicional.

7. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 6, **caracterizada** por que o domínio de sinalização CD3-zeta compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 ou uma variante funcional da mesma.

8. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 7, **caracterizada** por que o domínio transmembranar compreende um domínio transmembranar de uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste na cadeia alfa, beta ou zeta do receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gama, IL7Ra, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDlld, ITGAE, CD103, ITGAL, CDlla, LFA-1, ITGAM, CDllb, ITGAX, CDllc, ITGBl, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAMl (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tátil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGLl, CDIOO (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D e NKG2C ou uma variante funcional dos mesmos.

9. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 8, **caracterizada** por que o domínio transmembranar compreende um domínio transmembranar CD8α.

10. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 9, **caracterizada** por que o domínio transmembranar compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 ou uma variante funcional da mesma.

11. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações anteriores, **caracterizada** por que o domínio de ligação ao antígeno está conectado ao domínio transmembranar por um domínio de dobradiça.

12. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com a Reivindicação 11, **caracterizada** por que o domínio de dobradiça é um domínio de dobradiça CD8α.

13. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com a Reivindicação 11 ou 12, **caracterizada** por que o domínio de dobradiça compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 ou uma variante funcional da mesma.

14. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 13, **caracterizada** por que compreende:

i) um domínio de ligação ao antígeno CLDN6;

ii) um domínio de dobradiça CD8α;

iii) um domínio transmembranar CD8α; e

iv) um domínio intracelular que compreende um domínio coestimulatório 4-1BB e um domínio de sinalização CD3-zeta.

15. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 14, **caracterizada** por que compreende ainda uma sequência líder.

16. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 15, **caracterizada** por que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 ou uma variante funcional da mesma.

17. **Ácido Nucleico**, **caracterizado** por que codifica a molécula CAR, conforme definida em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 16.

18. **Ácido Nucleico**, de acordo com a Reivindicação 17, **caracterizado** por que é DNA ou RNA.

19. **Vetor**, **caracterizado** por que compreende o ácido nucleico, conforme definido na Reivindicação 17 ou 18.

20. **Vetor**, de acordo com a Reivindicação 19, **caracterizado** por que o vetor é selecionado a partir do grupo que consiste em um vetor de DNA, um vetor de RNA, um plasmídeo, um vetor de lentivírus, um vetor adenoviral e um vetor de retrovírus.

21. **Vetor**, de acordo com a Reivindicação 19 ou 20, **caracterizado** por que compreende ainda um promotor.

22. **Vetor**, de acordo com a Reivindicação 21, **caracterizado** por que o promotor é escolhido de um promotor EF-1, um promotor do gene CMV IE, um promotor EF-1α, um promotor ubiquitina C ou um promotor fosfoglicerato quinase (PGK).

23. **Célula Efetora Imune**, **caracterizada** por que compreende:

a molécula CAR, conforme definida em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 16;

o ácido nucleico, conforme definido na Reivindicação 17 ou 18; ou

o vetor, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 19 a 22.

24. **Célula Efetora Imune**, de acordo com a Reivindicação 23, **caracterizada** por que é geneticamente modificada para expressar o CAR.

25. **Célula Efetora Imune**, de acordo com a Reivindicação 23 ou 24, **caracterizada** por que é selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula T, uma célula Assassina Natural (NK) e um linfócito T citotóxico (CTL).

26. **Célula Efetora Imune**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 23 a 25, **caracterizada** por que é uma célula T CD8+.

27. **Célula Efetora Imune**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 23 a 26, **caracterizada** por que é uma célula humana.

28. **População de Células Efetoras Imunes**, **caracterizada** por que compreende múltiplas células efetoras imunes, conforme definidas em qualquer uma das Reivindicações de 23 a 27.

29. **Célula Efetora Imune**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 23 a 27, **ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 28, **caracterizada** por que as células deixam de ter expressão ou de ter baixa expressão de um TCR funcional ou um HLA funcional.

30. **Método Para Produzir Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, **caracterizado** por que compreende introduzir o ácido nucleico, conforme definido na Reivindicação 17 ou 18, ou o vetor, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 19 a 22, em uma célula efetora imune, sob condições tais que a molécula CAR é expressa.

31. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para estimular resposta imune, mediada por células a um CLDN6 que expressa população de células alvo ou tecido em um sujeito.

32. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras**

Imunes, **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para tratamento de doença associada à expressão de CLDN6.

33. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 32, **caracterizado** por que a doença associada à expressão de CLDN6 é selecionada a partir do grupo que consiste em uma doença proliferativa, uma condição pré-cancerígena, um câncer e uma indicação que deixa de estar relacionada ao câncer associada à expressão de CLDN6.

34. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 33, **caracterizado** por que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer de mama, câncer hepático, câncer de pâncreas, câncer de pele, melanomas, câncer de cabeça, sarcomas, câncer do duto biliar, câncer de células renais e câncer de bexiga urinária.

35. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para fornecer imunidade antitumoral em sujeito.

36. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 35, **caracterizado** por que o tumor é um tumor que expressa CLDN6.

37. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 31 a 36, **caracterizado** por que a célula efetora imune ou a população de células efetoras imune é autóloga ou alogênica para o sujeito.

38. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 31 a 37, **caracterizado** por que compreende ainda administrar um agente que

aumenta a eficácia da célula efetora imune ou a população de células efetoras imunes.

39. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 38, **caracterizado** por que o referido agente é escolhido de um ou mais de:

um inibidor de proteína fosfatase;

um inibidor de quinase;

uma citocina;

um inibidor de uma molécula inibidora do sistema imunológico; ou

um agente que diminui o nível ou atividade de uma célula TREG.

40. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 31 a 39, **caracterizado** por que compreende ainda a etapa de contatar a célula efetora imune ou a população de células efetoras imunes com uma molécula de antígeno cognata que se liga ao domínio de ligação ao antígeno CLDN6.

41. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 40, **caracterizado** por que a molécula de antígeno cognata é selecionada a partir do grupo que consiste em CLDN6 ou um fragmento do mesmo, ou uma variante de CLDN6 ou um fragmento de CLDN6.

42. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 40 ou 41, **caracterizado** por que a célula efetora imune ou a população de células efetoras imunes é

colocada em contato com a molécula de antígeno cognata sob condições tais que a expansão e/ou ativação da célula efetora imune ou a população de células efetoras imunes ocorre.

43. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 40 a 42, **caracterizado** por que a etapa de contato da célula efetora imune ou da população de células efetoras imunes com a molécula de antígeno cognata ocorre *in vivo* ou *ex vivo*.

44. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 40 a 43, **caracterizado** por que compreende a etapa de administrar ao sujeito a molécula de antígeno cognata ou um ácido nucleico que a codifica.

45. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 44, **caracterizado** por que o ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata é expresso nas células do sujeito para fornecer a molécula de antígeno cognata.

46. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 45, **caracterizado** por que a expressão da molécula de antígeno cognata está na superfície celular.

47. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 44 a 46, **caracterizado** por que o ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata é transitoriamente expresso nas células do sujeito.

48. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 44 a 47, **caracterizado** por que o nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata é o RNA.

49. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 31 a 48, **caracterizado** por que a célula efetora imune ou a população de células efetoras imunes e/ou a molécula de antígeno cognata ou o ácido nucleico que a codifica são administrados sistemicamente.

50. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 49, **caracterizado** por que, após a administração sistêmica do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata, ocorre a expressão do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata no baço.

51. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 49 ou 50, **caracterizado** por que, após a administração sistêmica do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata, ocorre a expressão do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata em células de apresentação de antígeno, de preferência células de apresentação de antígeno profissionais.

52. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 51, **caracterizado** por que as células de apresentação de antígeno são selecionadas do grupo que consiste em células dendríticas, macrófagos e células B.

53. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 49 a 52, **caracterizado** por que, após a administração sistêmica do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata, nenhuma ou essencialmente nenhuma expressão do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata ocorre no pulmão e/ou fígado.

54. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 49 a 53,

caracterizado por que, após a administração sistêmica do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata, a expressão do ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata no baço é pelo menos 5 vezes a quantidade de expressão no pulmão.

55. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 44 a 54, **caracterizado** por que o ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata é formulado em um veículo de distribuição.

56. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 55, **caracterizado** por que o veículo de distribuição compreende partículas.

57. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 55 ou 56, **caracterizado** por que o veículo de distribuição compreende pelo menos um lipídeo.

58. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 57, **caracterizado** por que pelo menos um lipídeo compreende pelo menos um lipídeo catiônico.

59. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 57 ou 58, **caracterizado** por que o lipídeo forma um complexo com e/ou encapsula o ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata.

60. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 57 a 59, **caracterizado** por que o lipídeo é compreendido em uma vesícula que encapsula o ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata.

61. **Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 44 a 60,

caracterizado por que o ácido nucleico que codifica a molécula de antígeno cognata é formulado em lipossomas.

62. **Célula Efetora Imune**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 23 a 27 e 29, **População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com a Reivindicação 28 ou 29, **ou Uso de Célula Efetora Imune ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 30 a 61, **caracterizado(a)** por que a célula efetora imune ou a população de células efetoras imunes é uma célula efetora imune que expressa CAR ou uma população de células efetoras imunes que expressa CAR.

63. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 16, **Ácido Nucleico**, de acordo com a Reivindicação 17 ou 18, **Vetor**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 19 a 22, **Célula Efetora Imune**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 23 a 27, 29 e 62, **ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 28, 29 e 62, **caracterizado(a)** por que é para uso como um medicamento.

64. **Molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 16, **Ácido Nucleico**, de acordo com a Reivindicação 17 ou 18, **Vetor**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 19 a 22, **Célula Efetora Imune**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 23 a 27, 29 e 62, **ou População de Células Efetoras Imunes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 28, 29 e 62, **caracterizado(a)** por que é no uso no tratamento de uma doença que expressa CLDN6.

65. **Kit**, **caracterizado** por que compreende a molécula CAR, conforme definida em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 16, ácido nucleico, conforme definido na Reivindicação 17 ou 18, vetor, conforme definido

em qualquer uma das Reivindicações de 19 a 22, célula efetora imune, conforme definida em qualquer uma das Reivindicações de 23 a 27, 29 e 62, ou população de células efetoras imunes, conforme definida em qualquer uma das Reivindicações 28, 29 e 62.

66. **Kit**, de acordo com a Reivindicação 65, **caracterizado** por que compreende ainda uma molécula de antígeno cognata que se liga ao domínio de ligação ao antígeno CLDN6 ou um ácido nucleico que o codifica.

67. **Kit**, de acordo com a Reivindicação 65 ou 66, **caracterizado** por que compreende ainda instruções para o uso do kit no método, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 30 a 62.

68. **Uso de Molécula CAR**, conforme definida em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 16, **de Ácido Nucleico**, conforme definido na Reivindicação 17 ou 18, **ou de Vetor**, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações 19 a 22, **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para estimular resposta imune a um CLDN6 que expressa população de células alvo ou tecido em um sujeito.

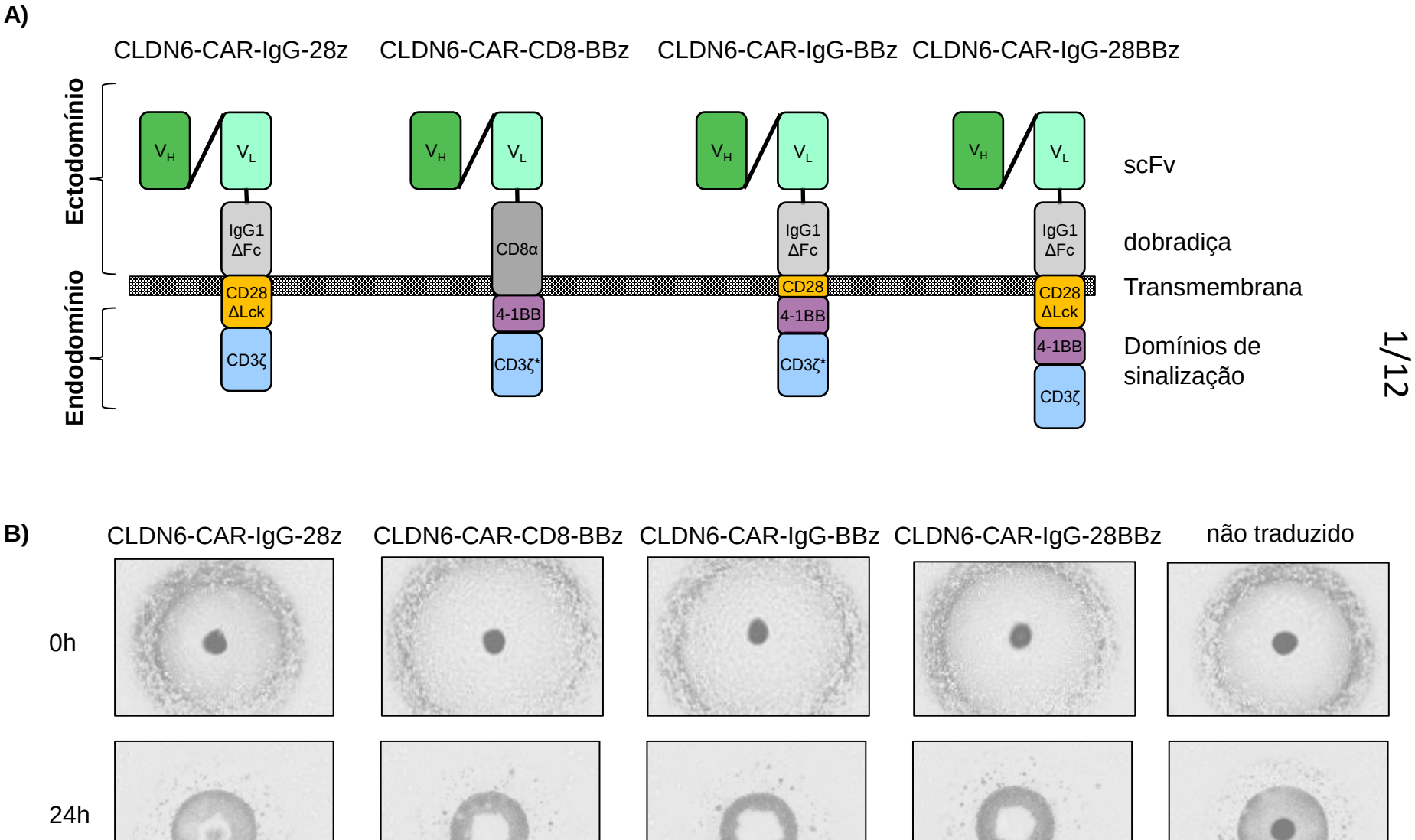
69. **Uso de Molécula CAR**, conforme definida em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 16, **de Ácido Nucleico**, conforme definido na Reivindicação 17 ou 18, **ou de Vetor**, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações 19 a 22, **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para tratamento de sujeito com doença associada à expressão de CLDN6.

70. **Método *ex vivo* Para Estimular Resposta Imune a CLDN6**, que expressa população de células alvo ou tecido, **caracterizado** por que o método compreende o contato da célula imune efetora, conforme definida em qualquer uma das Reivindicações de 23 a 27 e 29, ou uma população de células imunes efetoras, conforme definida na Reivindicação 28 ou 29,

com uma molécula de antígeno cognato que se liga ao domínio de ligação ao antígeno CLDN6.

71. **Método *ex vivo* Para Estimular Resposta Imune a CLDN6**, de acordo com a Reivindicação 70, **caracterizado** por que a molécula de antígeno cognato é selecionada a partir do grupo que consiste em CLDN6 ou um fragmento do mesmo, ou uma variante de CLDN6 ou um fragmento de CLDN6.

Figura 1


A)
CLDN6-CAR-IgG-28z
CLDN6-CAR-CD8-BBz
CLDN6-CAR-IgG-BBz
CLDN6-CAR-IgG-28BBz
Ectodomínio
Endodomínio
VH
VL
IgG1 ΔFc
CD8α
CD28 ΔLck
CD28
4-1BB
CD3ζ
CD3ζ*
scFv
dobradiça
Transmembrana
Domínios de sinalização
B)
CLDN6-CAR-IgG-28z
CLDN6-CAR-CD8-BBz
CLDN6-CAR-IgG-BBz
CLDN6-CAR-IgG-28BBz
não traduzido
0h
24h

1/12

Figura 2

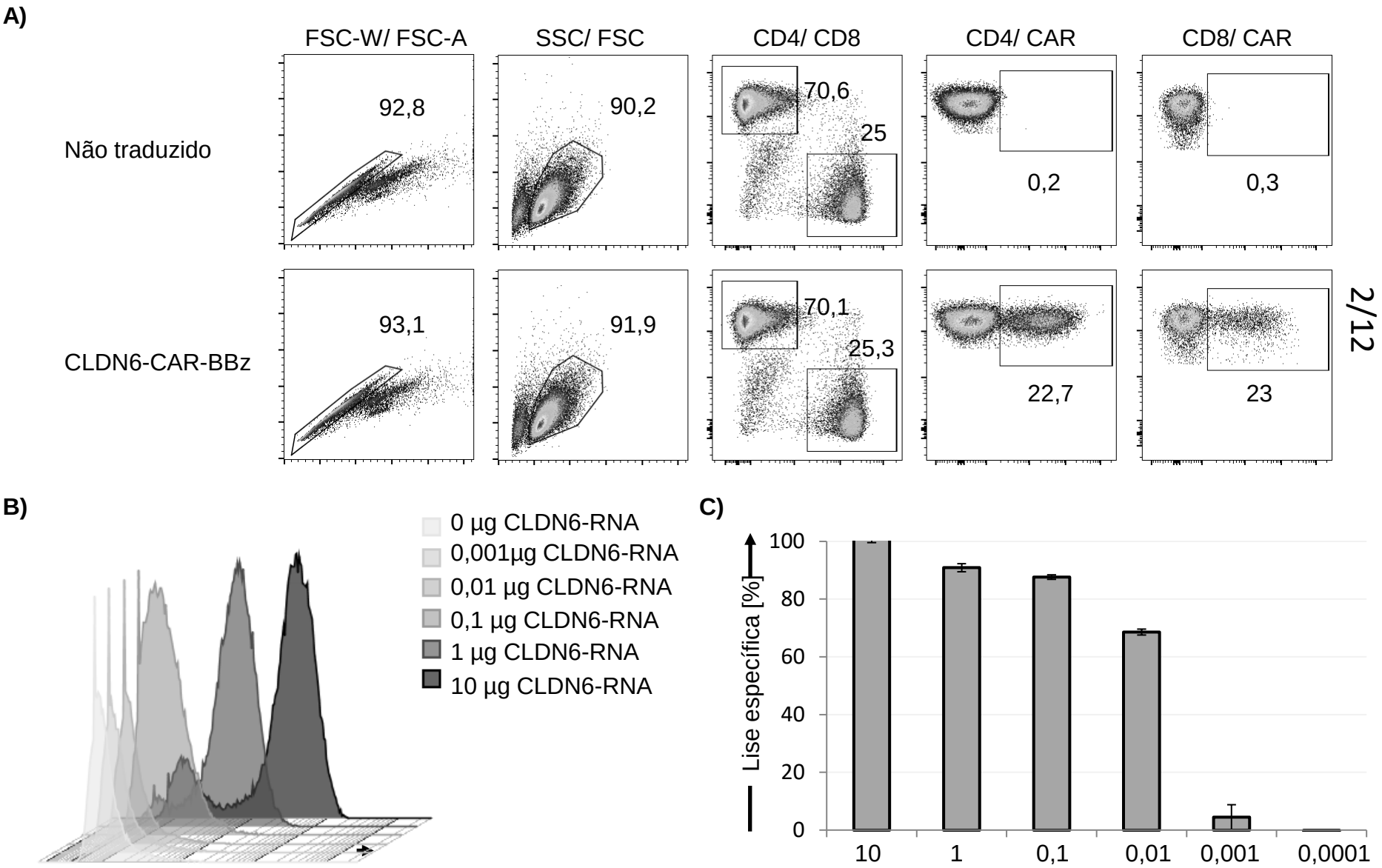
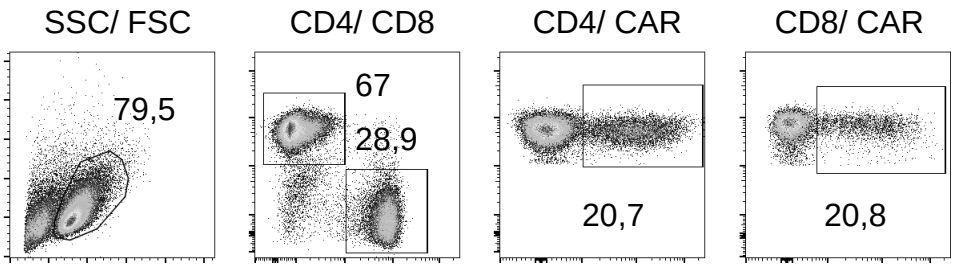

A)
FSC-W/ FSC-A
SSC/ FSC
CD4/ CD8
CD4/ CAR
CD8/ CAR
Não traduzido
92,8
90,2
70,6
25
0,2
0,3
CLDN6-CAR-BBz
93,1
91,9
70,1
25,3
22,7
23
B)
0 µg CLDN6-RNA
0,001µg CLDN6-RNA
0,01 µg CLDN6-RNA
0,1 µg CLDN6-RNA
1 µg CLDN6-RNA
10 µg CLDN6-RNA
CLDN6
C)
Lise específica [%]
100
80
60
40
20
0
10
1
0,1
0,01
0,001
0,0001
Quantidade de CLDN6-mRNA [µg]

Figura 3

A)

Expressão de superfície CLDN6-CAR-BBz



B)

Linhagens de células tumorais CLDN6+ e CLDN6-

	Nome	CLDN6 pos/neg	Origem
1	LCLC-103H	negativo	Pulmão
2	Mel-526	negativo	Pele
3	SK-MEL-37	negativo	Pele
4	SK-OV-3	negativo	Ovário
5	23132-87	negativo	Gástico
6	Colo-699-N	negativo	Pulmão
7	HEK-293	negativo	Rim embrionário
8	MDA-MB-231	negativo	Mama
9	PA-1-SC12	positivo	Ovário
10	NIH-OvCar-3	positivo	Ovário
11	JAR	positivo	Embrião
12	NEC-8	positivo	Embrião

Figura 3

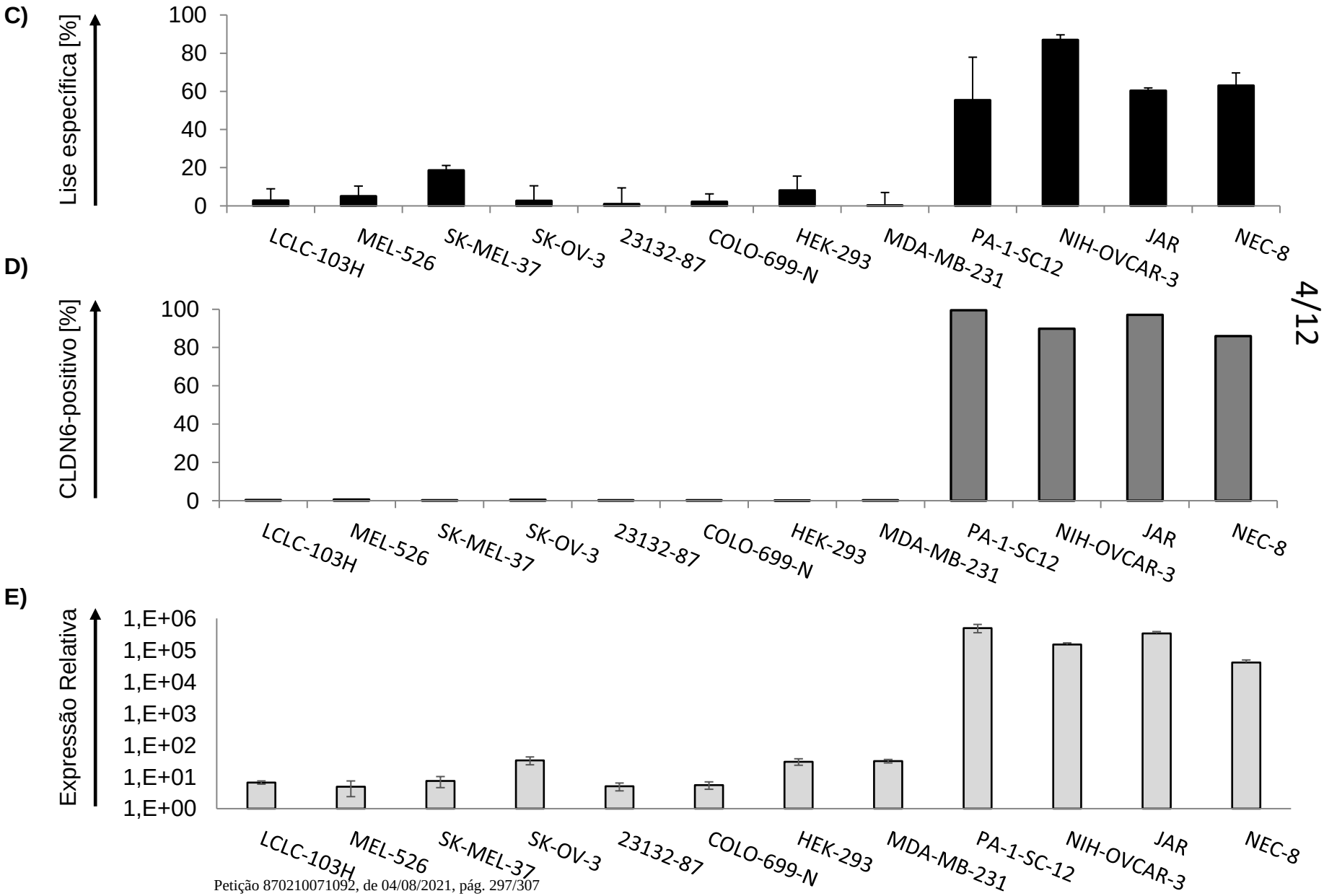

C)
Lise específica [%]
100
80
60
40
20
0
LCLC-103H
MEL-526
SK-MEL-37
SK-OV-3
23132-87
COLO-699-N
HEK-293
MDA-MB-231
PA-1-SC12
NIH-OVCAR-3
JAR
NEC-8
D)
CLDN6-positivo [%]
100
80
60
40
20
0
LCLC-103H
MEL-526
SK-MEL-37
SK-OV-3
23132-87
COLO-699-N
HEK-293
MDA-MB-231
PA-1-SC12
NIH-OVCAR-3
JAR
NEC-8
E)
Expressão Relativa
1,E+06
1,E+05
1,E+04
1,E+03
1,E+02
1,E+01
1,E+00
LCLC-103H
MEL-526
SK-MEL-37
SK-OV-3
23132-87
COLO-699-N
HEK-293
MDA-MB-231
PA-1-SC-12
NIH-OVCAR-3
JAR
NEC-8

Figura 4

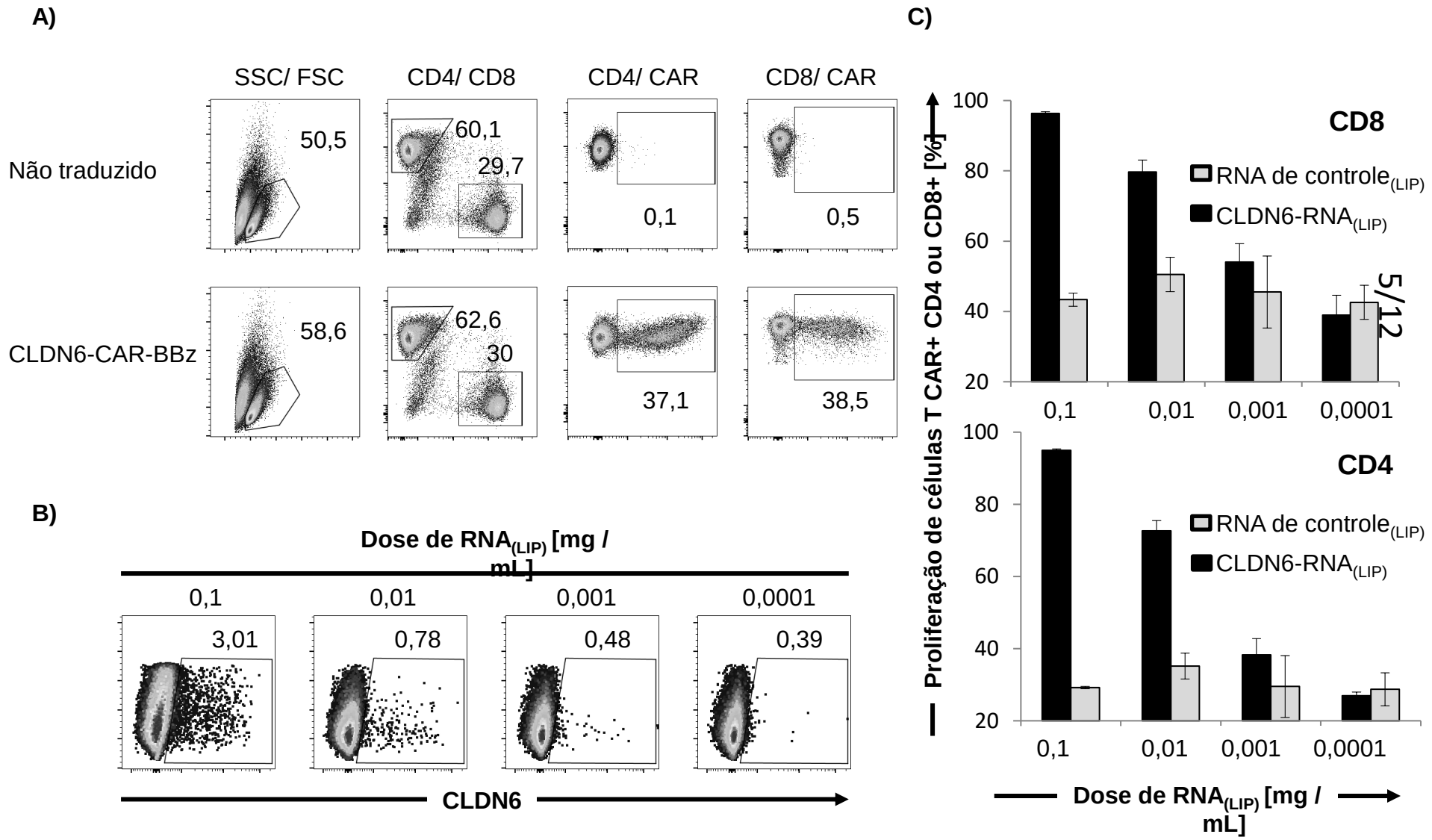

A)
SSC/ FSC
CD4/ CD8
CD4/ CAR
CD8/ CAR
Não traduzido
CLDN6-CAR-BBz
50,5
60,1
29,7
0,1
0,5
58,6
62,6
30
37,1
38,5
B)
Dose de RNA(LIP) [mg / mL]
0,1
0,01
0,001
0,0001
3,01
0,78
0,48
0,39
CLDN6
C)
CD8
CD4
RNA de controle(LIP)
CLDN6-RNA(LIP)
Proliferação de células T CAR+ CD4 ou CD8+ [%]
100
80
60
40
20
0,1
0,01
0,001
0,0001
Dose de RNA(LIP) [mg / mL]
5/12

Figura 5

A)



Camundongos NSG (10/grupo)

Enxerto de tumor

s.c. 5x 10^6 OV90-SC12

Volume do tumor (média): **170 mm³**

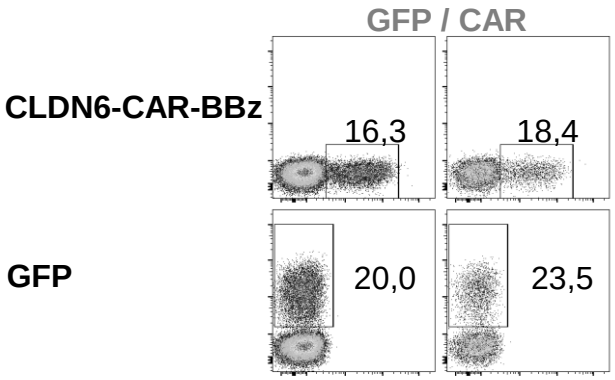
Transferência adotiva de células T

i.v. 1x 10^7 células T humanas

Monitoramento:
- Tamanho do tumor
- Frequência CAR-T no sangue

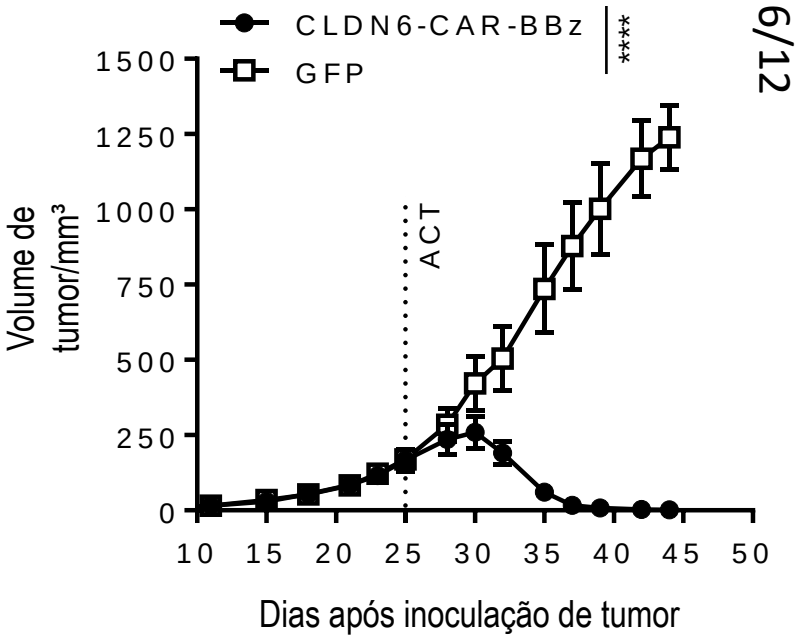
B)

Expressão de superfície CAR (ACT)



C)

Crescimento do tumor (média ± SEM)



6/12

D)

Persistência CAR-T (3 semanas pós ACT)

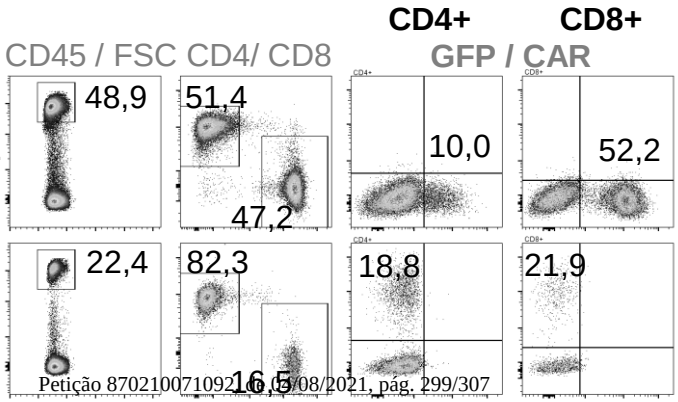
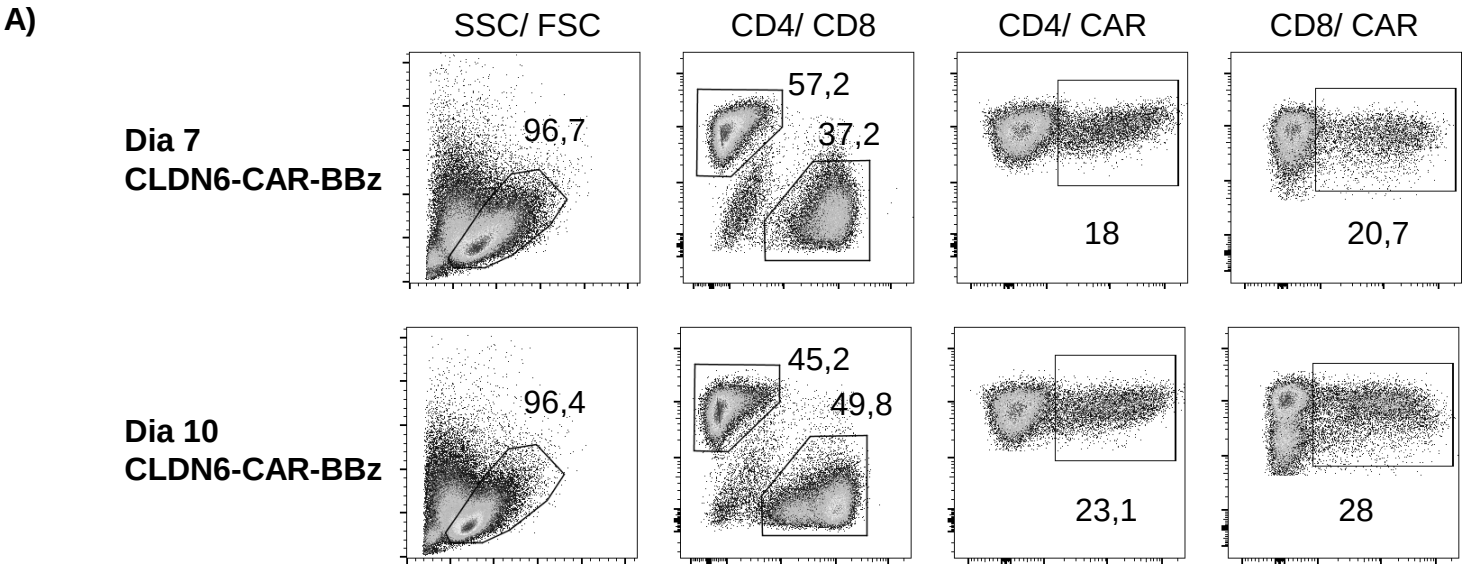


Figura 6


A)
SSC/ FSC
CD4/ CD8
CD4/ CAR
CD8/ CAR
Dia 7
CLDN6-CAR-BBz
96,7
57,2
37,2
18
20,7
Dia 10
CLDN6-CAR-BBz
96,4
45,2
49,8
23,1
28

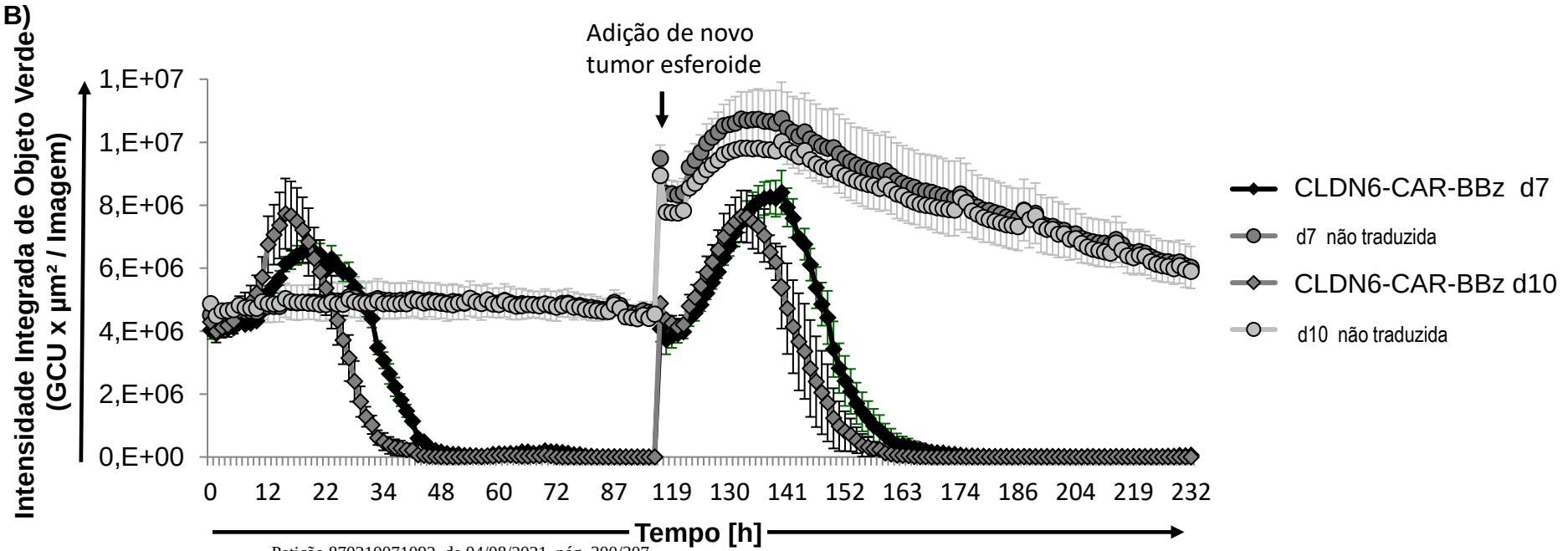

B)
Adição de novo
tumor esferoide
Intensidade Integrada de Objeto Verde
(GCU x µm² / Imagem)
1,E+07
1,E+07
8,E+06
6,E+06
4,E+06
2,E+06
0,E+00
0
12
22
34
48
60
72
87
119
130
141
152
163
174
186
204
219
232
Tempo [h]
CLDN6-CAR-BBz d7
d7 não traduzida
CLDN6-CAR-BBz d10
d10 não traduzida

Figura 7

A)



Camundongos NSG
(12 / grupo)

Enxerto de tumor

s.c. 5x 10^6 OV90-SC12

Volume do tumor (média): **160 mm^3**

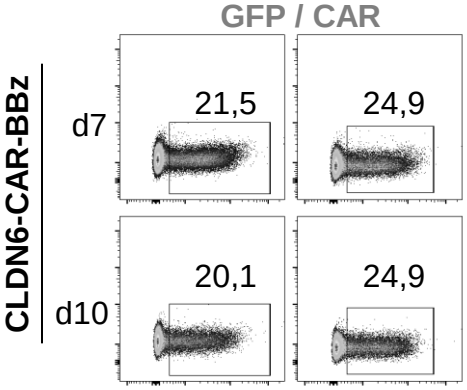
Transferência adotiva de células T

i.v. 1x 10^7 células T humanas descongeladas

Monitoramento:
- Tamanho do tumor
- Frequência CAR-T no sangue

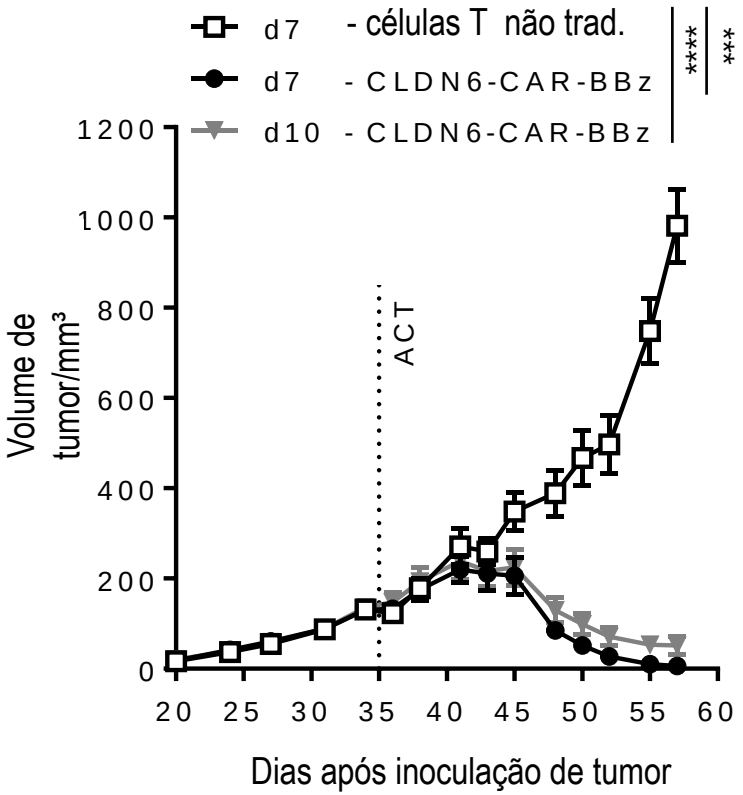
B)

Expressão de superfície CAR (ACT)



C)

Crescimento do tumor (média ± SEM)



D)

Persistência CAR-T (2 semanas pós ACT)

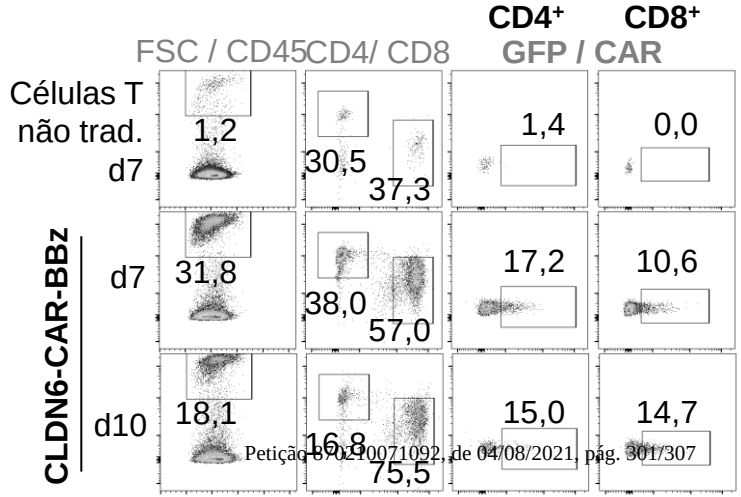


Figura 8

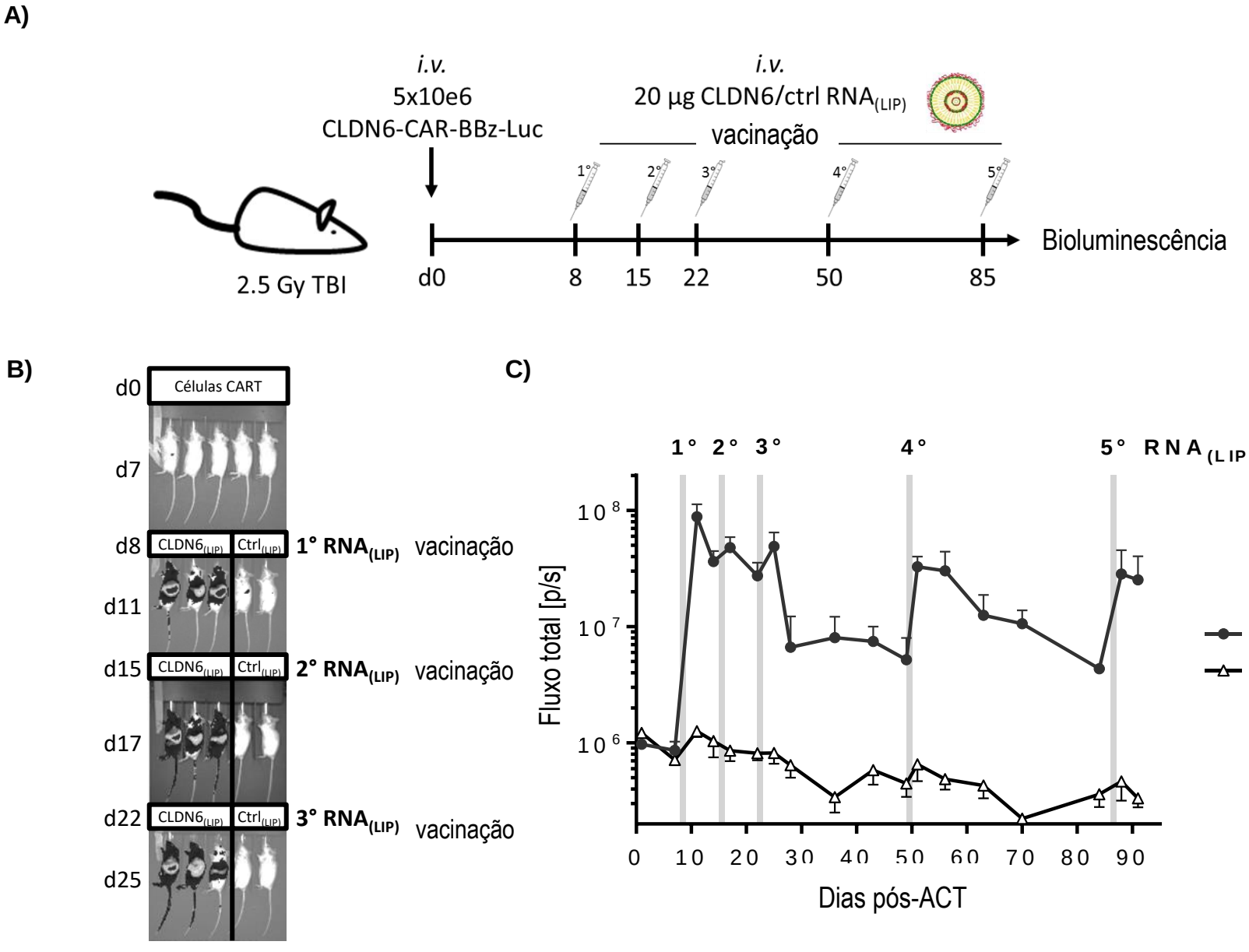
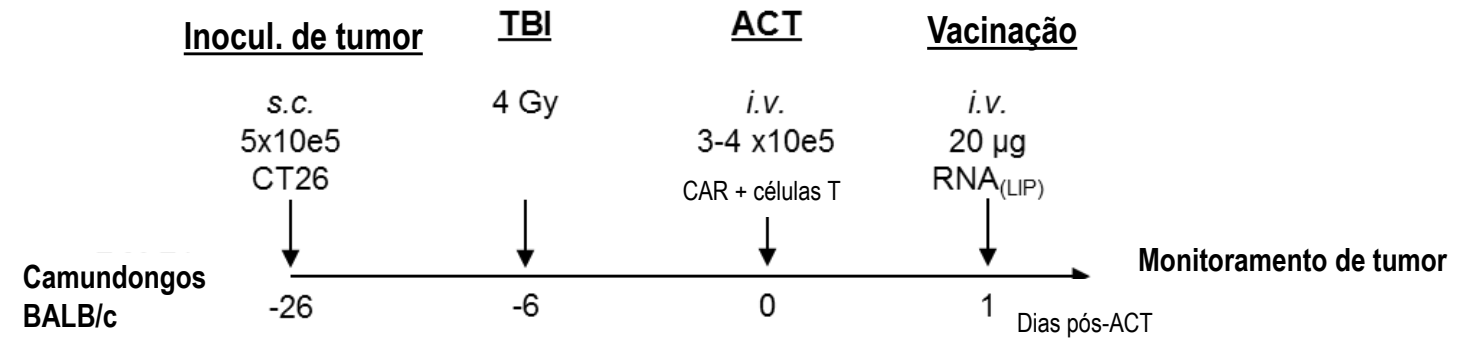

A)
i.v.
5x10e6
CLDN6-CAR-BBz-Luc
i.v.
20 µg CLDN6/ctrl RNA(LIP)
vacinação
1°
2°
3°
4°
5°
2.5 Gy TBI
d0
8
15
22
50
85
Bioluminescência
B)
d0
Células CART
d7
d8
CLDN6(LIP)
Ctrl(LIP)
1° RNA(LIP) vacinação
d11
d15
2° RNA(LIP) vacinação
d17
d22
3° RNA(LIP) vacinação
d25
C)
1° 2° 3°
4°
5° RNA(LIP) vacinação
Fluxo total [p/s]
10 8
10 7
10 6
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90
Dias pós-ACT
CLDN6 RNA(LIP)
ctrl RNA(LIP)

Figura 9

A)


Inocul. de tumor
TBI
ACT
Vacinação
s.c.
5x10e5
CT26
4 Gy
i.v.
3-4 x10e5
CAR + células T
i.v.
20 µg
RNA(LIP)
Camundongos
BALB/c
-26
-6
0
1
Dias pós-ACT
Monitoramento de tumor

B)

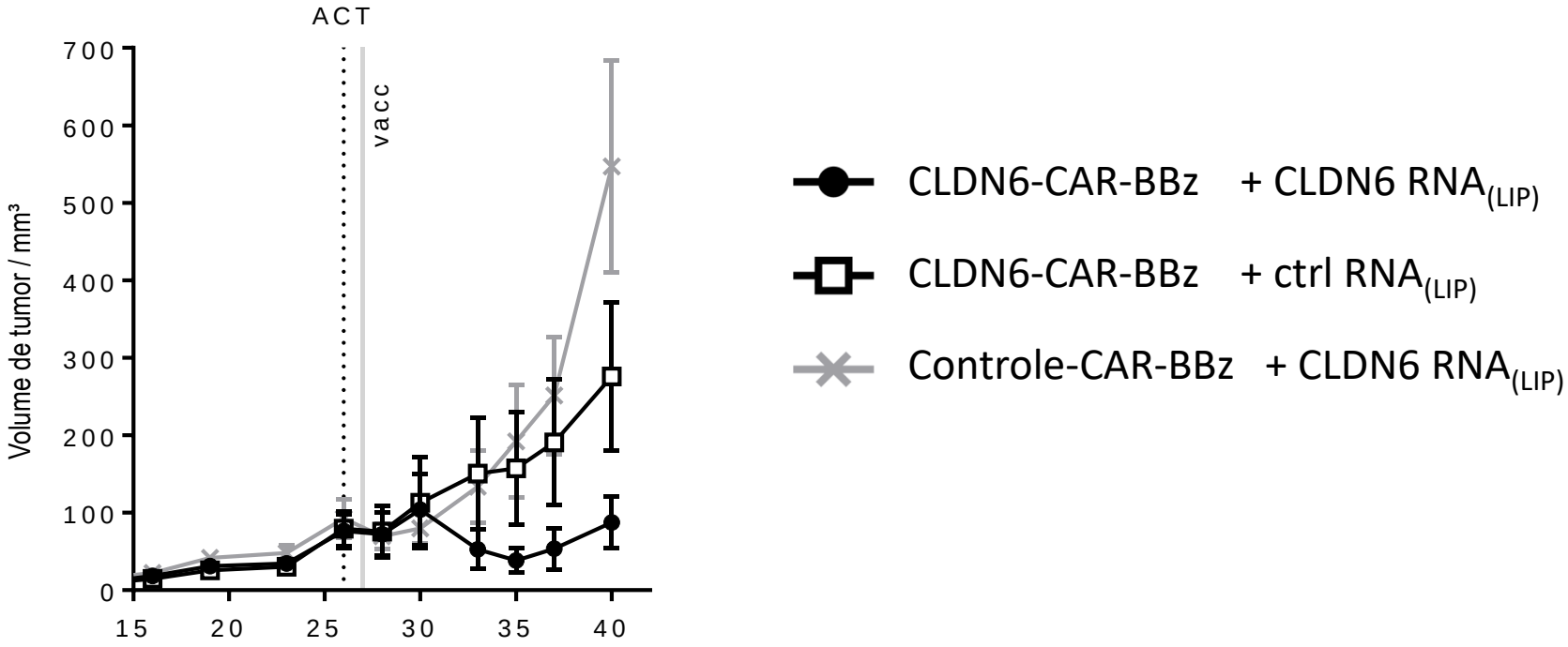
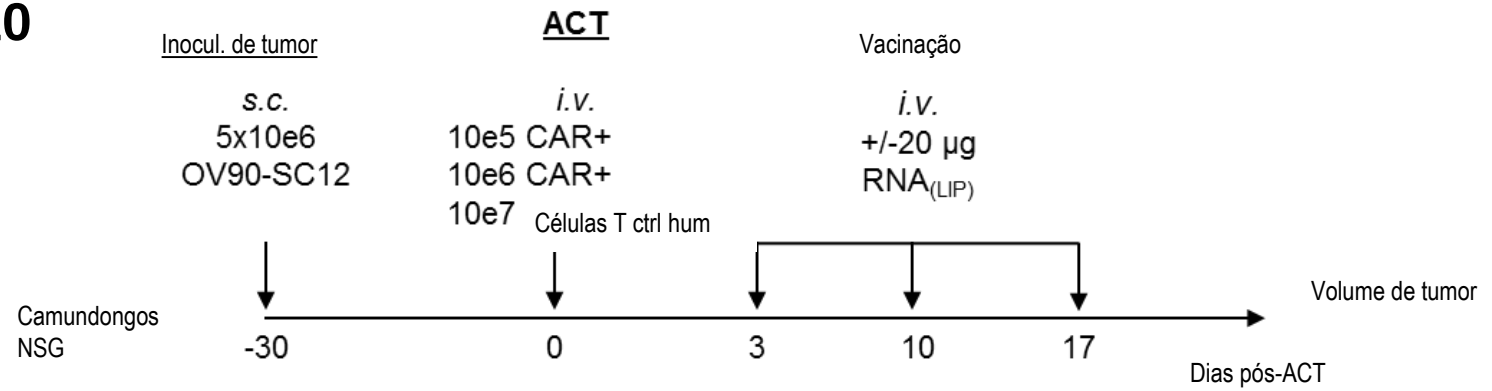
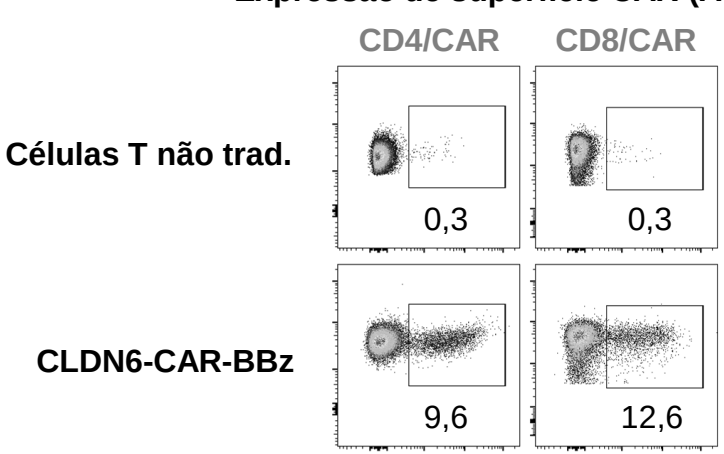

ACT
vacc
Volume de tumor / mm³
0
100
200
300
400
500
600
700
15
20
25
30
35
40
Dias após inoculação de tumor
CLDN6-CAR-BBz + CLDN6 RNA(LIP)
CLDN6-CAR-BBz + ctrl RNA(LIP)
Controle-CAR-BBz + CLDN6 RNA(LIP)

Figura 10

A)



B)



C)

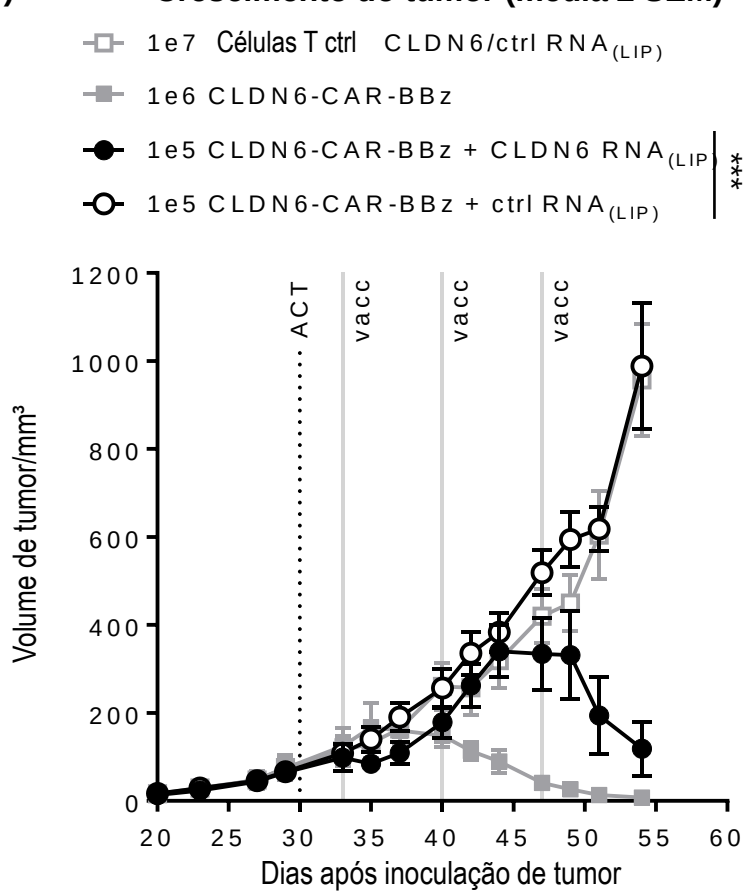
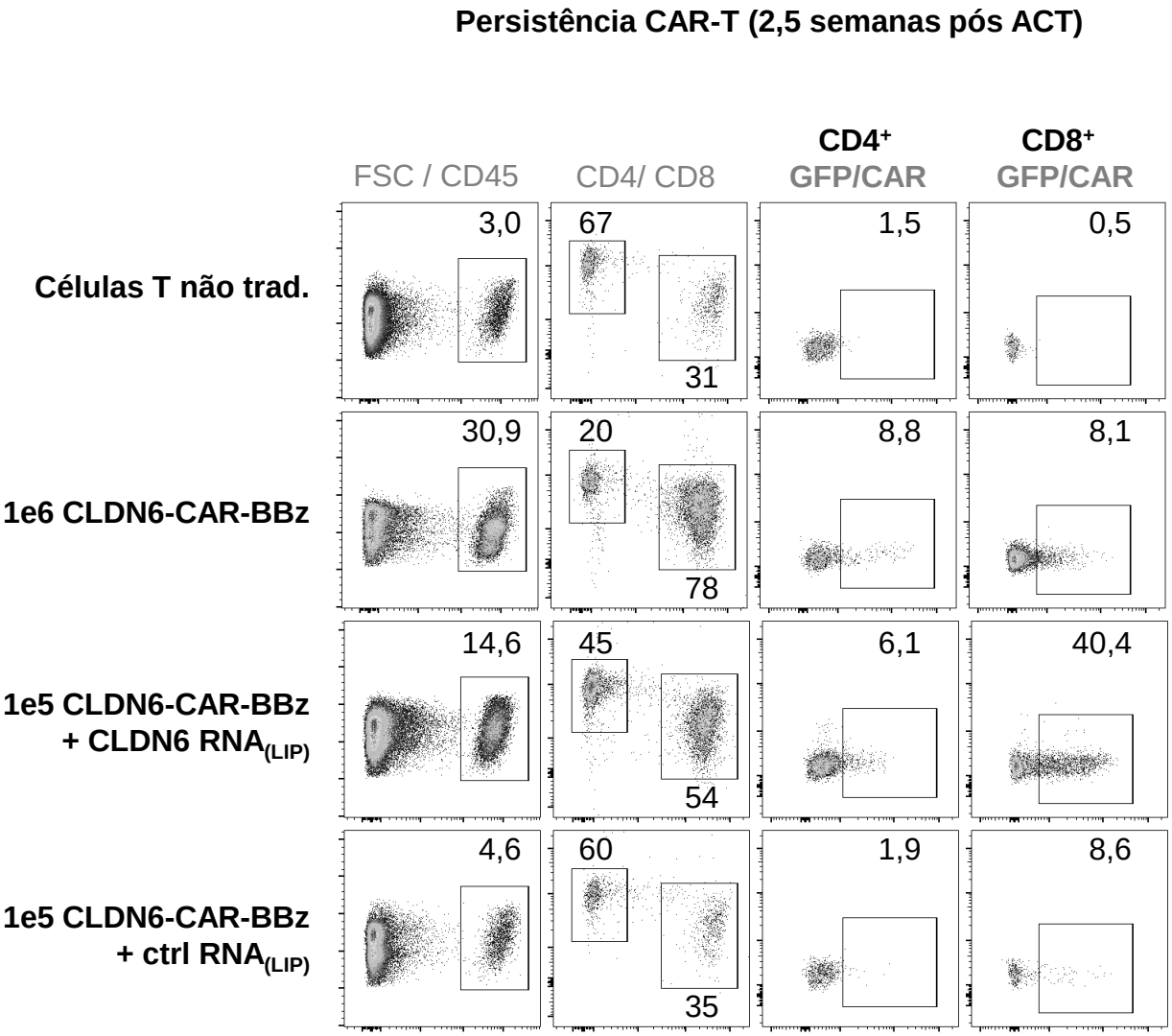


Figura 10

D)


Persistência CAR-T (2,5 semanas pós ACT)
FSC / CD45
CD4/ CD8
CD4+ GFP/CAR
CD8+ GFP/CAR
Células T não trad.
3,0
67
31
1,5
0,5
1e6 CLDN6-CAR-BBz
30,9
20
78
8,8
8,1
1e5 CLDN6-CAR-BBz + CLDN6 RNA(LIP)
14,6
45
54
6,1
40,4
1e5 CLDN6-CAR-BBz + ctrl RNA(LIP)
4,6
60
35
1,9
8,6

“CÉLULAS MODIFICADAS POR RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCERES QUE EXPRESSAM CLDN6”

RESUMO

A presente divulgação refere-se a um receptor de antígeno quimérico (CAR) que mostra reconhecimento altamente específico e sensível de células alvo que expressam CLDN6, bem como um alto potencial para sobrevivência e estimulação repetitiva de células T CAR.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: PCTEP2052867-210721-LSeqTrLinLoEdP.txt
- Data de Geração do Código: 04/08/2021
- Hora de Geração do Código: 19:07:09
- Código de Controle:
  - Campo 1: 7A967F821FE70D1A
  - Campo 2: C804E683EFD5C957