

(11) Número de Publicação: **PT 2649086 T**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/00 (2017.01) **A61K 35/17** (2017.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2011.12.09**

(30) Prioridade(s): **2010.12.09 US 421470 P**
2011.06.29 US
201161502649 P

(43) Data de publicação do pedido: **2013.10.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2017.07.19**
204/2017

(73) Titular(es):

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA
CENTER FOR TECHNOLOGY TRANSFER, 3160
CHESTNUT STREET, SUITE 200 PHILADELPHIA
PA 19104-6283**

US

(72) Inventor(es):
MICHAEL C. MILONE US
CARL H. JUNE US
BRUCE L. LEVINE US
DAVID L. PORTER US
MICHAEL D. KALOS US

(74) Mandatário:

MARIA TERESA DELGADO
AVENIDA DA LIBERDADE, N° 69, 3º D 1250-140 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS T MODIFICADAS POR RECETOR DE ANTIGÉNIO QUIMÉRICO PARA TRATAR O CANCRO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR O CANCRO NUM SER HUMANO. A INVENÇÃO REFERE-SE À ADMINISTRAÇÃO DE UMA CÉLULA T GENETICAMENTE MODIFICADA PARA EXPRESSAR UM CAR, EM QUE O CAR COMPREENDE UM DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DE ANTIGÉNIO, UM DOMÍNIO TRANSMEMBRANAR, UMA REGIÃO DE SINALIZAÇÃO CO-ESTIMULADORA E UM DOMÍNIO DE SINALIZAÇÃO ZETA CD3.

RESUMO**"UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS T MODIFICADAS POR RECEPTOR DE ANTIGÉNIO QUIMÉRICO PARA TRATAR O CANCRO"**

A presente invenção proporciona composições e métodos para tratar o cancro num ser humano. A invenção refere-se à administração de uma célula T geneticamente modificada para expressar um CAR, em que o CAR compreende um domínio de ligação de antígeno, um domínio transmembranar, uma região de sinalização co-estimuladora e um domínio de sinalização zeta CD3.

DESCRIÇÃO

"UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS T MODIFICADAS POR RECETOR DE ANTIGÉNIO QUIMÉRICO PARA TRATAR O CANCRO"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A grande maioria dos doentes que têm malignidades da célula B, incluindo a leucemia linfocítica crónica (LLC), morrerá da sua doença. Uma abordagem para tratar estes doentes é modificar geneticamente células T para direcionar a抗igénios expressos em células tumorais através da expressão de recetores de抗igénio quiméricos (CARs). Os CARs são recetores de抗igénio que são concebidos para reconhecer抗igénios de superfície celular de um modo independente do抗igénio de leucócito humano. As tentativas de uso de células geneticamente modificadas que expressam CARs para tratar estes tipos de doentes tiveram um sucesso muito limitado. Ver, por exemplo, Brentjens et al., 2010, Molecular Therapy, 18:4, 666-668; Morgan et al., 2010, Molecular Therapy, publicado online a 23 de Fevereiro de 2010, páginas 1-9; e, Till et al., 2008, Blood, 112:2261-2271.

Na maioria dos cancros, os抗igénios específicos de tumor ainda não estão bem definidos, mas em malignidades da célula B, o CD19 é um alvo tumoral atrativo. A expressão de CD19 está restringida às células B normais e malignas (Uckun, et al. Blood, 1988, 71:13 - 29), pelo que o CD19 é um alvo amplamente aceite para testar CARs com segurança. Embora os CARs possam despoletar a ativação da célula T de um modo semelhante a um recetor de célula T endógeno, um

importante impedimento à aplicação clínica desta tecnologia até agora tem sido a limitada expansão *in vivo* de células T CAR+, a eliminação rápida das células após-infusão e a atividade clínica decepcionante (Jena, et al., Blood, 2010, 116:1035-1044; Uckun, et al. Blood, 1988, 71:13 - 29).

A Publicação do Pedido de Patente U.S. N° 20040043401 descreve receptores de célula T quiméricos que combinam numa única espécie quimérica, o domínio intracelular da cadeia zeta CD3, uma região de sinalização de uma proteína co-estimuladora, tal como CD28, e um elemento de ligação. Milone et al., 2009, Molecular Therapy, 17:8, 1453-1464 descreve células T com receptores de抗énio quiméricos contendo domínios de transdução de sinal CD137.

Assim, existe uma necessidade urgente na técnica para composições e métodos para o tratamento do cancro usando CARs que se podem expandir *in vivo*. A presente invenção aborda esta necessidade.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente divulgação proporciona uma sequência de ácidos nucleicos isolada que codifica um receptor de抗énio quimérico (CAR), em que o CAR compreende um domínio de ligação de抗énio, um domínio transmembranar, uma região de sinalização co-estimuladora e um domínio de sinalização zeta CD3, em que o domínio de sinalização zeta CD3 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24 como definida nas reivindicações.

Num primeiro aspeto da invenção é proporcionada uma célula T geneticamente modificada para expressar um CAR, em que o

CAR comprehende (a) um domínio de ligação de antigénio que é um scFv anti-CD 19 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 20, (b) uma região de sinalização 4-1BB co-estimuladora, e (c) um domínio de sinalização zeta CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24, para utilização num método para tratamento do cancro num ser humano, em que é obtida remissão, e em que o ser humano é resistente a pelo menos um agente quimioterapêutico.

O cancro pode compreender um tumor não-sólido, tal como um tumor hematológico. O cancro pode ser leucemia ou linfoma.

A leucemia pode ser:

- (i) uma leucemia aguda ou leucemia crónica; ou
- (ii) leucemia linfocítica aguda.

Alternativamente, o cancro pode ser:

- (i) leucemia linfocítica aguda pré-B (indicação pediátrica), leucemia linfocítica aguda do adulto, linfoma de células do manto ou linfoma difuso de grandes células B;
- (ii) linfoma não-Hodgkin;
- (iii) mieloma múltiplo; ou
- (iv) doença de Hodgkin.

Numa forma de realização deste aspeto da invenção é proporcionada uma célula T geneticamente manipulada para expressar um CAR, em que o CAR comprehende (a) um domínio de ligação de antigénio que é um scFv anti-CD19 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 20, (b) uma região de sinalização 4-1BB co-estimuladora, e (c) um domínio de sinalização zeta CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24, para utilização num método de

tratamento de um ser humano com leucemia linfocítica crónica.

Num segundo aspeto da invenção é proporcionada uma célula T geneticamente manipulada para expressar um CAR, em que o CAR compreende (a) um domínio de ligação de抗igénio que é um scFv anti-CD19 comprendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 20, (b) uma região de sinalização 4-1BB co-estimuladora, e (c) um domínio de sinalização zeta CD3 comprendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24, para utilização num método para tratamento do cancro que compreende a administração da referida célula T a um ser humano diagnosticado com cancro, em que o referido método gera uma população de células T geneticamente manipuladas que persiste no ser humano durante pelo menos oito meses, nove meses, dez meses, onze meses, doze meses, dois anos, ou três anos após a administração, e em que o ser humano é resistente a pelo menos um agente quimioterapêutico.

A população persistente de células T geneticamente manipuladas pode compreender pelo menos uma célula selecionada do grupo que consiste numa célula T que foi administrada ao ser humano, uma progenia de uma célula T que foi administrada ao ser humano, e uma sua combinação. A população persistente de células T geneticamente manipuladas, pode compreender uma célula T de memória.

Num terceiro aspeto da invenção é proporcionada uma célula T geneticamente manipulada para expressar um CAR, em que o CAR compreende (a) um domínio de ligação de抗igénio que é um scFv anti-CD19 comprendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 20, (b) uma região de sinalização 4-1BB co-estimuladora, e (c) um domínio de sinalização zeta CD3

compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24, para utilização num método para tratamento do cancro que compreende a administração da referida célula T a um ser humano diagnosticado com cancro, em que o referido método expande uma população de células T geneticamente manipuladas no ser humano, em que a célula T geneticamente manipulada administrada produz uma população de células T de progenia no ser humano, e em que o ser humano é resistente a pelo menos um agente quimioterapêutico.

As células T de progenia no ser humano podem compreender uma célula T de memória. A população de células T de progenia pode persistir no ser humano durante pelo menos três meses, quatro meses, cinco meses, seis meses, sete meses, oito meses, nove meses, dez meses, onze meses, doze meses, dois anos, ou três anos após a administração.

Nos aspetos da invenção que se referem a uma célula T para utilização como definida acima, o cancro pode ser como definido no primeiro aspetto ou o cancro pode ser leucemia linfocítica crónica.

Nos aspetos da invenção que se referem a uma célula T para utilização como definida acima, o ser humano pode ter leucemia linfocítica crónica que é leucemia CD19+ refratária e linfoma.

Em qualquer aspetto da invenção, a célula ou célula T pode ser uma célula autóloga ou alogénica. A célula pode ser administrada após terapia ablativa da célula B, tal como com agentes que reagem com CD20, por exemplo Rituxan. O ser humano é resistente a pelo menos um agente quimioterapêutico.

Nos aspetos da invenção que se referem a uma célula T para utilização como definida acima, a célula pode ser administrada numa composição farmacêutica numa dosagem de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal ou 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal.

De acordo com uma forma de realização da invenção, a célula T para utilização pode ser como definida acima, em que:

- (i) a região de sinalização 4-1BB co-estimuladora pode compreender a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 23;
- (ii) o CAR pode compreender a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID N°: 12;
- (iii) o scFv anti-CD19 pode ser codificado pela SEQ ID N°: 14;
- (iv) a região de sinalização 4-1BB pode ser codificada pela SEQ ID N°: 17 e o domínio de sinalização zeta CD3 pode ser codificado pela SEQ ID N°: 18;
- (v) o scFv anti-CD19 pode ser codificado pela SEQ ID N°: 14, a região de sinalização 4-1BB pode ser codificada pela SEQ ID N°: 17 e o domínio de sinalização zeta CD3 pode ser codificado pela SEQ ID N°: 18; ou
- (vi) o CAR pode ser codificado pela sequência de ácidos nucleicos apresentada em SEQ ID N°: 8.

É também aqui divulgada uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um CAR compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 12.

É também aqui divulgada uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um CAR compreendendo a sequência de ácidos nucleicos de SEQ ID N°: 8.

É também aqui divulgado o domínio de sinalização zeta CD3 no CAR que é codificado pela sequência de ácidos nucleicos de SEQ ID N°: 18.

É também aqui divulgado um CAR isolado compreendendo um domínio de ligação de抗原, um domínio transmembranar, uma região de sinalização co-estimuladora e um domínio de sinalização zeta CD3, em que o domínio de sinalização zeta CD3 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24.

É também aqui divulgada uma célula compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um CAR, em que o CAR compreende um domínio de ligação de抗原, um domínio transmembranar, uma região de sinalização co-estimuladora e um domínio de sinalização zeta CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24.

Como aqui divulgado, a célula compreendendo o CAR apresenta uma imunidade antitumoral quando o domínio de ligação de抗原 do CAR se liga ao seu correspondente抗原.

É também aqui divulgado um vetor compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um CAR, em que o CAR compreende um domínio de ligação de抗原, uma região de sinalização co-estimuladora e um domínio de sinalização zeta CD3, em que o domínio de sinalização zeta CD3 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24.

É também divulgado um método para estimular uma resposta imune mediada por células T a uma população de células alvo ou a um tecido num mamífero. É também divulgado um método que compreende administrar a um mamífero uma quantidade eficaz de uma célula geneticamente modificada para expressar um CAR, em que o CAR compreende um domínio de ligação de抗igenio, uma região de sinalização co-estimuladora e um domínio de sinalização zeta CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24, em que o domínio de ligação de抗igenio é selecionado para reconhecer especificamente a população de células alvo ou o tecido.

É também divulgado um método de proporcionar uma imunidade antitumoral num mamífero. É também divulgado um método que compreende administrar a um mamífero uma quantidade eficaz de uma célula geneticamente modificada para expressar um CAR, em que o CAR compreende um domínio de ligação de抗igenio, uma região de sinalização co-estimuladora e um domínio de sinalização zeta CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24, proporcionando assim uma imunidade antitumoral no mamífero.

É também divulgado um método de tratamento de um mamífero que tem uma doença, um distúrbio ou um estado associado com uma expressão elevada de um抗igenio tumoral. É também divulgado um método que compreende administrar a um mamífero uma quantidade eficaz de uma célula geneticamente modificada para expressar um CAR, em que o CAR compreende um domínio de ligação de抗igenio, uma região de sinalização co-estimuladora e um domínio de sinalização zeta CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24, tratando assim o mamífero.

Também aqui divulgado, a célula é uma célula T autóloga.

Como aqui descrito, os抗igénios tumorais incluem CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, e qualquer sua combinação.

É também aqui divulgado um método de tratamento de um ser humano com leucemia linfocítica crónica. Numa forma de realização, o método compreende administrar a um humano uma célula T geneticamente manipulada para expressar um CAR, em que o CAR compreende um domínio de ligação de抗igénio, uma região de sinalização co-estimuladora e um domínio de sinalização zeta CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24.

Como aqui descrito, o ser humano é resistente a pelo menos um agente quimioterapêutico

Como aqui descrito, a leucemia linfocítica crónica é leucemia CD19+ refratária e linfoma.

É também aqui divulgado um método para gerar uma população persistente de células T geneticamente manipuladas num ser humano diagnosticado com cancro. É também descrito aqui um método que compreende administrar a um humano uma célula T geneticamente manipulada para expressar um CAR, em que o CAR compreende um domínio de ligação de抗igénio, uma região de sinalização co-estimuladora e um domínio de sinalização zeta CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24, em que a população persistente de células T geneticamente manipuladas persists

no ser humano durante pelo menos um mês após a administração.

Como aqui descrito, a população persistente de células T geneticamente manipuladas compreende pelo menos uma célula selecionada do grupo que consiste numa célula T que foi administrada ao ser humano, uma progenia de uma célula T que foi administrada ao ser humano, e uma sua combinação.

Como aqui descrito, a população persistente de células T geneticamente manipuladas compreende uma célula T de memória.

Como aqui descrito, a população persistente de células T geneticamente manipuladas persiste no ser humano durante pelo menos três meses após a administração. Como descrito aqui, a população persistente de células T geneticamente manipuladas persiste no ser humano durante pelo menos quatro meses, cinco meses, seis meses, sete meses, oito meses, nove meses, dez meses, onze meses, doze meses, dois anos, ou três anos após a administração.

Como aqui descrito, a leucemia linfocítica crónica é tratada.

É também aqui divulgado um método de expansão de uma população de células T geneticamente manipuladas num ser humano diagnosticado com cancro. É também aqui descrito um método que compreende administrar a um humano uma célula T geneticamente manipulada para expressar um CAR, em que o CAR compreende um domínio de ligação de抗原, uma região de sinalização co-estimuladora e um domínio de sinalização zeta CD3 compreendendo a sequência de

aminoácidos de SEQ ID N°: 24, em que a célula T geneticamente manipulada administrada produz uma população de células T de progenia no ser humano.

Como aqui descrito, as células T de progenia no ser humano compreendem uma célula T de memória.

Como aqui descrito, a célula T é uma célula T autóloga.

Como aqui descrito, o ser humano é resistente a pelo menos um agente quimioterapêutico.

Como aqui descrito, o cancro é leucemia linfocítica crónica. Numa outra forma de realização, a leucemia linfocítica crónica é leucemia CD19+ refratária e linfoma.

Como aqui descrito, a população de células T de progenia persiste no ser humano durante pelo menos três meses após a administração. Como descrito aqui, a população de células T de progenia persiste no ser humano durante pelo menos quatro meses, cinco meses, seis meses, sete meses, oito meses, nove meses, dez meses, onze meses, doze meses, dois anos, ou três anos após a administração.

Como aqui descrito, o cancro é tratado.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A seguinte descrição detalhada de formas de realização preferidas da invenção será melhor entendida quando lida conjuntamente com os desenhos anexos. Com o objetivo de ilustrar a invenção, são mostrados nos desenhos formas de realização que são presentemente preferidas. Deve ser

entendido, contudo, que a invenção não está limitada aos arranjos e instrumentos precisos das formas de realização mostradas nos desenhos.

Figura 1, compreendendo as figuras 1A a 1C, é uma série de imagens das representações esquemáticas do vetor de transferência génica e transgene, fabrico de célula T de gene modificado e conceção do protocolo clínico. A Figura 1A descreve vetores lentivirais e transgene que mostram os principais elementos funcionais. Foi produzido um vetor lentiviral de grau clínico pseudotipado de proteína G do vírus da estomatite vesicular (designado pELPs 19BBz) que dirige a expressão de scFv anti-CD19 derivado do anticorpo monoclonal FMC63 de murino, domínio transmembranar e de charneira CD8 α humano, e domínios de sinalização 4-1BB e CD3zeta humanos. A expressão constitutiva do transgene foi dirigida por inclusão de um EF-1 α (promotor do fator de elongação-1 α); LTR, repetição terminal longa; RRE, elemento de resposta rev. (cPPT) e a sequência de terminação central (CTS). A Figura não está à escala. A Figura 1B descreve o fabrico de células T. As células autólogas foram obtidas através de uma aférese, e as células T foram enriquecidas por elutrição de células mononucleadas, lavadas e as células de leucemia residuais esgotadas por adição de esferas paramagnéticas revestidas com anti-CD3/CD28 para seleção positiva e ativação de células T. O vetor lentiviral foi adicionado na altura da ativação celular e removido por lavagem no dia 3 após iniciação da cultura. As células foram expandidas num dispositivo de plataforma oscilante (WAVE Bioreactor System) durante 8-12 dias. No último dia da cultura, as esferas foram removidas por passagem através de um campo magnético e as células T CART19 recolhidas e criopreservadas em meio infusível. A

Figura 1C descreve a conceção do protocolo clínico. Aos doentes foi administrada quimioterapia de linfodepleção como descrito, seguida por infusão CART19 N°1 por gotejamento gravítico i.v. durante 15-20 minutos. A infusão foi dada usando uma abordagem de dose dividida durante 3 dias (10%, 30%, 60%) começando 1 a 5 dias após conclusão da quimioterapia. Os ensaios de valor-limite foram conduzidos na semana de ensaio 4. No final da monitorização ativa, os indivíduos foram transferidos para um protocolo de destino para acompanhamento a longo prazo conforme a orientação da FDA.

Figura 2, compreendendo as Figuras 2A a 2F, é uma série de imagens que demonstram a expansão sustentada *in vivo* e a persistência no sangue e medula das células CART19. O ADN isolado de sangue completo como representado na Figura 2A a 2C ou da medula como representado na Figura 2D a 2F, amostras obtidas de UPN 01 como representado na Figura 2A e 2D, UPN 02 como representado na Figura 2B e 2E e UPN 03 como representado na Figura 2C e 2F foram sujeitos em bruto a análise de Q-PCR usando um ensaio qualificado para detetar e quantificar sequências CART19. Cada ponto de dados representa a média de medidas em triplicado em 100-200 ng de ADN genómico, com % máxima de CV de menos de 1,56%. Os parâmetros de passa/falha para o ensaio incluíram gamas pré-estabelecidas para o declive e eficiência de amplificação, e amplificação de uma amostra de referência. O limite inferior de quantificação para o ensaio estabelecido pela gama da curva padrão foi 2 cópias de transgene/micrograma de ADN genómico; os valores das amostras abaixo desse número são considerados estimativas e apresentadas se pelo menos 2/3 dos replicados geraram um valor Ct com % de CV para os valores 15%. As células CART19

foram infundidas no dia 0, 1 e 2 para UPN 01 e UPN 03, e dias 0, 1, 2 e 11 para UPN 02.

Figura 3, compreendendo as Figuras 3A a 3D, é uma série de imagens que apresentam citocinas de medula e soro antes e depois da infusão de células T CAR; medidas longitudinais das alterações em citocinas, quimiocinas e receptores de citocinas séricas em UPN 01 como representado na Figura 3A, UPN 02 como representado na Figura 3B e UPN 03 como representado na Figura 3C, no dia indicado após a infusão de células CART19 e avaliações em série dos mesmos analitos na medula óssea de UPN 03 como representado na Figura 3D. As amostras foram sujeitas a análise multiplex usando tecnologia de matriz de esferas Luminex e kits multiplex pré-montados e validados. Os Analitos com uma alteração ≥ 3 vezes são indicados, e representados graficamente como a alteração relativa à linha de base como representado na Figura 3A a 3C ou como valores absolutos como representado na Figura 3D. Os valores absolutos para cada analito em cada ponto de tempo foram derivados a partir de uma curva padrão à base de proteína recombinante ao longo de séries de diluição de 8 pontos 3 vezes, com os limites superiores e inferiores de quantificação (ULOQ, LLOQ) determinados através dos valores de corte observados/previstos de 80-120% para as curvas padrão. Cada amostra foi avaliada em duplicado com os valores médios calculados e % de CV na maioria dos casos de menos de 10%. Para acomodar a apresentação de dados consolidados no contexto da vasta gama para os valores absolutos, os dados são apresentados como alteração em número de vezes relativamente ao valor da linha de base para cada analito. Nos casos em que os valores da linha de base não eram detetáveis, metade do valor mais baixo da curva padrão foi usado como o valor da

linha de base. As gamas da curva padrão para valores de analitos e linha de base (dia 0) (listados entre parênteses sequencialmente para UPN01, 02 e 03), tudo em pg/mL: IL1-R α : 35,5-29,318 (689, 301, 287); IL-6: 2,7-4,572 (7, 10,1, 8,7); IFN- γ : 11,2-23,972 (2,8, ND, 4,2); CXCL10: 2,1-5,319 (481, 115, 287); MIP-1 β : 3,3-7,233 (99,7, 371, 174); MCP-1: 4,8-3,600 (403, 560, 828); CXCL9: 48,2-3,700 (1,412, 126, 177); IL2-R α : 13,4-34,210 (4,319, 9,477, 610); IL-8: 2,4-5,278 (15,3, 14,5, 14,6); IL-10: 6,7-13,874 (8,5, 5,4, 0,7); MIP-1 α : 7,1-13,778 (57,6, 57,3, 48,1).

Figura 4, compreendendo as Figuras 4A a 4D, é uma série de imagens que descrevem a expressão prolongada de CART19 de superfície e o estabelecimento de CARs funcionais de memória *in vivo*. A Figura 4A descreve a deteção de linfócitos CD3+ que expressam CAR e a ausência de células B na periferia e medula. Sangue periférico recentemente processado ou células mononucleadas de medula obtidas de UPN 03 no dia 169 pós-infusão de células CART19, foram avaliadas por citometria de fluxo para a expressão de superfície de CAR19 (topo) ou presença de células B (fundo); como um controlo, foram coradas PBMC obtidas de um dador saudável ND365. A estratégia de seleção para as populações de células CD3+ e B é apresentada na Figura 9. Para avaliar a expressão de CAR19 em linfócitos CD3+, as amostras foram co-coradas com anticorpos para CD14-PE-Cy7 e CD16-PE-Cy7 (canal de exclusão) e CD3-FITC, selecionadas positivamente em CD3+, e avaliadas para a expressão de CAR19 nos compartimentos de linfócitos CD8 $^{+}$ e CD8 co-corados com CD8a-PE e o antícorpo idiotípico anti-CAR19 conjugado com Alexa-647. Os dados nos gráficos são selecionados na população de células positivas para CD3/negativas para canal de exclusão. Para avaliar a

presença de células B, as amostras foram co-coradas com os anticorpos CD14-APC e CD3-FITC (canais de exclusão) e avaliadas para a presença de células B na fração negativa para canal de exclusão co-coradas com anticorpos para CD20-PE e CD19-PE-Cy-7. Em todos os casos, os quadrantes de seleção negativos foram estabelecidos em controlos não corados como representado nas Figuras 4B e 4C. A imunofenotipagem de células T de subconjuntos de células T CD4⁺ (Figura 4B) e CD8⁺ (Figura 4C) é mostrada. As amostras de sangue periférico congeladas de UPN 03 obtidas por aférese no dia 56 e 169 pós-infusão de célula T foram deixadas a descansar durante a noite em meio de cultura sem fatores adicionados, lavadas e sujeitas a imunofenotipagem multi-paramétrica para a expressão de marcadores de memória, ativação e exaustão de células T. A estratégia de seleção, como representada na Figura 8, envolveu uma seleção inicial no canal de exclusão de células negativas para (CD14, CD16, Live/Dead Aqua) e positivas para CD3, seguida por seleção positiva em células CD4⁺ e CD8⁺. As seleções e quadrantes foram estabelecidos usando controlos FMO (CAR, CD45RA, PD-1, CD25, CD127, CCR7) ou por seleção em populações de células positivas (CD3, CD4, CD8) e em subconjuntos claramente delineados (CD27, CD28, CD57); os dados foram apresentados após transformação biexponencial para visualização objetiva dos eventos. A Figura 4D descreve a competência funcional de células CAR persistentes. Amostras de sangue periférico congeladas de UPN 03 obtidas por aférese no dia 56 e 169 apés-infusão de células T foram deixadas a descansar durante a noite em meio de cultura sem fatores adicionados, lavadas e diretamente avaliadas *ex vivo* para a capacidade para reconhecer células alvo que expressam CD19 usam ensaios de desgranulação de CD107. Depois de uma incubação de duas

horas na presença de anti-CD28, anti-CD49d e CD107-FITC, as misturas celulares foram recolhidas, lavadas e sujeitas a análise por citometria de fluxo multi-paramétrica para avaliar a capacidade das células CART19 para desgranular em resposta a alvos que expressam CD19. A estratégia de seleção envolveu uma seleção inicial em células negativas para canais de exclusão (CD14-PE-Cy7, CD16-PE-Cy7, Live/Dead Aqua) e positivas para CD3-PE, seguida de seleção em células positivas para CD8-PE-Texas Red; os dados apresentados são para a população selecionada de CD8⁺. Em todos os casos, quadrantes de seleção negativa foram estabelecidos em controlos sem corante.

Figura 5, compreendendo as Figuras 5A a 5C, é uma série de imagens que descrevem os resultados de experiências que avaliam as respostas clínicas após-infusão de células CART19. A Figura 5A descreve que UPN 02 foi tratado com dois ciclos de rituximab e bendamustina com resposta mínima (R/B, seta). As células T CART19 foram infundidas começando 4 dias após apenas bendamustina (B, seta). A leucemia resistente a rituximab e bendamustina foi rapidamente eliminada do sangue, como indicado por uma diminuição na contagem absoluta de linfócitos (ALC) de 60,600/ μ L a 200/ μ L dentro de 18 dias da infusão. O tratamento com corticosteroide foi iniciado no dia 18 pós-infusão devido a mal-estar e síndrome febril não infeciosa. A linha de referência (tracejada) indica o limite superior de normal para ALC. A Figura 5B descreve os resultados de experiências de exemplo de coloração de biópsias de medula sequenciais ou espécimes de coágulos do doente UPN 01 e 03 para CD20. A infiltração de pré-tratamento com leucemia presente em ambos os doentes esteve ausente em espécimes de pós tratamento acompanhadas de normalização da celularidade

e hematopoiese trilinhagem. UPN 01 não teve quaisquer células LLC detetadas como avaliado por citometria de fluxo, citogenética e hibridação de fluorescência *in situ* ou células B normais detetadas por citometria de fluxo na medula óssea ou sangue. UPN 03 teve 5% de células B negativas para CD5 normais residuais confirmadas por citometria de fluxo no dia +23, que também mostrou serem policlonais; nenhuma célula B normal foi detetada no dia +176. A Figura 5C descreve os resultados de experiências usando imagiologia TAC sequencial para avaliar a rápida resolução de linfoadenopatia generalizada resistente a quimioterapia. Massas axilares bilaterais resolvidas por 83 (UPN 01) e 31 (UPN 03) dias pós-infusão, como indicado por setas e círculo.

Figura 6, compreendendo as Figuras 6A a 6C, é uma série de imagens que descrevem contagens absolutas de linfócitos e células CART19+ totais na circulação para UPN 01, 02, 03. O número total de linfócitos (células normais e LLC totais) vs. células CART19+ totais na circulação são representadas graficamente para todos os 3 indivíduos que usam a contagem absoluta de linfócitos a partir de valores CBC, e assumindo um volume de 5,0 L de sangue. O número total de células CART19 na circulação foi calculado usando os valores CBC tandem com contagens absolutas de linfócitos e valores de marcação de Q-PCR como representados na Figura 2, convertendo cópias/ μ g de ADN para marcação % média como aqui descrita noutra parte. Verificou-se que a marcação % de Q-PCR se correlaciona intimamente (variação <2 vezes) com a caracterização por citometria de fluxo dos produtos de infusão e com os dados das amostras em que estavam disponíveis dados de citometria de fluxo concomitantes para enumerar diretamente as células CART19 coradas.

Figura 7, compreendendo as Figuras 7A a 7D, é uma série de imagens que descrevem as experiências que envolvem a deteção direta *ex vivo* de células positivas para CART19 em PBMC UPN-01 71 dias pós-infusão de células T. PBMC UPN-01 recolhidas frescas pós aférese no dia 71 pós-infusão, ou congeladas na altura da aférese para fabrico do produto de célula T (linha de base) e descongeladas antes da coloração, foram sujeitas à análise por citometria de fluxo para detetar a presença de células CART19 que expressam a unidade CAR19 na superfície. Para avaliar a expressão de CAR19 em linfócitos, as amostras foram co-coradas com CD3-PE e o anticorpo idiotípico anti-CAR19 conjugado com Alexa-647, ou co-corada com apenas CD3-PE (FMO para CAR19). A Figura 7A descreve que uma seleção inicial de linfócito foi estabelecida com base na dispersão dianteira e lateral (FSC vs. SSC), seguida de seleção em células CD3+. A Figura 7B descreve a seleção de linfócitos CD3+; Figura 7C descreve a coloração do idiotípico CAR; Figura 7D descreve FMO do idiotípico CAR. A seleção positiva para CAR19 foi estabelecida nas amostras CAR19 FMO.

Figura 8, compreendendo as Figuras 8A a 8C, é uma série de imagens que descrevem a estratégia de seleção para identificar a expressão de CART19 usando citometria de fluxo policromática em espécimes de sangue de UPN 03. A estratégia de seleção para a Figura 8C é mostrada para a amostra UPN 03 do dia 56 e é representativa da estratégia usada na amostra UPN 03 do dia 169. A Figura 8A descreve a seleção primária: Negativa para exclusão (CD14, CD16, LIVE/dead Aqua), positiva para CD3. A Figura 8B descreve seleções secundárias: positiva para CD4, positiva para CD8. A Figura 8C descreve seleções terciárias: positiva para

CAR19 e negativa para CAR19, estabelecidas em amostras CAR FMO (painéis mais à direita).

Figura 9 descreve a estratégia de seleção para identificar diretamente a expressão de CART19 e células B em espécimes de sangue e medula. A estratégia de seleção para a Figura 4A, que mostra a deteção de linfócitos CD3+ que expressam CAR e a ausência de células B na periferia e medula: Gráfico da esquerda: seleção de célula; Painel superior: seleção positiva para células CD3+, painel inferior: seleção negativa (negativa para CD14, negativa para CD3) para células B. NC365, células de controlo de sangue periférico de um dador saudável

Figura 10 é uma imagem que resume a demografia e a resposta dos doentes.

Figura 11 descreve o processo de fabrico de células CART-19

Figura 12, compreendendo as Figuras 12A a 12D, é uma série de imagens que descrevem a resposta clínica num doente. A Figura 12A mostra o vetor lentiviral usado para infetar células T do doente. Foi produzido um vetor lentiviral de grau clínico pseudotipado de proteína G do vírus da estomatite vesicular (pELPs 19-BB-z) que dirige a expressão de scFv anti-CD19 derivado do anticorpo monoclonal FMC63 de murino, domínio transmembranar e de charneira CD8 α humano, e domínios de sinalização de 4-1BB e CD3 ζ humanos. Os detalhes do transgene CAR19, no fundo da Figura 12A, mostram os principais elementos funcionais. A Figura não está à escala. 3'LTR refere-se a repetição terminal longa 3'; 5'LTR, repetição terminal longa 5'; Amp R, gene de resistência à ampicilina; GH bovina poli A, hormona de crescimento bovina com cauda de poliadenilação; cPPT/CTS,

trecho de polipurina central com sequência de terminação central; EF-1 α , fator 1-alfa de elongação; env, envelope; gag, antigénio específico de grupo; pol, polimerase que codifica gene do HIV e transcriptase reversa; R, repetição; RRE, elemento de resposta rev; scFv, fragmento variável de cadeia simples; TM, transmembranar; e WPRE, elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite da marmota. A Figura 12B mostra os níveis séricos de creatinina, ácido úrico e lactato desidrogenase (LDH) desde o dia 1 ao dia 28 após a primeira infusão de células CART19. Os níveis de pico coincidiram com a hospitalização para a síndrome de lise tumoral. A Figura 12C mostra espécimes de biópsia de medula óssea obtidos 3 dias após quimioterapia (dia -1, antes da infusão de células CART19) e 23 dias e 6 meses após a infusão de células CART19 (hematoxilina e eosina). O espécime da linha de base mostra a medula óssea hipercelular (60%) com hematopoiese de trilinhagem, infiltrada por agregados predominantemente intersticiais de pequenos linfócitos maduros que são responsáveis por 40% da celularidade total. O espécime obtido no dia 23 apresenta agregados linfoideos residuais (10%) que eram negativos para a leucemia linfoide crónica (LLC), com uma mistura de células T e células B negativas para CD5. O espécime obtido 6 meses após-infusão apresenta hematopoiese de trilinhagem, sem agregados linfoideos e ausência continuada de LLC. A Figura 12D mostra varrimentos de TAC com contraste aumentado obtidos antes do doente estar registado no estudo e 31 dias e 104 dias após a primeira infusão. O varrimento de TAC de pré-infusão revela massas bilaterais de 1 a 3 cm. A regressão da linfoadenopatia axilar ocorreu dentro de 1 mês após-infusão e foi sustentada. As setas destacam vários nódulos linfáticos aumentados antes da terapia e as respostas dos

nódulos linfáticos em varrimentos de TAC comparáveis após terapia.

Figura 13, compreendendo as Figuras 13A a 13E, é uma série de imagens que descrevem citocinas da medula óssea e soro antes e depois da infusão de células T do recetor de抗énio quimérico. Medidas em série da citocina interferão- γ (Figura 13A), da quimiocina 10 de motivo C-X-C de quimiocinas estimulada por interferão- γ (CXCL10) (Figura 13B) e do ligando 9 do motivo C-X-C (CXCL9) (Figura 13C) e da interleucina-6 (Figura 13D) foram feitas nos pontos de tempo indicados. Os aumentos nestas quimiocinas e citocinas inflamatórias coincidiram com o início da síndrome de lise tumoral. Baixos níveis de interleucina-6 foram detetados na linha de base, enquanto o interferão- γ , CXCL9 e CXCL10 estavam abaixo dos limites de deteção na linha de base. As gamas da curva padrão para os valores dos analitos e da linha de base no doente, dadas entre parênteses, foram como se seguem: interferão- γ , 11,2 a 23,972 pg por mililitro (1,4 pg por mililitro); CXCL10, 2,1 a 5319 pg por mililitro (274 pg por mililitro); CXCL9, 48,2 a 3700 pg por mililitro (177 pg por mililitro); interleucina-6, 2,7 a 4572 pg por mililitro (8,3 pg por mililitro); fator α de necrose tumoral (TNF- α), 1,9 a 4005 pg por mililitro (não detetável); e recetor solúvel de interleucina-2, 13,4 a 34,210 pg por mililitro (644 pg por mililitro). A Figura 13E mostra a indução da resposta imune na medula. As citocinas TNF- α , interleucina-6, interferão- γ , quimiocina CXCL9 e recetor solúvel da interleucina-2 foram medidos em fluidos sobrenadantes obtidos de aspirados de medula óssea nos dias indicados antes e depois da infusão de células CART19. Os aumentos nos níveis de interleucina-6, interferão- γ , CXCL9 e recetor solúvel de interleucina-2

coincidiram com a síndrome de lise tumoral, pico da infiltração de células T do recetor quimérico de抗igénio e erradicação do infiltrado leucémico.

Figura 14, compreendendo as Figuras 14A a 14C, é uma série de imagens que descrevem a expansão e a persistência de células T quiméricas do recetor de抗igénio *in vivo*. O ADN genómico (ADNg) foi isolado a partir de amostras de sangue completo do doente (Figura 14A) e de aspirados de medula óssea (Figura 14B) recolhidos em pontos de tempo em série antes e depois da infusão de células T do recetor de抗igénio quimérico e usados para análise quantitativa da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Como avaliado com base no ADN transgénico e na percentagem de linfócitos que expressam CAR19, as células T do recetor de抗igénio quimérico expandiram-se a níveis que eram mais de 1000 vezes superiores aos níveis de enxerto iniciais no sangue periférico e na medula óssea. Os níveis de pico das células T do recetor de抗igénio quimérico foram correlacionados temporalmente com a síndrome de lise tumoral. Uma amostra de sangue obtida no dia 0 e uma amostra de medula óssea obtida no dia 1 não apresentaram qualquer sinal de PCR na linha de base. A análise por citometria de fluxo de aspirados de medula óssea na linha de base (Figura 14C) mostra infiltração predominante com células CD19+CD5+ que eram clonais, como avaliado por meio de coloração da cadeia leve kappa de imunoglobulina, com escassez de células T. No dia 31 após a infusão, as células T CD5+ estavam presentes, e não foram detetadas células B normais ou malignas. Os números indicam a frequência relativa das células em cada quadrante. Tanto o eixo dos x como os y apresentam uma escala log10. A estratégia de seleção envolveu uma seleção inicial em células CD19+ e

CD5+ nos quadrados da esquerda, e a identificação subsequente da imunoglobulina kappa e da expressão de lambda no subconjunto de CD19+CD5+ (quadrados da direita).

DESCRIÇÃO DETALHADA

A invenção refere-se a composições para tratamento do cancro que inclui, mas não está limitado a, malignidades hematológicas e tumores sólidos. A presente invenção refere-se a uma estratégia de transferência celular adotiva de células T transduzidas para expressar um recetor de抗igénio quimérico (CAR). Os CARs são moléculas que combinam a especificidade à base de anticorpo para um抗igénio desejado (por exemplo,抗igénio tumoral) com um domínio intracelular de ativação do recetor de célula T para gerar uma proteína quimérica que apresenta uma atividade imune celular antitumoral específica.

A presente invenção refere-se geralmente à utilização de células T geneticamente modificadas para expressar estavelmente um CAR desejado como definido nas reivindicações. As células T que expressam um CAR são aqui referidas como células T CAR ou células T modificadas com CAR. De um modo preferido, a célula pode ser geneticamente modificada para expressar estavelmente um domínio de ligação de anticorpo na sua superfície, conferindo nova especificidade de抗igénio que é independente de MHC. A célula T é geneticamente modificada para expressar estavelmente um CAR que combina um domínio de reconhecimento de抗igénio de um anticorpo específico com um domínio intracelular da proteína da cadeia CD3-zeta numa única proteína quimérica.

Como aqui descrito, o CAR aqui descrito compreende um domínio extracelular que tem um domínio de reconhecimento de抗ígeno, um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático. Como aqui descrito, é usado o domínio transmembranar que está naturalmente associado com um dos domínios no CAR. Também como aqui descrito, o domínio transmembranar pode ser selecionado ou modificado por substituição de aminoácido para evitar a ligação de tais domínios aos domínios transmembranares das mesmas ou diferentes proteínas de membrana superficial, para minimizar interações com outros membros do complexo recetor. De um modo preferido, o domínio transmembranar é o domínio de charneira CD8α.

No que diz respeito ao domínio citoplasmático, o CAR aqui descrito compreende o domínio de sinalização 4-1BB. O domínio citoplasmático do CAR pode ser concebido para compreender ainda o domínio de sinalização CD3-zeta. O domínio citoplasmático do CAR inclui os módulos de sinalização CD3-zeta e 4-1BB. Desta forma, a invenção proporciona células T CAR e a sua utilização para terapia adotiva.

Como aqui descrito, as células T CAR aqui descritas podem ser geradas por introdução de um vetor lentiviral compreendendo um CAR desejado, por exemplo, um CAR compreendendo anti-CD19, charneira CD8α e domínio transmembranar, e domínios de sinalização 4-1BB e CD3zeta humanos, nas células. As células T CAR da invenção podem replicar *in vivo* resultando em persistência a longo prazo que pode conduzir a controlo tumoral sustentado.

Também aqui divulgado é a administração de uma célula T geneticamente modificada expressando um CAR para o tratamento de um doente que está com cancro ou em risco de estar com cancro usando infusão de linfócitos. De um modo preferido, a infusão de linfócitos autóloga é usada no tratamento. PBMCs autólogas são recolhidas de um doente com necessidade do tratamento e as células T são ativadas e expandidas usando os métodos aqui descritos e conhecidos na técnica e depois infundidas de novo no doente.

É também aqui divulgado o tratamento de um doente em risco de desenvolver LLC. Também aqui divulgado é o tratamento de uma malignidade ou uma doença autoimune em que a quimioterapia e/ou a imunoterapia num doente resulta em imunossupressão significativa no doente, aumentando assim o risco do doente desenvolver LLC.

Como aqui divulgados são métodos de utilização de células T que expressam um CAR anti-CD19 que inclui o domínio co-estimulador CD3-zeta e 4-1BB (também referidas como células T CART19). As células T CART19 aqui descritas podem submeter-se a expansão robusta *in vivo* de células T e podem estabelecer células de memória específicas de CD19 que persistem em altos níveis para uma quantidade prolongada de tempo no sangue e na medula óssea. Em alguns casos, as células T CART19 infundidas num doente podem eliminar células da leucemia *in vivo* em doentes com LLC resistente a quimioterapia avançada.

Definições

Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado que geralmente entendido por um perito com conhecimentos gerais

na técnica a que a invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática para testar a presente invenção, os materiais e métodos preferidos são aqui descritos. Na descrição e reivindicação da presente invenção, a seguinte terminologia será usada.

Deve ser também entendido que a terminologia aqui usada é apenas com o objetivo de descrever formas de realização particulares, e não pretende ser limitativa.

Os artigos "um" e "uma" são aqui usados para referir um ou mais do que um (isto é, pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais de um elemento.

"Cerca de" como aqui usado quando se refere a um valor mensurável, tal como uma quantidade, uma duração temporal, e semelhantes, pretende abranger variações de $\pm 20\%$ ou $\pm 10\%$, de um modo mais preferido, $\pm 5\%$, de um modo ainda mais preferido, $\pm 1\%$ e, de um modo muito mais preferido, $\pm 0,1\%$ do valor especificado, uma vez que tais variações são apropriadas para realizar os métodos divulgados.

A "ativação", como aqui usado, refere-se ao estado de uma célula T que foi suficientemente estimulada para induzir proliferação celular detetável. A ativação pode também ser associada com a produção de citocina induzida e funções efetoras detetáveis. O termo "células T ativadas" refere-se, entre outras coisas, a células T que estão a sofrer divisão celular.

O termo "anticorpo," como aqui usado, refere-se a uma molécula de imunoglobulina que se liga especificamente a um抗igénio. Os anticorpos podem ser imunoglobulinas intactas derivadas de fontes naturais ou de fontes recombinantes e podem ser porções imunoreativas de imunoglobulinas intactas. Os anticorpos são tipicamente tetrâmeros de moléculas de imunoglobulina. Os anticorpos na presente invenção podem existir numa variedade de formas que incluem, por exemplo, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, Fv, Fab e F(ab)₂, assim como anticorpos de cadeia simples e anticorpos humanizados (Harlow et al., 1999, Em: *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, Em: *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).

O termo "fragmento de anticorpo" refere-se a uma porção de um anticorpo intacto e refere-se às regiões variáveis determinantes antigénicas de um anticorpo intacto. Os exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas não estão limitados a, Fabs, Fab, F(ab)₂, e fragmentos de Fv, anticorpos lineares, anticorpos scFv e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo.

Uma "cadeia pesada de anticorpo," como aqui usado, refere-se à maior dos dois tipos de cadeias polipeptídicas presentes em todas as moléculas de anticorpo nas suas conformações naturais.

Uma "cadeia leve de anticorpo," como aqui usado, refere-se à menor dos dois tipos de cadeias polipeptídicas presentes

em todas as moléculas de anticorpo nas suas conformações naturais. cadeias leves κ e λ referem-se aos principais dois isotipos de cadeia leve de anticorpo.

Pelo termo "anticorpo sintético" como aqui usado, entende-se um anticorpo que é gerado usando tecnologia de ADN recombinante, tal como, por exemplo, um anticorpo expresso por um bacteriófago, como aqui descrito. O termo deve também ser interpretado para significar um anticorpo que é gerado por síntese de uma molécula de ADN que codifica o anticorpo e cuja molécula de ADN expressa uma proteína de anticorpo, ou uma sequência de aminoácidos que especifica o anticorpo, em que a sequência de ADN ou de aminoácidos foi obtida usando tecnologia de síntese de sequência de ADN ou de aminoácidos que está disponível e é bem conhecido na técnica.

O termo "antigénio" ou "Ag" como aqui usado é definido como uma molécula que provoca uma resposta imune. Esta resposta imune pode envolver a produção de anticorpo, ou a ativação de células imunologicamente competentes específicas, ou ambas. O perito na técnica entenderá que qualquer macromolécula, incluindo virtualmente todas as proteínas ou péptidos, pode servir como um antigénio. Além disso, os antigénios podem ser derivados de ADN recombinante ou genómico. Um perito na técnica entenderá que qualquer ADN, que compreende sequências de nucleótidos ou uma sequência de nucleótidos parcial que codifica uma proteína que induza uma resposta imune codifica consequentemente um "antigénio", como esse termo é aqui usado. Além disso, o perito na técnica entenderá que um antigénio não precisa de ser codificado unicamente por uma sequência de nucleótidos de tamanho completo de um gene. É facilmente entendido que

inclui a presente invenção inclui, mas não está limitada, à utilização de sequências de nucleótidos parciais de mais do que um gene e que estas sequências de nucleótidos estão organizadas em várias combinações para induzir a resposta imune desejada. Além disso, um perito na técnica entenderá que um antigénio não precisa, de todo, de ser codificado por um "gene". É facilmente entendido que um antigénio pode ser gerado, sintetizado ou pode ser derivado de uma amostra biológica. Uma tal amostra biológica pode incluir, mas não está limitada a, uma amostra de tecido, uma amostra de tumor, uma célula ou um fluido biológico.

O termo "efeito antitumoral" como aqui usado, refere-se um efeito biológico que pode ser manifestado por uma diminuição no volume tumoral, por uma diminuição no número de células tumorais, por uma diminuição no número de metástases, por um aumento na esperança de vida ou pela melhora de vários sintomas fisiológicos associados com o estado canceroso. Um "efeito antitumoral" pode também ser manifestado pela capacidade dos péptidos, polinucleótidos, células e anticorpos da invenção na prevenção, antes de mais, da ocorrência de tumor.

O termo "auto-antigénio" significa, de acordo com a presente invenção, qualquer auto-antigénio que for reconhecido equivocadamente pelo sistema imunitário como sendo estranho. Os auto-antigénios compreendem, mas não estão limitados a, proteínas celulares, fosfoproteínas, proteínas de superfície celular, lípidos celulares, ácidos nucleicos, glicoproteínas, incluindo receptores de superfície celular.

O termo "doença autoimune" como aqui usado, é definido como um distúrbio que resulta de uma resposta autoimune. Uma doença autoimune é o resultado de uma resposta imprópria e excessiva a um auto-antigénio. Os exemplos de doenças autoimunes incluem, mas não estão limitadas a, doença de Addison, alopecia areata, espondilite anquilosante, hepatite autoimune, parotidite autoimune, doença de Crohn, diabetes (Tipo I), epidermólise bolhosa distrófica, epididimite, glomerulonefrite, doença de Graves, síndrome de Guillain-Barr, doença de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerose múltipla, miastenia gravis, pênfigo vulgar, psoriase, febre reumática, artrite reumatoide, sarcoidose, escleroderma, síndrome de Sjogren, espondiloartropatias, tireoidite, vasculite, vitílico, mixedema, anemia perniciosa, colite ulcerosa, entre outras.

Como aqui usado, o termo "autólogo" pretende referir qualquer material derivado do mesmo indivíduo, o qual é para ser posteriormente reintroduzido no indivíduo.

"Alogénico" refere-se a um enxerto derivado de um animal diferente da mesma espécie.

"Xenogénico" refere-se a um enxerto derivado de um animal de uma espécie diferente.

O termo "cancro" como aqui usado, é definido como uma doença caracterizada pelo crescimento rápido e descontrolado de células aberrantes. As células cancerosas podem-se espalhar localmente ou através da circulação sanguínea e do sistema linfático a outras partes do corpo. Os exemplos de vários cancros incluem, mas não estão limitados a, cancro da mama, cancro da próstata, cancro do ovário, cancro do colo do útero, cancro de pele, cancro do

pâncreas, cancro colorretal, cancro renal, cancro do fígado, cancro cerebral, linfoma, leucemia, cancro pulmonar e semelhantes.

"Ligando co-estimulador," como o termo é aqui usado, inclui uma molécula numa célula apresentadora de抗ígenio (por exemplo, uma aAPC, célula dendrítica, célula B e semelhantes) que se liga especificamente a uma molécula co-estimuladora cognata numa célula T, proporcionando assim um sinal que, para além do sinal primário proporcionado através, por exemplo, de ligação a um complexo TCR/CD3 com uma molécula de MHC carregada com péptido, medeia uma resposta de célula T, incluindo, mas não limitada a, proliferação, ativação, diferenciação e semelhantes. Uma ligando co-estimulador pode incluir, mas não está limitado a, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando co-estimulador induzível (ICOS-L), molécula de adesão intercellular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, beta-recetor da linfotoxina, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, um agonista ou anticorpo que se liga ao recetor do ligando Toll e a um ligando que liga especificamente a B7-H3. Uma ligando co-estimulador também abrange, *inter alia*, um anticorpo que se liga especificamente a uma molécula co-estimuladora presente numa célula T, tal como, mas não limitada a, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS,抗ígeno-1 associado à função do linfócito (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, e um ligando que se liga especificamente a CD83.

Uma "molécula co-estimuladora" refere-se ao parceiro de ligação cognato numa célula T que se liga especificamente a um ligando co-estimulador, mediando assim uma resposta co-estimuladora pela célula T, tal como, mas não limitada a,

proliferação. As moléculas co-estimuladoras incluem, mas não estão limitadas a, uma molécula MHC de classe I, BTLA e um recetor de ligando Toll.

Um "sinal co-estimulador", como aqui usado, refere-se a um sinal, que em combinação com um sinal primário, tal como ligação TCR/CD3, conduz a proliferação de células T e/ou regulação positiva ou regulação negativa de moléculas chave,

A "doença" é um estado de saúde de um animal em que o animal não pode manter a homeostasia, e em que, se a doença não for melhorada, então a saúde do animal continua a se deteriorar. Pelo contrário, um "distúrbio" num animal é um estado de saúde em que o animal pode manter a homeostasia, mas em que o estado de saúde do animal é menos favorável do que seria na ausência do distúrbio. Deixado sem tratamento, um distúrbio não causa necessariamente uma diminuição adicional no estado de saúde do animal.

Uma "quantidade eficaz" como aqui usado, significa uma quantidade que proporciona um benefício terapêutico ou profilático.

"Codificante" refere-se à propriedade inerente de sequências específicas de nucleótidos num polinucleótido, tal como um gene, um ADNc ou um ARNm, para servirem como moldes para a síntese de outros polímeros e macromoléculas em processos biológicos, que têm uma sequência definida de nucleótidos (isto é, ARNr, ARNt e ARNm) ou uma sequência definida de aminoácidos e as propriedades biológicas que daí resultam. Assim, um gene codifica uma proteína se a transcrição e a tradução do ARNm que corresponde a esse

gene produzem a proteína numa célula ou noutro sistema biológico. Tanto a cadeia codificante, a sequência de nucleótidos que é idêntica à sequência de ARNm e é geralmente proporcionada em listagens de sequências, como a cadeia não codificante, usada como o molde para a transcrição de um gene ou ADNc, podem ser referidas como codificantes da proteína ou de outro produto desse gene ou ADNc.

Como aqui usado "endógeno" refere-se a qualquer material de, ou produzido dentro de, um organismo, célula, tecido ou sistema.

Como aqui usado, o termo "exógeno" refere-se a qualquer material introduzido ou produzido fora de um organismo, célula, tecido ou sistema.

O termo "expressão" como aqui usado é definido como a transcrição e/ou a tradução de uma sequência de nucleótidos particular dirigida pelo seu promotor.

"Vetor de expressão" refere-se a um vetor compreendendo um polinucleótido recombinante compreendendo sequências de controlo da expressão ligadas operativamente a uma sequência de nucleótidos a ser expressa. Um vetor da expressão compreende suficientes elementos de atuação cis para a expressão; outros elementos para a expressão podem ser proporcionados pela célula hospedeira ou num sistema de expressão *in vitro*. Os vetores da expressão incluem todos aqueles conhecidos na técnica, tal como cosmídeos, plasmídeos (por exemplo, simples ou contidos em lipossoma) e vírus (por exemplo, lentivírus, retrovírus, vírus

adenoides e vírus adeno-associados) que incorporam o polinucleótido recombinante.

A "homologia" refere-se à identidade de sequência ou à semelhança de sequência entre dois polipéptidos ou entre duas moléculas de ácidos nucleicos. Quando uma posição em duas sequências comparadas está ocupada pela mesma base ou subunidade de resíduo de aminoácido, por exemplo, se uma posição em cada uma das duas moléculas de ADN está ocupada por adenina, então as moléculas são homólogas nessa posição. A percentagem de homologia entre duas sequências é uma função do número de emparelhamentos ou de posições homólogas partilhadas pelas duas sequências, dividida 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. A título de exemplo, as sequências de ADN ATTGCC e TATGGC partilham 50% de homologia. Em geral, é feita uma comparação quando duas sequências são alinhadas para dar homologia máxima.

O termo "imunoglobulina" ou "Ig" como aqui usado, é definido como uma classe de proteínas que funcionam como anticorpos. Os anticorpos expressos por células B são por vezes referidos como BCR (recetor de célula B) ou recetor de抗原. Os cinco membros incluídos nesta classe de proteínas são IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. A IgA é o antícorpo primário que está presente em secreções corporais, tais como saliva, lágrimas, leite materno, secreções gastrointestinais e secreções de muco do trato respiratório e genito-urinário. A IgG é o antícorpo de circulação mais comum. A IgM é a principal imunoglobulina produzida na resposta imune primária na maioria dos indivíduos. É a

imunoglobulina mais eficiente em aglutinação, fixação de complemento e noutras respostas de anticorpo, e é importante na defesa contra bactérias e vírus. A IgD é a imunoglobulina que não tem nenhuma função de anticorpo conhecida, mas pode servir como um recetor de antigénio. A IgE é a imunoglobulina que medeia a hipersensibilidade imediata ao provocar a liberação de mediadores a partir de mastócitos e basófilos após exposição ao alergénio.

Como aqui usado, um "material informativo" inclui uma publicação, um registo, um diagrama, ou qualquer outro meio de expressão que possa ser usado para comunicar a utilidade das composições e métodos da invenção. O material informativo do kit da invenção pode, por exemplo, ser afixado a um recipiente que contenha o ácido nucleico, péptido e/ou a composição da invenção ou ser enviado juntamente com um recipiente que contenha o ácido nucleico, péptido e/ou a composição. Alternativamente, o material informativo pode ser enviado separadamente do recipiente com a intenção de que o material informativo e o composto sejam usados cooperativamente pelo recetor.

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

No contexto da presente invenção, são usadas as seguintes abreviaturas para as bases de ácidos nucleicos 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.

Salvo especificação em contrário, uma "sequência de nucleótidos que codifica uma sequência de aminoácidos" inclui todas as sequências de nucleótidos que são versões degeneradas de umas das outras e que codifica a mesma sequência de aminoácidos. A frase sequência de nucleótidos que codifica uma proteína ou um ARN pode também incluir intrões na medida em que a sequência de nucleótidos que codifica a proteína pode em alguma versão conter um ou mais intrões.

Um "lentivírus" como aqui usado refere-se a um gênero da família Retroviridae. Os lentivírus são únicos entre os retrovírus por serem capazes de infetar células que não se dividem; podem transferir uma quantidade significativa de informação genética para o ADN da célula hospedeira, pelo que são um dos métodos mais eficientes de um vetor de transferência génica. HIV, SIV e FIV são todos exemplos de lentivírus. Os vetores derivados de lentivírus proporcionam os meios para conseguir níveis significativos de transferência génica *in vivo*.

Pelo termo "modular", como aqui usado, entende-se mediar um aumento ou diminuição detetável no nível de uma resposta num indivíduo comparativamente ao nível de uma resposta no indivíduo na ausência de um tratamento ou composto, e/ou comparativamente ao nível de uma resposta num indivíduo de outro modo idêntico, mas não tratado. O termo abrange

perturbar e/ou afetar um sinal ou resposta nativa, mediando assim uma resposta terapêutica benéfica num indivíduo, de um modo preferido, um ser humano.

Salvo especificação em contrário, uma "sequência de nucleótidos que codifica uma sequência de aminoácidos" inclui todas as sequências de nucleótidos que são versões degeneradas de uma das outras e que codificam a mesma sequência de aminoácidos. As sequências de nucleótidos que codifica proteínas e ARN podem incluir intrões.

O termo "ligado operativamente" refere-se a ligação funcional entre uma sequência reguladora e uma sequência de ácidos nucleicos heterólogos resultando em expressão da última. Por exemplo, uma primeira sequência de ácidos nucleicos está ligada operativamente a uma segunda sequência de ácidos nucleicos quando a primeira sequência de ácidos nucleicos é colocada numa relação funcional com a segunda sequência de ácidos nucleicos. Por exemplo, um promotor está ligado operativamente a uma sequência codificante se o promotor afetar a transcrição ou a expressão da sequência codificante. Em geral, sequências de ADN ligadas operativamente são contíguas e, se for necessário juntar duas regiões codificantes de proteína, na mesma grelha de leitura.

O termo antigénio tumoral "sobreexpresso" ou "sobreexpressão" do antigénio tumoral pretendem indicar um nível anómalo de expressão do antigénio tumoral numa célula de uma área de doença, tal como um tumor sólido dentro de um tecido ou órgão específico do doente relativamente ao nível de expressão numa célula normal desse tecido ou órgão. Os doentes que têm tumores sólidos ou uma

malignidade hematológica caracterizada por sobreexpressão do抗igénio tumoral podem ser determinados por ensaios padrão conhecidos na técnica.

A administração "parentérica" de uma composição imunogenética inclui, por exemplo, injeção subcutânea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) ou intrasternal, ou técnicas de infusão.

Os termos "doente", "sujeito", "indivíduo" e semelhantes são aqui usados indiscriminadamente, e referem-se a qualquer animal, ou suas células *in vitro* ou *in situ*, suscetíveis aos métodos aqui descritos. Em determinadas formas de realização não limitantes, o doente, sujeito ou indivíduo é um ser humano.

O termo "polinucleótido" como aqui usado é definido como uma cadeia de nucleótidos. Além disso, os ácidos nucleicos são polímeros de nucleótidos. Assim, ácidos nucleicos e polinucleótidos como aqui utilizados são usados indiscriminadamente. O perito na técnica tem o conhecimento geral de que os ácidos nucleicos são polinucleótidos, que podem ser hidrolisados em "nucleótidos monoméricos". Os nucleótidos monoméricos podem ser hidrolisados em nucleósidos. Como aqui usado, os polinucleótidos incluem, mas não estão limitados a, todas as sequências de ácidos nucleicos que são obtidas por quaisquer meio disponíveis na técnica, incluindo, sem limitação, meios recombinantes, isto é, a clonagem de sequências de ácidos nucleicos a partir de uma biblioteca recombinante ou de um genoma celular, usando a tecnologia de clonagem convencional e PCR™, e semelhantes, e por meios sintéticos.

Como aqui usados, os termos "péptido", "polipéptido" e "proteína" são usados indiscriminadamente, e referem-se a um composto compreendido de resíduos de aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. Uma proteína ou um péptido devem conter pelo menos dois aminoácidos, e não é colocada limitação no número máximo de aminoácidos que podem compreender uma sequência de proteína ou de péptido. Os polipéptidos incluem qualquer péptido ou proteína compreendendo dois ou mais aminoácidos juntos entre si por ligações peptídicas. Como aqui usado, o termo refere-se a cadeias curtas, que são também geralmente referidas na técnica como péptidos, oligopéptidos e oligómeros, por exemplo, e a cadeias mais longas, que são geralmente referidas na técnica como proteínas, das quais existem muitos tipos. Os "polipéptidos" incluem, por exemplo, fragmentos biologicamente ativos, polipéptidos substancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusão, entre outros. Os polipéptidos incluem péptidos naturais, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos ou uma sua combinação.

O termo "promotor" como aqui usado é definido como uma sequência de ADN reconhecida pela maquinaria sintética da célula, ou maquinaria sintética introduzida, requerida para iniciar a transcrição específica de uma sequência de polinucleótidos.

Como aqui usado, o termo "promotor/sequência reguladora" significa uma sequência de ácidos nucleicos que é requerida para expressão de um produto génico ligado operativamente ao promotor/sequência reguladora. Em alguns casos, esta sequência pode ser a sequência promotora do núcleo e,

noutros casos, esta sequência pode também incluir uma sequência intensificadora e outros elementos reguladores que são requeridos para a expressão do produto génico. O promotor/sequência reguladora pode, por exemplo, ser uma que expressa o produto génico de um modo específico do tecido.

Um promotor "constitutivo" é uma sequência de nucleótidos que, quando ligada operativamente a um polinucleótido que codifica ou especifica um produto génico, faz com que o produto génico seja produzido numa célula sob grande parte das condições ou todas as condições fisiológicas da célula.

Um promotor "induzível" é uma sequência de nucleótidos que, quando ligada operativamente a um polinucleótido que codifica ou especifica um produto génico, faz com que o produto génico seja produzido numa célula, substancialmente apenas quando um indutor que corresponde ao promotor está presente na célula.

Um promotor "específico de tecido" é uma sequência de nucleótidos que, quando ligada operativamente a um polinucleótido codificado ou especificado por um gene, faz com que o produto génico seja produzido numa célula, substancialmente apenas se a célula for uma célula do tipo de tecido que corresponde ao promotor.

Pelo termo "liga-se especificamente", como aqui usado no que diz respeito a um anticorpo, entende-se um anticorpo que reconhece um抗原 específico, mas não reconhece substancialmente, nem se liga, a outras moléculas numa amostra. Por exemplo, um anticorpo que se liga especificamente a um抗原 de uma espécie pode também

ligar-se a esse抗原 de uma ou mais espécies. Mas, tal reatividade cruzada entre espécies não altera a própria classificação de um anticorpo como específico. Num outro exemplo, um anticorpo que se liga especificamente a um抗原 pode também ligar-se a formas alélicas diferentes do抗原. Contudo, tal reatividade cruzada não altera a própria classificação de um anticorpo como específico. Em alguns casos, os termos "ligação específica" ou "liga-se especificamente", podem ser usados com referência à interação de um anticorpo, uma proteína ou um péptido com uma segunda espécie química, para significar que a interação é dependente da presença de uma estrutura particular (por exemplo, um epitopo ou determinante抗原ico) na espécie química; por exemplo, um anticorpo reconhece e liga-se a uma estrutura proteica específica em vez de proteínas na generalidade. Se um anticorpo for específico para o epitopo "A", a presença de uma molécula contendo epitopo A (ou livre, sem marcação A), numa reação contendo "A" marcado e o anticorpo, irá reduzir a quantidade de A marcado ligado ao anticorpo.

Pelo termo "estimulação", entende-se uma resposta primária induzida por ligação de uma molécula estimuladora (por exemplo, um complexo TCR/CD3) ao seu ligando cognato mediando assim um evento de transdução de sinal, tal como, mas não limitada a, transdução de sinal através do complexo TCR/CD3. A estimulação pode mediar a expressão alterada de determinadas moléculas, tal como regulação negativa de TGF- β , e/ou a reorganização de estruturas citoesqueléticas, e semelhantes.

Uma "molécula estimuladora", como o termo é aqui usado, significa uma molécula numa célula T que se liga

especificamente a um ligando estimulador cognato presente numa célula apresentadora de抗igénio.

Um "ligando estimulador", como aqui usado, significa um ligando a que quando presente numa célula apresentadora de抗igénio (por exemplo, uma aAPC, uma célula dendrítica, uma célula B e semelhantes) pode-se ligar especificamente a um parceiro de ligação cognato (referido aqui como uma "molécula estimuladora") numa célula T, mediando assim uma resposta primária pela célula T, incluindo, mas não limitada a, ativação, iniciação de uma resposta imune, proliferação, e semelhantes. Os ligandos estimuladores são bem conhecidas na técnica e abrangem, *inter alia*, uma molécula de MHC de classe I carregada com um péptido, um anticorpo anti-CD3, um superagonista do anticorpo anti-CD28 e um superagonista do anticorpo anti-CD2.

O termo "indivíduo" pretende incluir organismos vivos em que uma resposta imune pode ser induzida (por exemplo, mamíferos). Os exemplos de indivíduos incluem seres humanos, cães, gatos, murganhos, ratos e suas espécies transgénicas.

Como aqui usado, uma célula "substancialmente purificada" é uma célula que está essencialmente livre de outros tipos de células. Uma célula substancialmente purificada também se refere a uma célula que é separada de outros tipos de células com as quais está normalmente associada no seu estado natural. Em alguns casos, uma população de células substancialmente purificadas refere-se a uma população homogénea de células. Noutros exemplos, este termo refere-se simplesmente a células que foram separadas das células com que estão naturalmente associadas no seu estado

natural. Em algumas formas de realização, as células são cultivadas *in vitro*. Noutras formas de realização, as células não são cultivadas *in vitro*.

O termo "terapêutico" como aqui usado significa um tratamento e/ou profilaxia. Um efeito terapêutico é obtido pela supressão, remissão ou erradicação de um estado de doença.

O termo "quantidade terapêutica eficaz" refere-se à quantidade do composto em causa que irá induzir a resposta biológica ou médica de um tecido, sistema ou indivíduo que está a ser pretendida pelo investigador, veterinário, médico ou outro clínico. O termo "quantidade terapêutica eficaz" inclui aquela quantidade de um composto que, quando administrada, é suficiente para prevenir o desenvolvimento, ou aliviar em certa medida, um ou mais dos sinais ou sintomas do distúrbio ou doença a ser tratada. A quantidade terapêutica eficaz irá variar dependendo do composto, da doença e da sua gravidade e da idade, peso, etc., do indivíduo a ser tratado.

"Tratar" uma doença, como o termo é aqui usado, significa reduzir a frequência ou a gravidade de pelo menos um sinal ou sintoma de uma doença ou distúrbio sofrido por um indivíduo.

O termo "transfetada" ou "transformada" ou "transduzida" como aqui usado, refere-se a um processo através do qual ácido nucleico exógeno é transferido ou introduzido na célula hospedeira. A célula "transfetada" ou "transformada" ou "transduzida" é uma que foi transfetada, transformada ou

transduzida com ácido nucleico exógeno. A célula inclui a célula primária em causa e a sua progenia.

A frase "sob controlo transcracional" ou "ligado operativamente" como aqui usada, significa que o promotor está no local e na orientação corretos em relação a um polinucleótido para controlar a iniciação da transcrição pela ARN polimerase e expressão do polinucleótido.

Um "vetor" é uma composição de matéria que comprehende um ácido nucleico isolado e que pode ser usada para transferir o ácido nucleico isolado para o interior de uma célula. São conhecidos na técnica numerosos vetores que incluem, mas não estão limitados a, polinucleótidos lineares, polinucleótidos associados a compostos iónicos ou anfifílicos, plasmídeos e vírus. Assim, o termo "vetor" inclui um plasmídeo ou vírus autonomamente replicante. O termo deve também ser interpretado para incluir compostos não-plasmídicos e não-virais que facilitem a transferência de ácidos nucleicos para células, tais como, por exemplo, compostos de polilisina, lipossomas, e semelhantes. Os exemplos de vetores virais incluem, mas não estão limitados a, vetores adenovirais, vetores virais adeno-associados, vetores retrovirais, e semelhantes.

Gamas: ao longo desta divulgação, vários aspetos da invenção podem ser apresentados num formato de gama. Deve ser entendido que a descrição no formato de gama é meramente por conveniência e brevidade e não se deve ser interpretada como uma limitação inflexível do âmbito da invenção. Desta forma, a descrição de uma gama deve ser considerada como tendo divulgado especificamente todas as subgamas possíveis, assim como valores numéricos

individuais dentro dessa gama. Por exemplo, a descrição de uma gama, tal como de 1 a 6, deve ser considerada como sendo especificamente divulgadas subgamas, tais como 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5, 2 a 4, 2 a 6, 3 a 6, etc., assim como números individuais dentro dessa gama, por exemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 e 6. Isto aplica-se apesar da largura da gama.

Descrição

A presente invenção proporciona composições para tratamento do cancro. O cancro pode ser uma malignidade hematológica, um tumor sólido, um tumor primário ou metastizante. De um modo preferido, o cancro é uma malignidade hematológica e, de um modo mais preferido, o cancro é leucemia linfocítica crónica (LLC).

Numa forma de realização, a invenção proporciona uma célula T manipulada para expressar um CAR, em que a célula T CAR apresenta uma propriedade antitumoral como aqui definida. O CAR pode ser manipulado para compreender um domínio extracelular que tem um domínio de ligação de抗原 (antigénio) CD19 fundido ao domínio de sinalização intracelular zeta CD3 da cadeia zeta do complexo recetor de抗原 (antigénio) da célula T. O CAR quando expresso numa célula T é capaz de redirecionar o reconhecimento de抗原 (antigénio) com base na especificidade de ligação de抗原 (antigénio). CD19 é expresso em células B malignas. A unidade de ligação de抗原 (antigénio) é fundida com um domínio intracelular de uma molécula co-estimuladora e de uma cadeia zeta que é um domínio de sinalização CD137 (4-1BB) e um domínio de sinalização CD3zeta.

Como aqui descrito, o CAR comprehende um domínio de sinalização CD137 (4-1BB). Isto é porque a presente invenção é parcialmente baseada na descoberta de que respostas de células T mediadas por CAR podem ser ainda aumentadas com a adição de domínios co-estimuladores. Por exemplo, a inclusão do domínio de sinalização CD137 (4-1BB) aumentou significativamente a atividade antitumoral e a persistência *in vivo* de células T CAR comparativamente a uma célula T CAR de outro modo idêntica não manipulada para expressar CD137 (4-1BB).

Composição

A presente invenção proporciona utilizações de células T geneticamente modificadas para expressar um recetor de抗érgio químérico (CAR) compreendendo um domínio extracelular e intracelular como aqui definido. O domínio extracelular compreende um elemento de ligação específico de alvo, de outro modo referido como uma unidade de ligação de抗érgio. O domínio intracelular ou então o domínio citoplasmático compreende, uma região de sinalização co-estimuladora e uma porção de cadeia zeta. A região de sinalização co-estimuladora refere-se a uma porção do CAR compreendendo o domínio intracelular de uma molécula co-estimuladora. As moléculas co-estimuladoras são moléculas de superfície celular diferentes de recetores de抗érgio ou seus ligandos que são requeridas para uma resposta eficiente de linfócitos ao抗érgio.

Entre o domínio extracelular e o domínio transmembranar do CAR, ou entre o domínio citoplasmático e o domínio transmembranar do CAR, pode ser aí incorporado um domínio espaçador. Como aqui usado, o termo "domínio espaçador"

significa geralmente qualquer oligo ou polipéptido que funcione para ligar o domínio transmembranar ao domínio extracelular ou ao domínio citoplasmático na cadeia polipeptídica. Um domínio espaçador pode compreender até 300 aminoácidos, de um modo preferido, 10 a 100 aminoácidos e, de um modo muito preferido, 25 a 50 aminoácidos.

Unidade de ligação de antigénio

O CAR aqui descrito compreende um elemento de ligação específico de alvo, de outro modo referido como uma unidade de ligação de antigénio.

No contexto da presente divulgação, "antigénio tumoral" ou "antigénio de distúrbio hiperproliferativo" ou "antigénio associado a um distúrbio hiperproliferativo," refere-se a antigénios que são comuns a distúrbios hiperproliferativos específicos, tais como o cancro. Os antigénios aqui discutidos são meramente incluídos a título exemplificativo. A lista não pretende ser exclusiva e mais exemplos serão facilmente evidentes aos peritos na técnica.

Os antigénios tumorais são proteínas que são produzidas por células tumorais que induzem uma resposta imune, particularmente respostas imunes mediadas por células T. Os antigénios tumorais são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, um antigénio associado a glioma, antigénio carcinoembriónico (CEA), gonadotrofina coriónica humana β , alfa-fetoproteína (AFP), AFP reativo a lectina, tireoglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, telomerase humana, transcriptase reversa, RU1, RU2 (AS), carboxil pectase intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostase, antigénio específico da próstata (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53,

prosteína, PSMA, Her2/neu, survivina e telomerase, antigénio tumoral 1 de carcinoma da próstata (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastase de neutrófilo, ephrinB2, CD22, fator de crescimento da insulina (IGF)-I, IGF-II, recetor IGF-I e mesotelina.

Os tumores malignos expressam um número de proteínas que podem servir como antigénios alvo para um ataque imune. Estas moléculas incluem, mas não estão limitadas a, antigénios específicos de tecido, tais como MART-1, tirosinase e GP 100 em melanoma e fosfatase ácida prostática (PAP) e antigénio específico da próstata (PSA) no cancro da próstata. Outras moléculas alvo pertencem ao grupo de moléculas relacionadas com a transformação, tais como o oncogene HER-2/Neu/ErbB-2. Contudo, um outro grupo de antigénios alvo são antigénios onco-fetais, tais como o antigénio carcinoembriónico (CEA). No linfoma da célula B, a imunoglobulina idiotípico específica de tumor constitui um antigénio de imunoglobulina verdadeiramente específico de tumor que é único ao tumor individual. os antigénios de diferenciação da célula B, tais como CD19, CD20 e CD37, são outros candidatos para antigénios alvo no linfoma da célula B. Alguns destes antigénios (CEA, HER-2, CD19, CD20, idiotípico) têm sido usados como alvos para imunoterapia passiva com anticorpos monoclonais com sucesso limitado.

O tipo de antigénio tumoral referido na divulgação pode também ser um antigénio específico de tumor (TSA) ou um antigénio associado a tumor (TAA). Um TSA é único para as células tumorais e não ocorre noutras células no corpo. Um antigénio associado a TAA não é único para uma célula tumoral e, pelo contrário, também é expresso numa célula normal sob condições que não induzem um estado de

tolerância imunológica ao抗原. A expressão do抗原 no tumor pode ocorrer sob condições que permitem ao sistema imunitário responder ao抗原. Os TAAs podem ser抗原 que são expressos em células normais durante o desenvolvimento fetal quando o sistema imunitário é imaturo e incapaz de responder ou podem ser抗原 que estão normalmente presentes em níveis extremamente baixos nas células normais, mas que são expressos a níveis muito mais altos em células tumorais.

Os exemplos não limitantes de抗原 TSA ou TAA incluem os seguintes:抗原 de diferenciação, tais como MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), tirosinase, TRP-1, TRP-2 e抗原 multilinhagem específicos de tumor, tais como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15;抗原 embrionários sobreexpressos, tais como CEA; oncogenes sobreexpressos e genes supressores de tumor mutados, tais como p53, Ras, HER-2/neu;抗原 tumorais únicos resultantes de translocações cromossomáticas; tais como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; e抗原 virais, tais como抗原 do vírus Epstein Barr EBVA e抗原 E6 e E7 do papilomavírus humano (HPV). Outros抗原 grandes à base de proteína, incluem TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-Met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-Catenina, CDK4, Mum-1, p15, p16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90\proteína de ligação a Mac-2\proteína associada à ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP e TPS.

Como aqui divulgado, outros抗原s incluem CD20, CD22, ROR1, Mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, MY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR e semelhantes.

Como aqui descrito, a porção da unidade de ligação de抗原 do CAR da invenção direciona-se para CD19. De um modo preferido, a porção da unidade de ligação de抗原 no CAR da invenção é scFv anti-CD19, em que a sequência de ácidos nucleicos da scFv anti-CD19 compreende a sequência apresentada em SEQ ID: 14. Alternativamente, o scFv anti-CD19 compreende a sequência de ácidos nucleicos que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 20. Numa outra forma de realização, a porção do scFv anti-CD19 do CAR da invenção compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID N°: 20.

Domínio transmembranar

No que diz respeito ao domínio transmembranar, o CAR pode ser concebido para compreender um domínio transmembranar que é fundido ao domínio extracelular do CAR. Numa forma de realização, é usado o domínio transmembranar que está associado naturalmente a um dos domínios no CAR. Em alguns casos, o domínio transmembranar pode ser selecionado ou modificado por substituição de aminoácido para evitar a ligação de tais domínios aos domínios transmembranares das mesmas ou diferentes proteínas de superfície membranar, para minimizar interações com outros membros do complexo recetor.

O domínio transmembranar pode ser derivado de uma fonte natural ou sintética. Quando a fonte é natural, o domínio pode ser derivado de qualquer proteína ligada à membrana ou

transmembranar. As regiões transmembranares de utilização particular nesta invenção podem ser derivadas (isto é, compreendem pelo menos a(s) região(ões) transmembranar(es)) da cadeia alfa, beta ou zeta do recetor de célula T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Alternativamente o domínio transmembranar pode ser sintético, em cujo o caso irá compreender resíduos predominante hidrofóbicos, tais como leucina e valina. De um modo preferido, um triplete de fenilalanina, triptofano e valina será encontrado em cada extremidade de um domínio transmembranar sintético. Opcionalmente, um pequeno ligante oligo ou polipeptídico, de um modo preferido, entre 2 e 10 aminoácidos de comprimento pode formar a ligação entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização citoplasmático do CAR. Uma duploto de glicina-serina proporciona um ligante particularmente apropriado.

De um modo preferido, o domínio transmembranar no CAR da invenção é o domínio transmembranar CD8. Numa forma de realização, o domínio transmembranar CD8 compreende a sequência de ácidos nucleicos de SEQ ID N°: 16. Numa forma de realização, o domínio transmembranar CD8 compreende a sequência de ácidos nucleicos que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 22, numa outra forma de realização, o domínio transmembranar CD8 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 22.

Em alguns casos, o domínio transmembranar do CAR da invenção compreende o domínio de charneira CD8α. Numa forma de realização, o domínio de charneira CD8 compreende a sequência de ácidos nucleicos de SEQ ID N°: 15. Numa forma de realização, o domínio de charneira CD8 compreende a sequência de ácidos nucleicos que codifica a sequência de

aminoácidos de SEQ ID N°: 21. Numa outra forma de realização, o domínio de charneira CD8 comprehende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 21.

Domínio citoplasmático

O domínio citoplasmático ou de outro modo o domínio de sinalização intracelular do CAR da invenção é responsável pela ativação de pelo menos uma das funções efetoras normais da célula imune em que 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 de auxiliar incluindo a secreção de citocinas. Assim, o termo "domínio de sinalização intracelular" refere-se à porção de uma proteína que transdus o sinal da função efetora e direciona a célula a realizar uma função especializada. Embora geralmente possa ser empregado o domínio de sinalização intracelular completo, em muitos casos não é necessário usar a cadeia inteira. Na medida em que pode ser usada uma porção truncada do domínio de sinalização intracelular, tal porção truncada pode ser usada no lugar da cadeia intacta desde que transduza o sinal da função efetora. O termo domínio de sinalização intracelular pretende assim incluir qualquer porção truncada do domínio de sinalização intracelular suficiente para transduzir o sinal da função efetora.

Os domínios de sinalização intracelular para utilização no CAR da invenção incluem as sequências citoplasmáticas do recetor de célula T (TCR) e os co-recetores que atuam em concertação para iniciar a transdução de sinal após acoplamento do recetor de antigénio, assim como qualquer

derivado ou variante destas sequências e qualquer sequência sintética que tiver a mesma capacidade funcional como aqui definida.

Sabe-se que os sinais gerados através apenas do TCR são insuficientes para a ativação completa da célula T e que é também requerido um sinal secundário ou co-estimulador. Assim, a ativação da célula T pode ser referida como sendo mediada por duas classes distintas de sequência de sinalização citoplasmática: aquelas que iniciam a ativação primária dependente de抗原 through TCR (sequências de sinalização citoplasmática primária) e aquelas que atuam de um modo independente de抗原 para proporcionar um sinal secundário ou co-estimulador (sequências de sinalização citoplasmática secundária).

As sequências de sinalização citoplasmática primária regulam a ativação primária do complexo de TCR de um modo estimulador, ou de um modo inibidor. As sequências de sinalização citoplasmática primária que atuam de um modo estimulador podem conter motivos de sinalização que são conhecidos como motivos de ativação à base de imunoreceptor de tirosina ou ITAMs.

Os exemplos de ITAM contendo sequências de sinalização citoplasmática primária que têm utilização particular incluem aqueles derivados de TCR zeta, FcR gama, FcR beta, CD3 gama, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b e CD66d. De acordo com a invenção, a molécula de sinalização citoplasmática no CAR da invenção compreende uma sequência de sinalização citoplasmática derivada de CD3 zeta.

O domínio citoplasmático do CAR comprehende o domínio de sinalização CD3-zeta combinado com uma região de sinalização co-estimuladora que se refere a uma porção do CAR comprehendendo o domínio intracelular da molécula co-estimuladora 4-1BB. Uma molécula co-estimuladora é uma molécula de superfície celular que não é um receptor de抗igeno ou seus ligandos que é requerida para uma resposta eficiente de linfócitos a um抗igeno. Os exemplos de outras talas moléculas incluem CD27, CD28, (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS,抗igeno-1 associado à função do linfócito (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, e um ligando que se liga especificamente a CD83, e semelhantes.

As sequências de sinalização citoplasmática dentro da porção de sinalização citoplasmática do CAR da invenção podem ser ligadas entre si numa ordem aleatória ou especificada. Opcionalmente, um pequeno ligante oligo ou polipeptídeo, de um modo preferido, entre 2 e 10 aminoácidos de comprimento pode formar a ligação. Um duplo de glicina-serina proporciona um ligante particularmente apropriado.

O domínio citoplasmático é concebido para compreender o domínio de sinalização CD3-zeta e o domínio de sinalização 4-1BB.

Numa forma de realização, o domínio citoplasmático no CAR da invenção é concebido para compreender o domínio de sinalização 4-1BB e o domínio de sinalização CD3-zeta, em que o domínio de sinalização 4-1BB comprehende a sequência de ácidos nucleicos apresentada em SEQ ID N°: 17 e o

domínio de sinalização CD3-zeta compreende a sequência de ácidos nucleicos apresentada em SEQ ID N°: 18.

Numa forma de realização, o domínio citoplasmático no CAR da invenção é concebido para compreender o domínio de sinalização 4-1BB e o domínio de sinalização CD3-zeta, em que o domínio de sinalização 4-1BB compreende a sequência de ácidos nucleicos que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 23 e o domínio de sinalização CD3-zeta compreende a sequência de ácidos nucleicos que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24.

Numa forma de realização, o domínio citoplasmático no CAR da invenção é concebido para compreender o domínio de sinalização 4-1BB e o domínio de sinalização CD3-zeta, em que o domínio de sinalização 4-1BB compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID N°: 23 e o domínio de sinalização CD3-zeta compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID N°: 24.

Vetores

A presente divulgação abrange uma construção de ADN compreendendo sequências de um CAR, em que a sequência compreende a sequência de ácidos nucleicos de uma unidade de ligação de抗ígeno ligada operativamente à sequência de ácidos nucleicos de um domínio intracelular, isto é, os domínios intracelulares CD3-zeta e 4-1BB.

Numa forma de realização, o CAR da invenção compreende o scFv anti-CD19, domínio transmembranar e de charneira CD8 humano, e domínios de sinalização 4-1BB e CD3zeta humanos. Numa forma de realização, o CAR da invenção compreende a

sequência de ácidos nucleicos apresentada em SEQ ID N°: 8. Numa outra forma de realização, o CAR da invenção compreende a sequência de ácidos nucleicos que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 12. Numa outra forma de realização, o CAR da invenção compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID N°: 12.

As sequências de ácidos nucleicos que codificam para as moléculas desejadas podem ser obtidas usando os métodos recombinantes conhecidos na técnica, tais como, por exemplo, por rastreio de bibliotecas a partir de células que expressam o gene, por derivação do gene a partir de um vetor conhecido para incluir o mesmo, ou por isolamento direto a partir das células e tecidos contendo o mesmo, usando técnicas padrão. Alternativamente, o gene de interesse pode ser produzido sinteticamente, em vez de clonado.

A presente divulgação também proporciona vetores em que é introduzido um ADN da presente invenção. Os vetores derivados de retrovírus, tal como o lentivírus, são ferramentas apropriadas para conseguir transferência génica a longo prazo, uma vez que permitem integração estável a longo prazo de um transgene e a sua propagação em células filhas. Os vetores lentivirais têm a vantagem adicional sobre outros vetores derivados de onco-retrovírus, tal como vírus de leucemia de murino, uma vez que podem transduzir células não proliferantes, tal como hepatócitos. Também têm a vantagem adicional da baixa imunogenicidade.

Num breve sumário, a expressão de ácidos nucleicos naturais ou sintéticos que codificam CARs é conseguida tipicamente ligando operativamente um ácido nucleico que codifica o

polipéptido do CAR ou suas porções a um promotor, e incorporando a construção num vetor de expressão. Os vetores podem ser apropriados para replicação e integração em eucariotas. 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.

As construções de expressão aqui descritas podem também ser usadas para imunização de ácidos nucleicos e terapia génica, usando protocolos padrão de transferência génica. Os métodos para transferência génica são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Pat. U.S. N° 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466. Numa outra forma de realização, a invenção proporciona um vetor de terapia génica.

O ácido nucleico pode ser clonado numa variedade de tipos de vetores. Por exemplo, o ácido nucleico pode ser clonado num vetor que inclui, mas não está limitado a, um plasmídeo, um fagomídeo, um derivado de fago, um vírus animal e um cosmídeo. Os vetores de particular interesse incluem vetores de expressão, vetores de replicação, vetores de produção de sondas e vetores de sequenciação.

Além disso, o vetor de expressão pode ser proporcionado a uma célula sob a forma de um vetor viral. A tecnologia de 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 outros manuais de virologia e biologia molecular. Os vírus, que são úteis como vetores incluem, mas não estão limitados a, retrovírus, vírus adenoides, vírus adeno-associados, vírus de herpes e lentivírus. Em geral, um

vetor apropriado contém uma origem de replicação funcional em pelo menos um organismo, uma sequência promotora, locais convenientes de restrição de endonucleases, e um ou mais marcadores selecionáveis, (por exemplo, WO 01/96584; WO 01/29058; e Pat. U.S. N° 6,326,193).

Uma variedade de sistemas à base de vírus foram desenvolvidos para transferência génica em células de mamífero. Por exemplo, os retrovírus proporcionam uma plataforma conveniente para sistemas de transferência génica. Um gene selecionado pode ser introduzido num vetor e ser empacotado em partículas retrovirais usando as técnicas conhecidas no campo técnico. O vírus recombinante pode ser depois isolado e transferido às células do indivíduo *in vivo* ou *ex vivo*. Uma variedade de sistemas retrovirais são conhecidos na técnica. Por exemplo, são usados vetores do vírus adenoide. Uma variedade de vetores do vírus adenoide são conhecidos na técnica. Numa forma de realização, são usados vetores de lentivírus.

Elementos promotores adicionais, por exemplo, intensificadores, regulam a frequência da iniciação transcripcional. Tipicamente, estes estão localizados na região 30-110 pb a montante do local de iniciação, embora tenha sido recentemente mostrado que uma variedade de promotores contêm também elementos funcionais a jusante do local de iniciação. O espaçamento entre elementos promotores é frequentemente flexível, de modo que a função promotora seja preservada quando os elementos são invertidos ou movidos relativamente entre si. No promotor da timidina cinase (tk), o espaçamento entre elementos promotores pode ser aumentado até 50 pb entre si antes que a atividade comece a diminuir. Dependendo do promotor,

parece que os elementos individuais podem funcionar cooperativamente ou independentemente para ativar a transcrição.

Um exemplo de um promotor apropriado é a sequência promotora de citomegalovírus (CMV) precoce imediata. Esta sequência promotora é uma sequência promotora constitutiva forte capaz de levar a altos níveis de expressão de qualquer sequência de polinucleótidos aí ligada operativamente. Um outro exemplo de um promotor apropriado é o Fator-1 α de Crescimento de Elongação (EF-1 α). Contudo, outras sequências promotoras constitutivas podem também ser usadas, incluindo, mas não limitadas ao, promotor precoce do vírus símio 40 (SV40), vírus do tumor mamário de murganho (MMTV), promotor da repetição terminal longa (LTR) do vírus da imunodeficiência humana (HIV), promotor de MoMuLV, um promotor do vírus da leucemia aviária, um promotor precoce imediato do vírus de Epstein-Barr, um promotor do vírus de sarcoma de Rous, assim como promotores de genes humanos, tais como, mas não limitados ao, promotor de actina, promotor de miosina, promotor de hemoglobina e promotor da creatina cinase. Além disso, a invenção não deve estar limitada à utilização de promotores constitutivos. Os promotores induzíveis estão também contemplados como parte da invenção. A utilização de um promotor induzível proporciona um interruptor molecular capaz de ligar a expressão da sequência de polinucleótidos que está operativamente ligada quando tal expressão é desejada, ou desligar a expressão quando a expressão não é desejada. Os exemplos de promotores induzíveis incluem, mas não estão limitados a, um promotor da metalotionina, um promotor glucocorticoide, um promotor de progesterona e um promotor de tetraciclina.

A fim de avaliar a expressão de um polipéptido do CAR ou suas porções, o vetor de expressão a ser introduzido numa célula pode também conter um gene marcador selecionável ou um gene repórter ou ambos, para facilitar a identificação e a seleção de células que expressam a partir da população de células que se procuram estar transfetadas ou infetadas através de vetores virais. Noutros aspetos, o marcador selecionável pode ser levado numa porção separada de ADN e ser usado num procedimento de co-transfecção. Tanto os marcadores selecionáveis como genes repórter podem ser flanqueados com sequências reguladoras apropriadas para permitir a expressão nas células hospedeiras. Os marcadores selecionáveis úteis incluem, por exemplo, genes de resistência a antibiótico, tal como neo, e semelhantes.

Os genes repórter são usados para identificar células potencialmente transfetadas e para avaliar a funcionalidade de sequências reguladoras. Em geral, um gene repórter é um gene que não esteja presente ou expresso pelo organismo ou tecido recetor e que codifica um polipéptido cuja expressão seja manifestada por alguma propriedade facilmente detetável, por exemplo, atividade enzimática. A expressão do gene repórter é ensaiada num momento apropriado após o ADN ter sido introduzido nas células recetoras. Os genes repórter apropriados podem incluir genes que codificam a luciferase, beta-galactosidase, cloranfenicol acetil transferase, fosfatase alcalina segregada ou o gene da proteína fluorescente verde (por exemplo, Ui-Tei et al., FEBS Letters 2000 479: 79-82). Os sistemas de expressão apropriados são bem conhecidos e podem ser preparados usando técnicas conhecidas ou ser obtidos comercialmente. Em geral, a construção com a região flanqueadora 5' mínima

que apresenta o nível mais elevado de expressão do gene repórter é identificada como o promotor. Tais regiões promotoras podem ser ligadas a um gene repórter e usadas para avaliar agentes pela capacidade para modular a transcrição conduzida por promotor.

Os métodos para introduzir e expressar genes numa célula são conhecidos na técnica. No contexto de um vetor de expressão, o vetor pode ser prontamente introduzido numa célula hospedeira, por exemplo, de mamífero, bacteriana, de levedura ou célula 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.

Os métodos físicos para introduzir um polinucleótido numa célula hospedeira incluem a precipitação com fosfato de cálcio, lipofecção, bombardeamento de partículas, microinjeção, electroporação, e semelhantes. Os métodos para produzir vetores compreendendo células e/ou ácidos nucleicos exógenos são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Um método preferido para a introdução de um polinucleótido numa célula hospedeira é a transfecção com fosfato de cálcio.

Os métodos biológicos para introduzir um polinucleótido de interesse numa célula hospedeira incluem a utilização de vetores de ADN e ARN. Os vetores virais, e especialmente os vetores retrovirais, tornaram-se no método mais amplamente utilizado para introduzir genes em mamíferos, por exemplo, células humanas. Outros vetores virais podem ser derivados

de lentivírus, poxvírus, vírus I de herpes simplex, vírus adenoides e vírus adeno-associados, e semelhantes. Ver, por exemplo, Pat. U.S. N° 5,350,674 e 5,585,362.

Os meios químicos para introduzir um polinucleótido numa célula hospedeira incluem sistemas de dispersão coloidal, tais como complexos de macromoléculas, nanocápsulas, microsferas, esferas e sistemas à base de lípidos, incluindo emulsões de óleo-em-água, micelas, micelas mistas e lipossomas. Um sistema coloidal exemplificativo para utilização como um veículo de transferência *in vitro* e *in vivo* é um lipossoma (por exemplo, uma vesícula de membrana artificial).

No caso em que é utilizado um sistema de transferência não-viral, um veículo de transferência exemplificativo é um lipossoma. A utilização de formulações lipídicas está contemplada para a introdução de ácidos nucleicos numa célula hospedeira (*in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*). Num outro aspeto, o ácido nucleico pode estar associado a um lípido. O ácido nucleico associado a um lípido pode ser encapsulado no interior aquoso de um lipossoma, ser intercalado dentro da bicamada lipídica de um lipossoma, ser ligado a um lipossoma através de uma molécula de ligação que está associada ao lipossoma e ao oligonucleótido, retido num lipossoma, complexado com um lipossoma, dispersado numa solução contendo um lípido, misturado com um lípido, combinado com um lípido, contido como uma suspensão num lípido, contido ou complexado com uma micela, ou então associado a um lípido. As composições associadas a lípidos, lípido/ADN ou lípido/vetor de expressão não estão limitadas a qualquer estrutura particular em solução. Por exemplo, podem estar presentes numa estrutura de bicamada, como

micelas, ou com uma estrutura "colapsada". Podem também ser simplesmente intercalados numa solução, formando possivelmente os agregados que não são uniformes em tamanho ou forma. Os lípidos são substâncias gordas que podem ser lípidos naturais ou sintéticos. Por exemplo, os lípidos incluem os corpos gordos que ocorrem naturalmente no citoplasma, assim como a classe de compostos que contêm hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa e seus derivados, tais como ácidos gordos, álcoois, aminas, aminoálcoois e aldeídos.

Os lípidos apropriados para utilização podem ser obtidos a partir de fontes comerciais. Por exemplo, a dimiristilfosfatidilcolina ("DMPC") pode ser obtida da Sigma, St Louis, MO; o fosfato de dicetilo ("DCP") pode ser obtido da K & K Laboratories (Plainview, NY); o colesterol ("Chol") pode ser obtido da Calbiochem-Behring; o dimiristilfosfatidilglicerol ("DMPG") e outros lípidos podem ser obtidos da Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). As soluções stock de lípidos em clorofórmio ou clorofórmio/metanol podem ser armazenadas a cerca de -20°C. O clorofórmio é usado como o único solvente uma vez que é mais prontamente evaporado do que o metanol. "Lipossoma" é um termo genérico que abrange uma variedade de vesículas lipídicas simples e multilamelares formadas pela geração de bicamadas lípidas fechadas ou agregados. Os lipossomas podem ser caracterizados como tendo estruturas vesiculares com uma membrana em bicamada de fosfolípido e um meio aquoso interno. Os lipossoma multilamelares têm múltiplas camadas lipídicas separadas por meio aquoso. Formam-se espontaneamente quando os fosfolípidos são suspensos em excesso de solução aquosa. Os componentes lipídicos sofrem auto-rearranjo antes da formação de estruturas fechadas e

retêm água e solutos dissolvidos entre as bicamadas lipídicas (Ghosh et al., Glycobiology 1991 5: 505-10). Contudo, as composições que têm diferentes estruturas em solução, do que a estrutura vesicular normal, estão também abrangidas. Por exemplo, os lípidos podem assumir uma estrutura micelar ou existir meramente como agregados não uniformes de moléculas lipídicas. Também estão contemplados os complexos de lipofectamina-ácidos nucleicos.

Independentemente do método usado para introduzir ácidos nucleicos exógenos numa célula hospedeira ou para, de outro modo, expor uma célula ao inibidor da presente invenção, a fim de confirmar a presença da sequência de ADN recombinante na célula hospedeira, podem ser realizados uma variedade de ensaios. Tais ensaios incluem, por exemplo, ensaios de "biologia molecular" bem conhecidos dos peritos na técnica, tal como transferência de Southern e Northern, RT-PCR e PCR; ensaios "bioquímicos", tais como a deteção da presença ou ausência de um péptido particular, por exemplo, por meios imunológicos (ELISAs e transferências de Northern) ou por ensaios aqui descritos para identificar os agentes que se enquadram no âmbito da invenção.

Fontes de células T

Antes da expansão e modificação genética das células T aqui descritas, uma fonte de células T é obtida a partir de um indivíduo. As células T podem ser obtidas de um número de fontes, incluindo células mononucleadas de sangue periférico, medula óssea, tecido de nódulo linfático, cordão umbilical, tecido do timo, tecido de um local de infecção, ascite, efusão pleural, tecido do baço e tumores. Como aqui descrito, pode ser usado qualquer número de

linhas de células T disponíveis na técnica. As células T podem ser obtidas de uma unidade de sangue recolhida de um indivíduo, usando qualquer número de técnicas conhecidas do perito na técnica, tal como separação com Ficoll™. As células de sangue circulante de um indivíduo são obtidas por aférese. O produto da aférese contém tipicamente linfócitos, incluindo células T, monócitos, granulócitos, células B, outros glóbulos brancos nucleados, glóbulos vermelhos e plaquetas. As células recolhidas por aférese podem ser lavadas para remover a fração plasmática e para colocar as células num tampão ou meio apropriado para subsequentes etapas de processamento. As células são lavadas com o soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS). Alternativamente, a solução de lavagem não tem cálcio e pode não ter magnésio ou pode não ter muitos, se não todos, os catiões divalentes. Mais uma vez, surpreendentemente, etapas iniciais de ativação na ausência de cálcio conduziram a ativação ampliada. Como os peritos com conhecimentos gerais na técnica prontamente entenderiam, uma etapa de lavagem pode ser realizada por métodos conhecidos por aqueles no campo técnico, tais como por utilização de uma centrifugadora "flow-through" semi-automática (por exemplo, o processador celular Cobe 2991, o Baxter CytoMate, ou o Haemonetics Cell Saver 5) de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem, as células podem ser ressuspensas numa variedade de tampões biocompatíveis, tais como, por exemplo, PBS sem Ca^{2+} , sem Mg^{2+} , 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 em meio de cultura.

Como aqui descrito, as células T são isoladas a partir de linfócitos de sangue periférico por lise dos glóbulos vermelhos e esgotando os monócitos, por exemplo, através de centrifugação com um gradiente de PERCOLL™ ou por elutrição centrífuga de contracorrente. Uma subpopulação específica de células T, tais como células T CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ e CD45RO+, pode ser ainda isolada por técnicas de seleção positiva ou negativa. Por exemplo, as células T são isoladas por incubação com esferas conjugadas com anti-CD3/anti-CD28 (isto é, 3x28), tal como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante um período de tempo suficiente para a seleção positiva das células T desejadas, por exemplo, o período de tempo é cerca de 30 minutos, o período de tempo varia de 30 minutos a 36 horas ou mais, e todos os números inteiros entre os mesmos, o período de tempo é pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 horas, o período de tempo é 10 a 24 horas, ou o período de tempo de incubação é 24 horas. Para isolamento de células T a partir de doentes com leucemia, a utilização de tempos mais longos de incubação, tal como 24 horas, pode aumentar o rendimento celular. Tempos mais longos de incubação podem ser usados para isolar células T em qualquer situação em que existam poucas células T em relação a outros tipos de células, tal como ao isolar linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) de tecido tumoral ou de indivíduos imune-comprometidos. Além disso, a utilização de tempos mais longos de incubação pode aumentar a eficiência da captação de células T CD8+. Assim, simplesmente por encurtamento ou alongamento do tempo, as células T são deixadas ligar às esferas CD3/CD28 e/ou ao aumentar ou diminuir a razão de esferas para células T (como ainda descrito aqui), subpopulações de células T podem ser preferencialmente selecionadas a favor ou em detrimento na iniciação da cultura ou outros pontos do

tempo durante o processo. Adicionalmente, ao aumentar ou diminuir a razão de anticorpos anti-CD3 e/ou anti-CD28 nas esferas ou noutra superfície, subpopulações de células T podem ser preferencialmente selecionadas a favor ou em detrimento na iniciação da cultura ou outros pontos do tempo desejados. O perito na técnica reconhecerá que podem também ser usadas múltiplas rondas de seleção. Pode ser desejável realizar o procedimento de seleção e usar as células "não selecionadas" no processo de ativação e expansão. As células "não selecionadas" podem também ser sujeitas a rondas adicionais de seleção.

O enriquecimento de uma população de células T por seleção negativa pode ser realizado com uma combinação de anticorpos dirigidos para marcadores de superfície únicos nas células negativamente selecionadas. Um método é triagem de células e/ou seleção através de imunoaderência magnética negativa ou citometria de fluxo que usa um cocktail de anticorpos monoclonais dirigidos a marcadores de superfície celular presentes nas células negativamente selecionadas. Por exemplo, para enriquecer em células CD4⁺ por seleção negativa, um cocktail de anticorpos monoclonais inclui tipicamente anticorpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR e CD8. Pode ser desejável enriquecer ou selecionar positivamente para células T reguladoras que expressam tipicamente CD4⁺, CD25+, CD62L^{hi}, GITR+ e FoxP3+. Alternativamente, as células T reguladoras são empobrecidas por esferas conjugadas com anti-C25 ou outro método de seleção semelhante.

Para o isolamento de uma população desejada de células por seleção positiva ou negativa, a concentração de células e a superfície (por exemplo, partículas tal como esferas) podem

ser variadas. Pode ser desejável diminuir significativamente o volume em que as esferas e as células são misturadas juntamente (isto é, aumentar a concentração de células), para assegurar o contacto máximo das células e das esferas. Por exemplo, é usada uma concentração de 2 mil milhões de células/mL, é usada uma concentração de mil milhões de células/mL, são usadas mais de 100 milhões de células/mL, é usada uma concentração de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 milhões de células/mL, é usada uma concentração de células de 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 milhões de células/mL ou podem ser usadas concentrações de 125 ou 150 milhões de células/mL. Usar altas concentrações pode resultar em rendimento celular, ativação celular e expansão celular aumentados. Além disso, a utilização de altas concentrações celulares permite uma captação mais eficiente das células que podem expressar pobemente抗igénios alvo de interesse, tal como células T negativas para CD28, ou de amostras onde estão presentes muitas células tumorais (isto é, sangue leucémico, tecido tumoral, etc.). Tais populações de células podem ter valor terapêutico e seriam desejáveis de obter. Por exemplo, usar alta concentração de células permite uma seleção mais eficiente das células T CD8⁺ que têm normalmente uma expressão mais fraca de CD28.

Pode ser desejável usar concentrações mais baixas de células. Ao diluir significativamente a mistura de células T e superfície (por exemplo, partículas tal como esferas), as interações entre partículas e células são minimizadas. Esta seleciona para células que expressam quantidades altas de抗igénios desejados a serem ligados às partículas. Por exemplo, as células T CD4⁺ expressam níveis mais altos de CD28 e são capturadas mais eficientemente do que células T

CD8⁺ em concentrações diluídas, por exemplo, a concentração de células usada é 5 X 10⁶/mL, ou a concentração usada pode ser de cerca de 1 X 10⁵/mL a 1 X 10⁶/mL, e qualquer valor inteiro entre os mesmos.

Noutras formas de realização, as células podem ser incubadas num rotador durante tempos variáveis a velocidades variáveis a 2-10°C ou à temperatura ambiente.

As células T para estimulação podem também ser congeladas após uma etapa de lavagem. Sem se pretender estar limitado pela teoria, o congelamento e a subsequente etapa de descongelação proporciona um produto mais uniforme ao remover granulócitos e, até certa medida, monócitos na população celular. Após a etapa de lavagem que remove plasma e plaquetas, as células podem ser suspensas numa solução de congelação. Embora muitas soluções e parâmetros de congelação sejam conhecidos na técnica e serão úteis neste contexto, um método envolve usar PBS contendo 20% de DMSO e 8% de albumina de soro humano, ou meio de cultura contendo 10% de dextrano 40 e 5% de dextrose, 20% de albumina de soro humano e 7,5% de DMSO, ou 31,25% de Plasmalyte-A, 31,25% de dextrose 5%, 0,45% de NaCl, 10% de dextrano 40 e 5% de dextrose, 20% de albumina de soro humano e 7,5% de DMSO ou outros meios de congelação celular apropriados contendo, por exemplo, Hespan e PlasmaLyte A, as células são depois congeladas a -80°C a uma taxa de 1° por minuto e armazenadas na fase de vapor de um tanque de armazenamento do azoto líquido. Outros métodos de congelação controlada podem ser usados, assim como congelação não controlada imediatamente a -20°C ou em azoto líquido.

As células criopreservadas são descongeladas e lavadas como aqui descrito e deixadas a descansar durante uma hora à temperatura ambiente, antes da ativação usando os métodos da presente invenção.

Como aqui descrito, as células T podem ser expandidas, congeladas e usadas mais tarde. Como aqui descrito, as amostras são recolhidas de um doente imediatamente após o diagnóstico de uma doença particular como aqui descrita, mas antes de quaisquer tratamentos. As células são isoladas de uma amostra de sangue ou de uma aférese de um indivíduo antes de qualquer número de modalidades de tratamento relevantes, incluindo, mas não limitadas a, tratamento com agentes, tais como natalizumab, efalizumab, agentes antivirais, quimioterapia, radiação, agentes imunossupressores, tais como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato e FK506, anticorpos, ou outros agentes imunoablativos, tais como CAMPATH, anticorpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiação. Estes fármacos inibem a fosfatase dependente de cálcio calcineurina (ciclosporina e FK506) ou inibem a p70S6 cinase que é importante para a sinalização induzida por fator de crescimento (rapamicina) (Liu *et al.*, Cell 66:807-815, 1991; Henderson *et al.*, Immun. 73:316-321, 1991; Bierer *et al.*, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). As células são isoladas de um doente e congeladas para uso posterior conjuntamente com (por exemplo, antes, simultaneamente ou após) transplantação de célula estaminal ou medula óssea, terapia ablativa de célula T usando agentes quimioterapêuticos, tais como fludarabina, radioterapia de feixe externo (XRT), ciclofosfamida ou anticorpos, tais como OKT3 ou CAMPATH. Como aqui descrito, as células são isoladas antes e podem ser congeladas para

uso posterior para tratamento após terapia ablativa de célula B, tal como agentes que reagem com CD20, por exemplo, Rituxan.

Também como aqui divulgado, as células T são obtidas de um doente diretamente após o tratamento. A este respeito, observou-se que após determinados tratamentos contra o cancro, em particular tratamentos com fármacos que danificam o sistema imunitário, imediatamente após o tratamento durante o período quando os doentes normalmente estariam a recuperar do tratamento, a qualidade das células T obtidas pode ser ótima ou melhorada pela sua capacidade de expandirem *ex vivo*. Igualmente, após manipulação *ex vivo* usando os métodos aqui descritos, estas células podem estar num estado preferido para o enxerto melhorado e expansão *in vivo*. Assim, está contemplado dentro do contexto da presente invenção recolher glóbulos, incluindo células T, células dendríticas, ou outras células da linhagem hematopoiética, durante esta fase de recuperação. Além disso, a mobilização (por exemplo, mobilização com GM-CSF) e regimes de condicionamento podem ser usados para criar um estado num indivíduo em que a repopulação, recirculação, regeneração e/ou expansão de tipos particulares de células é favorecida, especialmente durante uma janela definida de tempo após terapia. Os tipos ilustrativos de células incluem células T, células B, células dendríticas e outras células do sistema imunitário.

Ativação e expansão de células T

Quer seja antes ou depois de modificação genética das células T para expressarem um CAR desejável, as células T podem ser ativadas e expandidas usando em termos gerais os

métodos como descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; e Publicação de Pedido de Patente U.S. N° 20060121005.

Em geral, as células T aqui descritas são expandidas por contacto com uma superfície que tem aí ligado um agente que estimula um sinal associado ao complexo CD3/TCR e um ligando que estimula uma molécula co-estimuladora na superfície das células T. Em particular, populações de células T podem ser estimuladas como aqui descrito, tal como por contacto com um anticorpo anti-CD3, ou um seu fragmento de ligação a抗ígenio, ou por um anticorpo anti-CD2 imobilizado numa superfície, ou por contacto com um ativador da proteína cinase C (por exemplo, briostatina) conjuntamente com um ionófero de cálcio. Para co-estimulação de uma molécula acessória na superfície de células T, é usado um ligando que se liga à molécula acessória. Por exemplo, uma população de células T pode ser contactada com um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28, sob condições apropriadas para estimulação da proliferação de células T. Para estimular a proliferação de células T CD4⁺ ou células T CD8⁺, um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28. Os exemplos que podem ser usados de um anticorpo anti-CD28 incluem 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, França) como podem outros métodos genericamente conhecidos na técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30(8): 3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. MED. 190(9): 13191328, 1999; Haanen et al., J. Immunol Meth. 227 (1-2): 53-63, 1999).

O sinal estimulador primário e o sinal co-estimulador para a célula T podem ser proporcionados por protocolos diferentes. Por exemplo, os agentes que proporcionam 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 superfícies separadas (isto é, em formação "trans"). Alternativamente, um agente pode ser acoplado a uma superfície e o outro agente em solução. Por exemplo, o agente que proporciona o sinal co-estimulador está ligado a uma superfície celular e o agente que proporciona o sinal de ativação primária está em solução ou está acoplado a uma superfície, ou ambos os agentes podem estar em solução. Alternativamente, os agentes podem estar na forma solúvel, e depois reticulados a uma superfície, tais como receptores Fc que expressam uma célula ou um anticorpo ou outro agente de ligação que se irá ligar aos agentes. A este respeito, ver, por exemplo, as Publicações de Pedidos de Patente U.S. N° 20040101519 e 20060034810 para células apresentadoras de抗igénio artificiais (aAPCs) que estão contempladas para utilização na ativação e expansão de células T.

Como aqui divulgado, os dois agentes estão imobilizados em esferas, na mesmo esfera, isto é, "cis", ou em esferas separadas, isto é, "trans". A título de exemplo, o agente que proporciona o sinal de ativação primária é um anticorpo anti-CD3 ou um seu fragmento de ligação a抗igénio e o agente que proporciona o sinal co-estimulador é um anticorpo anti-CD28 ou um seu fragmento de ligação a抗igénio; e ambos os agentes estão co-imobilizados na mesma esfera em quantidades moleculares equivalentes. Por exemplo, é usada uma razão de 1:1 de cada anticorpo ligado às esferas para a expansão de célula T CD4⁺ e crescimento

de célula T. Em determinados exemplos, uma razão de anticorpos anti CD3:CD28 ligados às esferas é usada de modo que um aumento na expansão da célula T seja observada comparativamente à expansão observada usando uma razão de 1:1. Um aumento de cerca de 1 a cerca de 3 vezes é observado comparativamente à expansão observada usando uma razão de 1:1. A razão de anticorpo CD3:CD28 ligado às esferas varia de 100:1 a 1:100 e todos os valores inteiros entre os mesmos. Num exemplo, mais anticorpo anti-CD28 está ligado às partículas do que anticorpo anti-CD3, isto é, a razão de CD3:CD28 é menor que um. Em determinados exemplos, a razão de anticorpo anti-CD28 para anticorpo anti-CD3 ligado às esferas é maior que 2:1. Por exemplo, é usada uma razão CD3:CD28 de 1:100 de anticorpo ligado às esferas, é usada uma razão CD3:CD28 de 1:75 de anticorpo ligado às esferas, é usada uma razão CD3:CD28 de 1:50 de anticorpo ligado às esferas, é usada uma razão CD3:CD28 de 1:30 de anticorpo ligado às esferas, é usada uma razão CD3:CD28 de 1:10 de anticorpo ligado às esferas ou é usada uma razão CD3:CD28 de 1:3 de anticorpo ligado às esferas. Alternativamente, é usada uma razão CD3:CD28 de 3:1 de anticorpo ligado às esferas.

Razões de partículas para células de 1:500 a 500:1 e de quaisquer valores inteiros entre as mesmas podem ser usadas para estimular células T ou outras células alvo. Como os peritos com conhecimentos gerais na técnica podem prontamente entender, a razão de partículas para células pode depender do tamanho de partícula relativamente à célula alvo. Por exemplo, as esferas de tamanho pequeno podem apenas ligar algumas células, enquanto as esferas maiores podem ligar muitas. Pode também ser usada para estimular células T uma razão de células para partículas

que varia de 1:100 a 100:1 e quaisquer valores inteiros entre as mesmas e, em formas de realização adicionais, a razão compreende 1:9 a 9:1 e quaisquer valores inteiros entre as mesmas. A razão de partículas acopladas a anti-CD3 e anti-CD28 para células T que resultam em estimulação da célula T pode variar como acima assinalado, contudo determinados valores preferidos incluem 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 e 15:1, sendo uma razão preferida pelo menos 1:1 partículas por célula T. Alternativamente, é usada uma razão de partículas para células de 1:1 ou menos. Uma razão partícula:célula preferida é 1:5. A razão de partículas para células pode ser variada dependendo do dia de estimulação. Por exemplo, a razão de partículas para células é de 1:1 a 10:1 no primeiro dia e partículas adicionais são adicionadas às células todos os dias ou dia sim dia não posteriormente até 10 dias, a razões finais de 1:1 a 1:10 (com base em contagens celulares no dia da adição). Alternativamente, a razão de partículas para células é 1:1 no primeiro dia da estimulação e ajustada a 1:5 no terceiro e quinto dia da estimulação. Num outro exemplo, as partículas são adicionadas diariamente ou dia sim dia não para uma razão final de 1:1 no primeiro dia, e 1:5 no terceiro e quinto dia da estimulação. Num outro exemplo, a razão de partículas para células é 2:1 no primeiro dia da estimulação e ajustada a 1:10 no terceiro e quinto dia da estimulação. Num outro exemplo, as partículas são adicionadas diariamente ou dia sim, dia não para uma razão final de 1:1 no primeiro dia, e 1:10 no terceiro e quinto dia da estimulação. Um perito na técnica entenderá que uma variedade de outras razões pode ser apropriada para utilização na presente invenção. Em particular, as razões

irão variar dependendo do tamanho de partícula e no tamanho e tipo de célula.

Também como aqui descrito, as células, tal como células T, são combinadas com esferas revestidas de agente, as esferas e as células são subsequentemente separadas, e depois as células são cultivadas. Numa alternativa, antes da cultura, as esferas revestidas de agente e as células não são separadas mas são cultivadas juntamente. Num caso adicional, as esferas e as células são concentradas primeiramente por aplicação de uma força, tal como uma força magnética, resultando em ligação aumentada de marcadores de superfície celular, induzindo assim estimulação celular.

A título de exemplo, as proteínas de superfície celular podem ser ligadas ao deixar esferas paramagnéticas a que estão ligados anti-CD3 e anti-CD28 (esferas 3x28) contactar células T. Numa forma de realização, as células (por exemplo, 10^4 a 10^9 células T) e as esferas (por exemplo, esferas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T a uma razão de 1:1) são combinadas num tampão, de um modo preferido PBS (sem catiões divalentes, tais como, cálcio e magnésio). Além disso, os peritos com conhecimentos gerais na técnica podem prontamente entender que pode ser usada qualquer concentração celular. Por exemplo, a célula alvo pode ser muito rara na amostra e compreender apenas 0,01% da amostra ou a amostra inteira (isto é, 100%) pode compreender a célula alvo de interesse. Desta forma, qualquer número de células está dentro do contexto da presente invenção. Pode ser desejável diminuir significativamente o volume em que as partículas e as células são misturadas juntamente (isto é, aumenta a

concentração das células), para garantir contacto máximo de células e partículas. Por exemplo, é usada uma concentração de cerca de 2 mil milhões de células/mL. Num outro exemplo, são usados mais de 100 milhões de células/mL. Num exemplo adicional, é usada uma concentração de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 milhões de células/mL. Ainda num outro exemplo, é usada uma concentração de células de 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 milhões de células/mL. Em exemplos adicionais, podem ser usadas concentrações de 125 ou 150 milhões de células/mL. Usar altas concentrações pode resultar em rendimento celular, ativação celular e expansão celular aumentados. Além disso, a utilização de altas concentrações celulares permite uma captação mais eficiente das células que podem expressar pobemente抗igénios alvo de interesse, tal como células T negativas para CD28. Tais populações de células podem ter valor terapêutico e seriam desejáveis de obter em determinadas formas de realização. Por exemplo, usar alta concentração de células permite uma seleção mais eficiente das células T CD8⁺ que têm normalmente uma expressão mais fraca de CD28.

A mistura pode ser cultivada durante várias horas (cerca de 3 horas) até cerca de 14 dias ou qualquer valor inteiro horário entre as mesmas. A mistura pode ser cultivada durante 21 dias. Num exemplo, as esferas e as células T são cultivadas juntamente durante cerca de oito dias. Num outro exemplo, as esferas e as células T são cultivadas juntamente durante 2-3 dias. Também podem ser desejados diversos ciclos de estimulação de modo que o tempo de cultura das células T possa ser 60 dias ou mais. Condições apropriadas para a cultura de células T incluem um meio apropriado (por exemplo, Meios Essencial Mínimo ou meio RPMI 1640 ou, X-vivo 15, (Lonza)) que podem 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, TGF β e TNF- α ou quaisquer outros aditivos para o crescimento de células conhecidos do perito na técnica. Outros aditivos para o crescimento de células incluem, mas não estão ligados a, tensioativo, plasmanato, e agentes redutores, tais como N-acetil-cisteína e 2-mercaptoethanol. O meio podem incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 e X-Vivo 20, Optimizer, com aminoácidos, piruvato de sódio e vitaminas adicionados, sem soro ou suplementado com uma quantidade apropriada de soro (ou plasma) ou um conjunto definido de hormonas, e/ou uma quantidade de citocina(s) suficiente para o crescimento e expansão de células T. Antibióticos, por exemplo, penicilina e estreptomicina, são incluídos apenas em culturas experimentais, não em culturas de células que são para serem infundidas num indivíduo. As células alvo são mantidas sob condições necessárias para suportar o crescimento, por exemplo, uma temperatura (por exemplo, 37° C) e atmosfera (por exemplo, ar mais 5% de CO₂) apropriadas.

As células T que foram expostas aos tempos de estimulação variados podem apresentar características diferentes. Por exemplo, o sangue típico ou os produtos celulares mononucleados sujeitos a aférese de sangue periférico têm uma população de células T auxiliares (T_H, CD4 $^{+}$) que é maior do que a população de células T citotóxicas ou supressoras (T_C, CD8 $^{+}$). A expansão *ex vivo* de células T por estimulação de receptores CD3 e CD28 produz uma população das células T que antes de cerca dos dias 8-9 consiste predominantemente em células T_H, quando após cerca de 8-9

dias, a população de células T compreende uma população cada vez mais maior de células T_C . Desta forma, dependendo da finalidade do tratamento, a infusão de um indivíduo com uma população de células T compreendendo predominantemente células T_H pode ser vantajosa. De modo semelhante, se um subconjunto específico de抗énio de células T_C foi isolado, pode ser benéfico expandir este subconjunto em maior grau.

Além disso, para além dos marcadores CD4 e CD8, outros marcadores fenotípicos variam significativamente, mas em grande parte, de forma reprodutível durante o processo de expansão celular. Assim, tal reprodutibilidade permite a capacidade para adaptar um produto de células T ativadas para finalidades específicas.

Aplicação terapêutica

É aqui descrita uma célula (por exemplo, célula T) transduzida com um vetor lentiviral (LV). Por exemplo, o LV codifica um CAR que combine um domínio de reconhecimento de抗énio de um anticorpo específico com um domínio intracelular CD3-zeta e 4-1BB. Consequentemente, em alguns casos, a célula T transduzida pode induzir uma resposta de célula T mediada por CAR.

A invenção proporciona a utilização de um CAR como definido nas reivindicações para redirecionar a especificidade de uma célula T primária para um抗énio tumoral. Assim, é também aqui divulgado um método para estimular uma resposta

imune mediada por células T para uma população de células alvo ou tecido num mamífero compreendendo a etapa de administrar ao mamífero uma célula T que expressa um CAR, em que o CAR compreende uma unidade de ligação que interage especificamente com um alvo predeterminado, uma porção de cadeia zeta compreendendo, por exemplo, o domínio intracelular de CD3zeta humano, e uma região de sinalização co-estimuladora.

É aqui divulgado um tipo de terapia celular em que as células T são geneticamente modificadas para expressar um CAR e a célula T CAR é infundida num recetor com a sua necessidade. A célula infundida é capaz de matar células tumorais no recetor. Pelo contrário de terapias de anticorpo, as células T CAR são capazes de replicar *in vivo* resultando em persistência a longo prazo que pode conduzir a controlo tumoral sustentado.

As células T CAR aqui descritas podem sofrer expansão robusta de células T *in vivo* e podem persistir durante uma quantidade de tempo prolongada. Numa outra forma de realização, as células T CAR aqui descritas evoluem para células T de memória específicas que podem ser reativadas para inibir qualquer formação ou crescimento tumoral adicional. Por exemplo, era inesperado que as células CAR19 aqui descritas pudessesem sofrer expansão robusta de células T *in vivo* e persistir em altos níveis durante uma quantidade prolongada de tempo no sangue e medula óssea e formar células T de memória específicas. Sem se pretender estar limitado por qualquer teoria particular, as células T CAR podem diferenciar-se *in vivo* num estado tipo memória central após encontro e subsequente eliminação de células alvo que expressam o antigénio substituto.

Sem se pretender estar limitado por qualquer teoria particular, a resposta imunitária antitumoral induzida pelas células T modificadas por CAR pode ser uma resposta imune ativa ou passiva. Além disso, a resposta imune mediada por CAR pode ser parte de uma abordagem de imunoterapia adotiva em que células T modificadas por CAR induzem uma resposta imune específica para a unidade de ligação de抗ígeno no CAR. Por exemplo, as células CART19 induzem uma resposta imune específica contra células que expressam CD19.

Embora os dados aqui divulgados divulgue especificamente um vetor lentiviral compreendendo scFv anti-CD19 derivado do anticorpo monoclonal FMC63 de murino, domínio transmembranar e de charneira CD8 α humano, e domínios de sinalização 4-1BB e CD3zeta humanos, a invenção deve ser interpretada para incluir qualquer número de variações para cada um dos componentes da construção como aqui descrita noutra parte.

Os cancros que podem ser tratados incluem tumores que não são vascularizados, ou ainda não substancialmente vascularizados, assim como tumores vascularizados. Os cancros podem compreender tumores não-sólidos (tal como tumores hematológicos, por exemplo, leucemia e linfomas) ou podem compreender tumores sólidos. Os tipos de cancros a serem tratados com os CARs da invenção incluem, mas não estão limitados a, carcinoma, blastoma e sarcoma, e determinadas leucemias ou malignidades linfoides, tumores benignos e malignos, e malignidades, por exemplo, sarcomas, carcinomas e melanomas. Estão também incluídos tumores/cancros de adultos e tumores/cancros pediátricos.

Os cancros hematológicos são cancros do sangue ou da medula óssea. Os exemplos de cancros hematológicos (ou hematógenos) incluem leucemias, incluindo leucemias agudas (tais como a leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda e mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica e eritroleucemia), leucemias crónicas (tais como leucemia (granulocítica) mielocítica crónica, leucemia mielógena crónica e leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, doença de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin (formas indolentes e de alto grau), mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, doença da cadeia pesada, síndrome mielodisplásica, leucemia de célula pilosa e mielodisplasia.

Os tumores sólidos são massas anómalas de tecido que geralmente não contém quistos ou áreas líquidas. Os tumores sólidos podem ser benignos ou malignos. Os diferentes tipos de tumores sólidos são denominados pelo tipo de células que os formam (tais como sarcomas, carcinomas e linfomas). Os exemplos de tumores sólidos, tais 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, cancro do pâncreas, cancro da mama, cancros pulmonares, cancro do ovário, cancro da próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma da célula escamosa, carcinoma da célula basal, adenocarcinoma, carcinoma da glândula de suor, carcinoma medular da tiroide, carcinoma papilar da tiroide, feocromocitomas carcinoma da glândula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma da

célula renal, hepatoma, carcinoma do ducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cancro do colo do útero, tumor testicular, seminoma, carcinoma da bexiga, melanoma e tumores do SNC (tais como um glioma (tal como glioma do tronco cerebral e gliomas mistos), glioblastoma (também conhecido como glioblastoma multiforme), astrocitoma, linfoma do SNC, germinoma, meduloblastoma, craniofaringioma de schwanoma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendrogioma, menangioma, neuroblastoma, retinoblastoma e metástases cerebrais).

O CAR concebido para direcionar CD19 pode ser usado para tratar cancros e distúrbios que incluem, mas não estão limitados a, pré-B ALL (indicação pediátrica), ALL de adulto, linfoma de células do manto, linfoma de células B grandes difusas, transplantação de medula óssea alógénica pós-salvamento, e semelhantes.

As células T modificadas por CAR aqui descritas podem também servir como um tipo de vacina para imunização *ex vivo* e/ou terapia *in vivo* num mamífero. De um modo preferido, o mamífero é um ser humano.

No que diz respeito à imunização *ex vivo*, pelo menos uma das seguintes ocorre *in vitro* antes de administrar a célula a um mamífero: i) expansão das células, ii) introdução de um ácido nucleico que codifica um CAR às células, e/ou iii) criopreservação das células.

Os procedimentos *ex vivo* são bem conhecidos na técnica e são discutidos mais integralmente abaixo. Resumidamente, as células são isoladas de um mamífero (de um modo preferido, um ser humano) e geneticamente modificadas (isto é,

transduzidas ou transfetadas *in vitro*) com um vetor que expressa um CAR aqui divulgado. A célula modificada por CAR pode ser administrada a um recetor mamífero para proporcionar um benefício terapêutico. O recetor mamífero pode ser um ser humano e a célula modificada por CAR pode ser autóloga relativamente ao recetor. Alternativamente, as células podem ser alogénicas, singénicas ou xenogénicas relativamente ao recetor.

O procedimento para expansão *ex vivo* de células progenitoras e estaminais hematopoiéticas é descrito em Pat. U.S. N° 5,199,942, e pode ser aplicado a células da presente invenção. Outros métodos apropriados são conhecidos na técnica, consequentemente a presente invenção não está limitada a qualquer método particular de expansão *ex vivo* das células. Resumidamente, a cultura *ex vivo* e a expansão de células T compreende: (1) recolher células progenitoras e estaminais hematopoiéticas CD34+ de um mamífero a partir de colheita de sangue periférico e de explantes de medula óssea; e (2) expandir tais células *ex vivo*. Para além dos fatores de crescimento celulares descritos na Pat. U.S. N° 5,199,942, outros fatores, tais como flt3-L, IL-1, IL-3 e ligando c-kit, podem ser usados para o cultivo e expansão das células.

Para além da utilização de uma vacina à base de células em termos de imunização *ex vivo*, a presente divulgação também proporciona composições e métodos para imunização *in vivo* para induzir uma resposta imune dirigida contra um抗ígeno num doente.

Em geral, as células ativadas e expandidas como aqui descritas podem ser utilizadas no tratamento e prevenção de

doenças que surgem em indivíduos imunocomprometidos. Em particular, as células T modificadas por CAR aqui descritas são usadas no tratamento de CCL. Em determinadas formas de realização, as células aqui descritas são usadas no tratamento de doentes em risco de desenvolver CCL. Assim, a presente divulgação proporciona o tratamento ou prevenção de CCL compreendendo administrar a um indivíduo com a sua necessidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz das células T modificadas por CAR da invenção.

As células T modificadas por CAR aqui descritas podem ser administradas isoladamente, ou como uma composição farmacêutica em combinação com diluentes e/ou com outros componentes, tais como IL-2 ou outras citocinas ou populações celulares. Resumidamente, as composições farmacêuticas aqui descritas podem compreender uma população de células alvo como aqui descritas, em combinação com um ou mais veículos, diluentes ou excipientes farmaceuticamente ou fisiologicamente aceitáveis. Tais composições podem compreender tampões, tal como soro fisiológico tamponado neutro, soro fisiológico tamponado com fosfato e semelhantes; hidratos de carbono, tais como glicose, manose, sacarose ou dextrano, manitol; proteínas; polipeptídos ou aminoácidos, tais como glicina; antioxidantes; agentes quelantes, tais como EDTA ou glutationo; adjuvantes (por exemplo, hidróxido de alumínio); e conservantes. As composições aqui descritas são formuladas, de um modo preferido, para administração intravenosa.

As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser administradas de um modo apropriado à doença a ser tratada (ou prevenida). A quantidade e a frequência de

administração serão determinadas por fatores como o estado do doente, e tipo e gravidade da doença do doente, embora dosagens apropriadas possam ser determinadas por ensaios clínicos.

Quando "uma quantidade imunologicamente eficaz", "uma quantidade eficaz antitumoral", "uma quantidade eficaz de inibição tumoral" ou "uma quantidade terapêutica" é indicada, a quantidade precisa das composições da presente invenção a ser administrada pode ser determinada por um médico tendo em consideração as diferenças individuais em idade, peso, tamanho do tumor, extensão da infecção ou metástases, e estado do doente (indivíduo). Pode-se geralmente indicar que uma composição farmacêutica compreendendo as células T aqui descritas pode ser administrada a uma dosagem de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, de um modo preferido, 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluindo todos os valores inteiros dentro daquelas gamas. As composições de célula T podem também ser administradas múltiplas vezes nestas dosagens. As células podem ser administradas usando técnicas de infusão que são habitualmente conhecidas em imunoterapia (ver, por exemplo, Rosenberg et al., New England J. of MED. 319:1676, 1988). A dosagem e o regime de tratamento ótimos para um doente particular podem ser prontamente determinados pelo perito na técnica médica através de monitorização do doente para sinais de doença e ajustando o tratamento em conformidade.

Pode ser desejado administrar células T ativadas a um indivíduo e depois voltar a retirar sangue (ou realizar uma aférese), ativar células T daí obtidas de acordo com a presente invenção, e reinfundir o doente com estas células T ativadas e expandidas. Este processo pode ser realizado

múltiplas vezes todas as semanas. As células T podem ser ativadas a partir de recolhas de sangue de 10cc a 400cc, por exemplo, as células T são ativadas a partir de recolhas de sangue de 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc ou 100cc. Sem se pretender estar limitado pela teoria, este protocolo de múltiplas recolhas de sangue/múltiplas reinfusões pode servir para eliminar determinadas populações de células T.

A administração das composições em causa pode ser realizada em qualquer modo conveniente, incluindo por inalação de aerossol, injeção, ingestão, transfusão, implantação ou transplantação. As composições aqui descritas podem ser administradas a um doente subcutaneamente, intradermicamente, intratumoralmente, intranodalmente, intramedularmente, intramuscularmente, por injeção intravenosa (i.v.) ou intraperitonealmente. Por exemplo, as composições de células T aqui descritas são administradas a um doente por injeção intradérmica ou subcutânea. Num outro exemplo, as composições de células T aqui descritas são administradas, de um modo preferido, por injeção i.v. As composições de células T podem ser injetadas diretamente num tumor, nódulo linfático ou local de infecção.

Em determinados exemplos, as células ativadas e expandidas usando os métodos aqui descritos, ou outros métodos conhecidos na técnica em que as células T são expandidas a níveis terapêuticos, são administradas a um doente conjuntamente com (por exemplo, antes, simultaneamente ou após) qualquer número de modalidades de tratamento relevantes, incluindo, mas não limitadas a, tratamento com agentes, tais como terapia antiviral, cidofovir e interleucina-2, tratamento com Citarabina (também conhecida

como ARA-C) ou natalizumab para doentes de esclerose múltipla ou tratamento com efalizumab para doentes de psoriase ou outros tratamentos para doentes de PML. Também aqui divulgado, as células T da invenção podem ser usadas em combinação com quimioterapia, radiação, agentes imunossupressores, tais como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato e FK506, anticorpos, ou outros agentes imunoablativos, tais como CAM PATH, anticorpos anti-CD3 ou outras terapias de anticorpo, citoxina, fludaribina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiação. Estes fármacos inibem a fosfatase dependente de cálcio calcineurina (ciclosporina e FK506) ou inibem a p70S6 cinase que é importante para a sinalização induzida por fator de crescimento (rapamicina) (Liu *et al.*, Cell 66:807-815, 1991; Henderson *et al.*, Immun. 73:316-321, 1991; Bierer *et al.*, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). Também aqui divulgado, as composições celulares da presente invenção são administradas a um doente conjuntamente com (por exemplo, antes, simultaneamente ou após) transplantação de medula óssea, terapia ablativa de célula T usando agentes quimioterapêuticos, tal como, fludarabina, radioterapia de feixe externo (XRT), ciclofosfamida ou anticorpos, tais como OKT3 ou CAMPATH. Também aqui descritas, as composições celulares da presente invenção são administradas após terapia ablativa de célula B, tal como com agentes que reagem com CD20, por exemplo, Rituxan. Por exemplo, os indivíduos podem submeter-se a tratamento padrão com quimioterapia de elevada dose, seguido por transplantação de célula estaminal de sangue periférico. Em determinados exemplos, após a transplantação, os indivíduos recebem uma infusão das células imunes expandidas da

presente invenção, ou as células expandidas são administradas antes ou após a cirurgia.

A dosagem dos tratamentos acima a ser administrada a um doente irá variar com a natureza precisa do estado a ser tratado e do recetor do tratamento. O dimensionamento de dosagens para administração humana pode ser realizado de acordo com práticas aceites na técnica. A dose para CAMPATH, por exemplo, estará geralmente na gama de 1 a cerca de 100 mg para um doente adulto, administrado geralmente diariamente durante um período entre 1 e 30 dias. A dose diária preferida é 1 a 10 mg por dia, embora em alguns casos possam ser usadas doses maiores até 40 mg por dia (descrito na Patente U.S. N° 6,120,766).

EXEMPLOS EXPERIMENTAIS

A invenção é adicionalmente descrita em detalhe com referência aos seguintes exemplos experimentais. Estes exemplos são proporcionados apenas para fins ilustrativos, e não pretendem limitar, salvo especificação em contrário. Assim, a invenção não deve de modo algum ser interpretada como estando limitada aos seguintes exemplos, mas pelo contrário, deve ser interpretada de modo a abranger quaisquer e todas as variações que se tornarem evidentes como resultado do ensinamento aqui proporcionado.

Sem descrição adicional, crê-se que um técnico com conhecimento gerais na matéria, usando a descrição anterior e os seguintes exemplos ilustrativos, faz e utiliza os compostos da presente invenção e pratica os métodos reivindicados. Assim os seguintes exemplos de trabalho indicam especificamente as formas de realização preferidas

da presente invenção, e não devem ser interpretadas, de modo algum, como limitantes do restante da divulgação.

Exemplo 1: Células T que expressam receptores quiméricos estabelecem efeitos antitumorais fortes e de memória em doentes com leucemia avançada

Linfócitos manipulados para expressar receptores de抗igénio quiméricos (CARs) demonstraram expansão *in vivo* mínima e efeitos antitumorais em ensaios clínicos prévios. Os resultados aqui apresentados demonstram que as células T CAR contendo CD137 têm forte atividade clínica resistente não cruzada após-infusão em três de três doentes tratados com leucemia linfocítica crónica avançada (LLC). As células T manipuladas expandiram mais do que mil vezes *in vivo*, traficadas para a medula óssea e continuaram a expressar CARs funcionais a altos níveis durante pelo menos 6 meses. Em média, cada célula T CAR+ infundida erradicou pelo menos 1000 células de LLC. Uma resposta imune específica CD19 foi demonstrada no sangue e na medula óssea, acompanhada de remissão completa em dois de três doentes. Uma porção das células persiste como células T CAR+ de memória, indicando o potencial desta abordagem restrita não-MHC para o tratamento eficaz de malignidades de células B.

Os materiais e métodos empregados nestas experiências são agora descritos.

Materiais e métodos

Declaração laboratorial geral

O processamento, congelação e análises laboratoriais das amostras de investigação foram realizados no Translational and Correlative Studies Laboratory na Universidade da Pensilvânia que funciona ao abrigo dos princípios das boas práticas laboratoriais com SOP estabelecido e/ou protocolos para receção, processando, congelação e análise de amostras. O desempenho dos ensaios e relatório de dados foi de acordo com as diretrizes MIATA (Janetzki *et al.*, 2009, *Immunity* 31:527-528).

Conceção de protocolo

O ensaio clínico (NCT01029366) foi conduzido como esquematizado na Figura 1. Os doentes com malignidade hematológica positiva para CD19 com doença persistente após pelo menos dois regimes de tratamento prévios e que não eram elegíveis para transplantação de célula estaminal alogénica foram elegíveis para o ensaio. Após reavaliação tumoral nos doentes, células T de sangue periférico para fabrico de CART19 foram recolhidas por aférese e foi dada aos indivíduos um programa simples de quimioterapia como especificado na Figura 10 durante a semana antes da infusão. As células CART19 foram administradas por infusão intravenosa usando um regime de dose com desdobramento de 3 dias (10%, 30% e 60%) na dose indicada na Figura 10 e, se disponível, uma segunda dose foi administrada no dia 10; o único doente UPN 02 tinha células suficientes para uma segunda infusão. Os indivíduos foram avaliados para a toxicidade e resposta em intervalos frequentes durante pelo menos 6 meses. O protocolo foi aprovado pela U.S. Food and Drug Administration, pelo Recombinant DNA Advisory Committee e pelo Institutional Review Board da Universidade

da Pensilvânia. O primeiro dia da infusão foi estabelecido como o dia 0 do ensaio.

Indivíduos: sumário clínico

Os sumários clínicos estão delineados na Figura 10 e as histórias detalhadas são aqui proporcionadas noutra parte. O doente UPN 01 foi primeiro diagnosticado com LLC de célula B de fase II na idade de 55. O doente era assintomático e observado durante cerca de 1 - 1/2 anos até precisar de terapia para linfocitose progressiva, trombocitopenia, adenopatia e esplenomegalia. No decurso do tempo, o doente recebeu linhas prévias de terapia. A terapia mais recente foi 2 ciclos de pentostatina, ciclofosfamida e rituximab 2 meses antes da infusão de células CART19 com uma resposta mínima. O doente recebeu depois um ciclo de bendamustina como quimioterapia de linfodepleção antes da infusão de células CART-19.

O doente UPN 02 foi primeiro diagnosticado com LLC na idade de 68 quando o doente apresentava-se com fadiga e leucocitose. O doente foi relativamente estável durante 4 anos em que o doente desenvolveu leucocitose progressiva ($195.000/\mu\text{L}$), anemia e trombocitopenia que requerem terapia. A análise teste cariotípico mostrou que as células de LLC tinham deleção do cromossoma 17p. Devido à doença progressiva, o doente foi tratado com alemtuzumab com uma resposta parcial, mas dentro de um ano e meio o doente tinha doença progressiva. O doente foi tratado novamente com alemtuzumab durante 18 semanas com uma resposta parcial e 1 ano de progressão sem intervalo. O doente recebeu depois 2 ciclos de bendamustina com rituximab sem uma resposta significativa (Figura 5A). O doente recebeu o

único agente bendamustina como quimioterapia de linfodepleção antes da infusão de células CART-19.

O doente UPN 03 apresentava-se na idade de 50 com LLC de fase assintomática e foi seguido com observação durante anos. O doente tinha leucocitose progressiva (contagem de glóbulos brancos 92.000/ μ L) e adenopatia progressiva que requeria terapia. O doente recebeu 2 ciclos de rituximab com fludarabina que resultou na normalização das contagens sanguíneas e melhoria significativa, embora sem resolução completa da adenopatia. O doente teve um intervalo sem progressão de cerca de 3 anos. O teste cariotípico mostrou que as células continham deleção do cromossoma 17p com FISH demonstrando uma deleção TP53 em 170 de 200 células. Durante os anos seguintes o doente requereu 3 linhas diferentes de terapia (Figura 10) para leucocitose progressiva e adenopatia, recebendo por último almtuzumab com uma resposta parcial 6 meses antes da infusão de células CART19. O doente recebeu pentostatina e ciclofosfamida como quimioterapia de linfodepleção antes da infusão de células CART-19.

Produção de vetor

O transgene CD19-BB-z (GeMCRIS 0607-793) foi concebido e construído como descrito (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17:1453-1464). O vetor lentiviral foi produzido de acordo com boas práticas de fabrico correntes, usando uma abordagem da produção de três-plasmídeos na Lentigen Corporation como descrito (Zufferey et al., 1997, Nature biotechnol 15:871-875).

Preparação do produto das células CART19

Os métodos de preparação de células T usando esferas de poliestireno paramagnéticas revestidas com anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28 foram descritos (Laport et al., 2003, Blood 102: 2004-2013). A transdução de lentiviral foi realizada como descrito (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103:17372-17377).

Métodos para cálculo da carga tumoral

A carga de LLC na linha de base foi calculada como mostrado na Figura 10. A quantidade de células de LLC foi calculada na medula óssea, sangue e tecidos linfoides secundários, como descrito abaixo.

Medula óssea: Em adultos saudáveis, a medula óssea representa cerca de 5% do peso corporal total (Woodard et al., 1960, Phys MED Biol, 5:57 - 59; Bigler et al., 1976, Health Phys 31:213-218). A medula óssea em amostras de cristas ilíacas tem uma percentagem crescente de medula (gorda) inativa com idade, aumentando de 20% da medula total na idade de 5 a cerca de 50% pela idade de 35, quando permanece estável até à idade de 65, e depois aumenta até cerca de 67% de medula inativa pela idade de 75 (Hartsock et al., 1965, Am J Clin Path 43:326-331). O valor de referência internacional para o peso esquelético total da medula ativa (vermelha) e inativa (gorda) para homens na idade de 35 é estabelecido atualmente em 1170g e 2480g, respectivamente (Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: The Skeleton in Annals of the ICRP, Vol. 25 (ed. Smith, H.) 58-68 (um relatório de um grupo de trabalho do comité 2 da comissão internacional sobre proteção radiológica, Oxford, 1995)). Os homens

adultos entre as idades de 35 e 65 têm medula que representa 5,0% do peso corporal total, compreendida de 1,6% como medula ativa (vermelha) e 3,4% como medula inativa (gorda) (Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: The Skeleton in Annals of the ICRP, Vol. 25 (ed. Smith, H.) 58-68 (um relatório de um grupo de trabalho do comité 2 da comissão internacional sobre proteção radiológica, Oxford, 1995)). Com base na biópsia de medula óssea e em espécimes de aspirados, o peso das células de LLC para os três doentes na linha de base foi calculado como mostrado na Tabela 1. Estas estimativas da massa de medula de LLC total foram convertidas depois ao número de células de LLC total na medula usando $1\text{Kg} = 10^{12}$ células, e os números resultantes são mostrados na Figura 10. Estes cálculos são baseados na suposição que a LLC tem uma distribuição uniforme na medula óssea. Para o doente UPN 01, os cálculos são mostrados para uma biópsia de medula que foi obtida antes da quimioterapia de bendamustina, e para um aspirado obtido após bendamustina e pré-infusão de CART19. Os números são menos precisos para o aspirado dia-1 comparado ao espécime da biópsia do dia-14 devido a limitações técnicas do aspirado do dia-1. O doente UPN 02 tinha um único espécime de biópsia de pré-tratamento que mostra substituição completa de medula pela LLC. Este doente tinha um espécime inalterado no dia 30 pós-CART19. A carga de medula para o doente UPN 03 foi calculada com base numa biópsia pós-quimioterapia e pré-CART19.

Tabela 1: Massa de medula

Peso de Medula Ativa (kg)	Peso de Medula Inativa (kg)	Medula total (kg)
<hr/>		
Homens normais (padrão)		

de referência ICRP)	1,17	2,48	3,65
UPN 01 dia-14			
(95% celular)	3,47	0,18	3,65
UPN 02 dia-47			
(95% celular)	3,47	0,18	3,65
UPN 03 dia-1			
(60% celular)	2,19	1,46	3,65
Peso de			
LLC (kg)			
UPN 01 dia-14			
(70% LLC)	2,43		
UPN 01 dia-1			
(50% LLC por coágulo)	1,73		
UPN 02 dia-47			
(>95% LLC)	3,29		
UPN 03 dia-1			
(40% LLC)	0,88		

Sangue: Apenas o doente UPN 02 tinha carga tumoral de LLC substancial no sangue pré-infusão de CART19. O citometria de fluxo mostrou que as células tinham um fenótipo típico como uma população clonal, com uma população de células B-IgM CD5+CD10-CD19+CD20(fraco)+CD23(variável)+ restritas a kapa de superfície fraca. Aproximadamente 35% das células de LLC coexpressaram CD38. A carga de LLC não desapareceu com 3 ciclos de quimioterapia de bendamustina e estava presente na altura das infusões de CART19. Na altura da infusão de CAR19, a contagem de LLC no sangue era 55.000 células/ μ L. Supondo um volume de sangue de 5,0 L, o doente UPN 02 tinha $2,75 \times 10^{11}$ células de LLC no sangue no dia 0. Dados os glóbulos brancos totais normais nos doentes UPN 01 e 03, a carga de doença circulante nestes doentes não foi

calculada, o que conduziria a uma leve subestimativa da carga corporal total.

Tecido linfoide secundário: O volume de linfoadenopatia e de esplenomegalia foi quantificado em varrimentos axiais de TAC usando software aprovado pela FDA. Os volumes são apenas para o peito, abdômen e pélvis. As massas do corpo vertebral T1 ao nível da bifurcação da artéria femoral comum foram medidas em todos os doentes e, em alguns, os nódulos na área inguinal foram também incluídos. Os nódulos na cabeça/pescoço e extremidades foram excluídos da análise e excluídos do número de células alvo LLC de linha de base LLC, que também conduziria a um leve subestimativa da carga corporal total. Os doentes UPN 01 e 03 tiveram remissões completas sustentadas para além de 6 meses, e assim a fórmula (volume da linha de base - volume de mês 3) foi usada para determinar a redução na carga tumoral da linha de base; o doente UPN 02 tinha doença estável em adenopatia, e assim a massa tumoral da linha de base foi calculada subtraindo o volume esplénico de referência de homens saudáveis de idade comparável (Harris et al., 2010, EUR J Radiol 75: e97-e101). A massa tumoral da linha de base foi convertida para células de LLC usando uma abordagem de densidade (densidade de 1 Kg/L, e 1 kg = 10^{12} células) ou uma abordagem de volume (as células de LLC têm 10 μm de diâmetro ou 600 fL, assumindo uma forma esférica), e ambos os valores são apresentados na Figura 10. Os volumes tumorais em tecidos linfoideos secundários nos três doentes são mostrados abaixo na Tabela 2, como calculados a partir de varrimentos de TAC disponíveis.

Tabela 2: Volumes tumorais

Doente	Dia do ensaio	Volume LN (mm3)	Volume do baço (mm3)	Volume total (mm3)
UPN				
01	-37	239655	1619180	1858835
	1 mês	105005	1258576	1363580
	3 meses	65060	1176625	1241685
UPN				
02	-24	115990	1166800	1282790
	1 mês	111755	940660	1052715
UPN				
03	-10	239160	425825	674985
	1 mês	111525	371200	482725
	3 meses	47245	299860	347105

O varrimento de TAC da linha de base para o doente UPN 01 foi realizada 8 dias após 2 ciclos de ciclofosfamida/pentostatina/ rituximab, e não mostrou nenhuma resposta a este regime de quimioterapia comparativamente ao varrimento de TAC anterior. O doente teve um ciclo de bendamustina antes de CAR19, e assim, a alteração no volume tumoral do dia -37 para o dia +31 para UPN 01 não pode excluir a potencial contribuição de bendamustina, assim como de CART19. De modo semelhante, a alteração no volume tumoral para UPN 03 reflete o efeito combinado de 1 ciclo de pentostatina/ ciclofosfamida de CART19.

Método para estimar a razão E:T de eficácia *in vivo* em doentes

A razão E:T de células T CAR infundidas para o número de células tumorais mortas foi calculada usando o número de

células tumorais presentes na altura da injeção de célula T CAR e o número de células T CAR injetadas (Carpenito et al., 2009, Proc. Nalt Acad Sci USA 106:3360-3365). Para a presente invenção, o número de células T CART19+ injetadas como mostrado na Figura 10 foi usado porque não é possível determinar o número absoluto de células T CART19+ presentes *in vivo* com suficiente exatidão ou precisão. Os dados disponíveis na expansão de CART19 no sangue e na medula óssea são robustos como representados na Figura 2 e Figura 6. Contudo não foi possível determinar o tráfego de CART19 para outros locais, tal como tecidos linfoides secundários, criando substancial incerteza relativamente ao número total de células CART19 conseguidas *in vivo* na altura da redução tumoral máxima. Os valores calculados da Tabela 3 foram usados para derivar as razões E:T eficazes.

Tabela 3: razoes E:T de CART19 calculadas conseguidas in vivo

Doente	Carga tumoral (Linha de base e Delta)			Variação total na carga de baço ¹	Células CART19+	E:T in vivo infundidas
	Linha de base de medula óssea	Linha de base de sangue	Linha de nódulos/ baço ¹			
UPN 01	1,70E+12	N/A	8,1E+11	2,51E+12	1,13E+09	1:2200
UPN 02	3,20E+12	2,75E+12	1,6E+12	2,74E+11 ²	5,80E+08	1:1000
UPN 03	8,80E+11	N/A	4,4E+11	1,32E+12	1,42E+07	1:93000

Gama 1000-
93000

1= média do método de densidade e volume

2= Doente UPN02 não respondeu na medula óssea e apresentou redução parcial na adenopatia (3,1E+11 células) nas massas

tumorais medidas por TAC no baço e nódulos linfáticos. Ver Figura 5A para resposta no sangue.

Processamento e congelação das amostras

As amostras (sangue periférico, medula) foram recolhidas em tubos vacutainer de tampa alfazema (K2EDTA,) ou tampa vermelha (sem aditivo) (Becton Dickinson) e transferidas para TCSL dentro de 2 horas da recolha. As amostras foram processadas dentro de 30 minutos da receção de acordo com o SOP laboratorial estabelecido. O sangue periférico e as células mononucleadas de medula foram purificadas através da centrifugação em gradiente de densidade de Ficoll usando Ficoll-Paque (GE Health Care, 17-1440-03) e congeladas em RPMI (Gibco 11875-135) suplementado com 4% de albumina de soro humano (Gemini Bio-Products, 800-120), 2% de Hetastarch (Novaplus, NDC0409-7248-49) e 10% de DMSO (Sigma, D2650) usando recipientes de congelação 5100 Cryo 1°; após 24-72 horas a -80°C, as células foram transferidas para azoto líquido para armazenamento a longo prazo. As amostras de aférese foram obtidas através do banco de sangue do hospital da Universidade da Pensilvânia e processadas no CVPF por purificação de gradiente de Ficoll e congeladas como acima. A viabilidade imediatamente após descongelação foi maior do que 85%, quando avaliada. Para o isolamento de soro, as amostras foram deixadas a coagular durante 1,5-2 horas à temperatura ambiente; o soro foi isolado por centrifugação, e aliquotas de 100 µL de utilização única foram congeladas a -80° C,

Linha celular

K562 (CML, negativa para CD19) foi obtida de ATCC (CCL-243), K562/CD19, um generoso presente da Carmine Carpenito, e é transduzida lentiviralmente de K562 a 100% de frequência para expressar a molécula CD19. NALM-6, uma linha de célula B precursora ALL não-B não-T positiva para CD19 (Hurwitz *et al.*, 1979, Int J Cancer 23:174-180), e confirmada por expressar o抗ígeno CD19 foi um generoso presente de Laurence Cooper. As linhas celulares acima foram mantidas em meio R10 (RPMI 1640 (Gibco, 11875) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Hyclone) e 1% de Pena-Strep (Gibco, 15140-122). As células mononucleadas periféricas (ND365) de um dador saudável foram obtidas por aférese a partir do núcleo de imunologia humana da Universidade da Pensilvânia, processadas e congeladas como acima.

Isolamento de ADN e análise de Q-PCR

Amostras de sangue completo ou medula foram recolhidas em tubos vacutainer BD de tampa alfazema (K3EDTA) (Becton Dickinson). O ADN Genómico foi isolado diretamente a partir de sangue completo usando kits midi de sangue QIAamp DNA (Qiagen) e SOP laboratorial estabelecido, quantificado por espectrofotometria e armazenado a -80°C. A análise de Q-PCR em amostras de ADN genómico foi realizada em bruto usando 123-200 ng de ADN genómico/ponto de tempo, tecnologia ABI Taqman e um ensaio validado para detetar a sequência do transgene CAR CD19 integrado. As gamas paramétricas de passagem/falha, incluindo o declive da curva padrão e valores r^2 , capacidade para determinar exatamente uma amostra de referência (1000 cópias/adição de plasmídeo) e nenhuma amplificação na amostra de ADN do dador saudável foram calculados a partir dos estudos de qualificação e das

gamas de aceitação pré-estabelecidas. Os iniciadores/sondas para o transgene CAR CD19 foram como descrito (Milone et al., 2009, Mol Ther 17:1453-1464). Para determinar o número de cópias/unidade de ADN foi gerada uma curva padrão de 8 pontos que consiste de $10^6\text{-}5$ cópias de plasmídeo lentivírus adicionados em 100 ng de ADN genómico de controlo não-transduzido. Cada ponto de dados (amostras, curva padrão, amostras de referência) foi avaliado em triplicado com valores médios reportados. Para o doente UPN 01, todos os valores reportados foram derivados de um valor Ct positivo em 3/3 dos replicados com % de CV de menos de 0,46%. Para o doente UPN 02, à exceção da amostra do dia +177 (2/3 dos replicados positivos, alta % de CV), todos os valores reportados foram derivados de um valor Ct positivo em 3/3 dos replicados com % de CV de menos de 0,72%. Para o doente UPN 03, à exceção da amostra do dia +1 (2/3 dos replicados positivos, 0,8% CV) e da amostra do dia +3 (2/3 dos replicados positivos, 0,67% CV), todos os valores reportados foram derivados de um valor Ct positivo em 3/3 dos replicados com % de CV de menos de 1,56%. O limite inferior de quantificação (LLOQ) para o ensaio foi determinado a partir da curva padrão a 2 cópias/micrograma de ADN (10 cópias/200 ng de ADN de entrada); os valores médios abaixo de LLOQ (isto é, reportável não quantificável) são considerados aproximações. Uma reação de amplificação paralela para controlar a qualidade do ADN interrogado foi realizada usando 12-20 ng de ADN genómico de entrada, uma combinação de iniciadores/sondas específica para a sequência genómico não-transcrita a montante do gene CDKN1A (GENEBANK: Z85996) (iniciador de sentido: GAAAGCTGACTGCCCTATTTG; SEQ ID N°: 25, iniciador antisentido: GAGAGGAAGTGCTGGGAACAAT; SEQ ID N°: 26, sonda: VIC- CTC CCC AGT CTC TTT; SEQ ID N°: 27), e uma curva

padrão de 8 pontos criada por diluição do ADN genómico de controlo; estas reações de amplificação produziram um fator de correção (CF) (ng detetados/ng de entrada). Cópias de transgene /microgramas de ADN foi calculado de acordo com a fórmula: cópias calculadas a partir da curva padrão de CD19/ADN de entrada (ng) x CF x 1000 ng. A precisão deste ensaio foi determinada pela capacidade para quantificar a marcação do produto celular infundido por Q-PCR de acordo com a fórmula: Marcação média = cópias detetadas/ADN de entrada x 6,3 pg de ADN/célula somática masculina x CF versus positividade do transgene por citometria de fluxo usando reagentes de deteção específicos para CAR. Estas determinações cegas geraram 22,68% de marcação para o produto da infusão de UPN 01 (22,6% por citometria de fluxo), 32,33% de marcação para o produto de infusão de UPN 02 (23% por citometria de fluxo) e 4,3% de marcação para o produto da infusão de UPN 03 (4,7% de marcação por citometria de fluxo).

Análise de Citocinas

A quantificação de fatores solúveis de citocinas foi realizada usando tecnologia de matriz de esferas Luminex e kits comprados à Life Technologies (Invitrogen). Os ensaios foram realizados conforme o protocolo do fabricante com uma curva padrão de 8 pontos gerada usando uma série de diluição de 3 vezes. Cada ponto padrão e amostra foram avaliados em duplicado na diluição de 1:3; % de CV calculada para as medidas em duplicado foi menos de 15%. Os dados foram adquiridos num Bioplex 200 e analisados com software Bioplex Manager versão 5.0 usando análise de regressão logística de 5 parâmetros. As gamas de quantificação da curva padrão foram determinadas pela gama

de 80-120% (valor observado/previsto). As gamas de quantificação de analito individuais são reportadas na legenda da Figura.

Ensaio celular para detetar a função do CAR

As células foram avaliadas para a funcionalidade após descongelação e descanso durante a noite em TCM por medição a desgranulação CD107 em resposta às células alvo. Os ensaios de desgranulação foram realizados usando 1×10^6 PBMC e $0,25 \times 10^6$ células alvo num volume final de 500 μL em placas de 48 poços durante 2 horas a 37°C na presença de CD49d (Becton Dickinson), anti-CD28, monensina (e-Bioscience) e anticorpo CD107a-FITC (eBiosciences) essencialmente como descrito (Betts *et al.*, 2003, 281:6578 J Immunol Methods).

Reagentes de anticorpo

Os seguintes anticorpos foram usados para estes estudos: MDA-CAR, um anticorpo anti-CD19 CAR de murino conjugado com Alexa647 foi um generoso presente dos Drs. Bipulendu Jena e Laurence Cooper (MD Anderson Cancer Center). Para ensaios de imunofenotipagem multi-paramétrica e funcionais: anti-CD3-A700, anti-CD8-PE-Cy7, anti-PD-1-FITC anti-CD25-AF488, anti-CD28-PercP-Cy5,5, anti-CD57-eF450, anti-CD27-APC-eF780, anti-CD17-APC-eF780, anti-CD45RA-eF605NC, CD107a-FITC (todos da e-Bioscience), anti-CD4-PE-Texas Red e Live/dead Aqua (da Life Technologies) e anti-CD14-V500, anti-CD16-V500 (da Becton Dickinson). Para imunofenotipagem geral: CD3-PE, CD14-APC, CD14-PE-Cy7, CD16-FITC, CD16PE-Cy7, CD19-PE-Cy7, CD20-PE, todos da Becton Dickinson.

Citometria de fluxo multiparamétrica

As células foram avaliadas por citometria de fluxo frescas após processamento de Ficoll-Paque ou, se congeladas, após descanso durante a noite a uma densidade de 2×10^6 células/mL em meio de células T (TCM) (X-vivo 15 (Lonza, 04-418Q) suplementado com 5% de soro AB humano (GemCall, 100-512), 1% de Hepes (Gibco, 15630-080), 1% de Pena-Strep (Gibco, 15140-122), 1% de Glutamax (Gibco, 35050-061) e 0,2% de N-acetil cisteína (American Reagent, NDC0517-7610-03). A imunofenotipagem multiparamétrica foi realizada em 4×10^6 células totais/condição, usando colorações de FMO como descrito no texto. As células foram coradas a uma densidade de 1×10^6 células/100 µL de PBS durante 30 minutos em gelo, usando concentrações de anticorpo e de reagente recomendadas pelo fabricante, lavadas, ressuspensas em 0,5% de paraformaldeído e adquiridas usando um LSRII modificado (BD Immunocytometry Systems) equipado com lasers azuis (488 nm), violeta (405 nm), verde (532), e vermelho (633 nm) e conjuntos apropriados de filtros para a deteção e separação das combinações de anticorpos acima. Um mínimo de 100.000 células CD3+ foram adquiridas) para cada corante. Para ensaios funcionais, as células foram lavadas, coradas para marcadores de superfície, ressuspensas em 0,5% de paraformaldeído e adquiridas como acima; um mínimo de 50.000 eventos de CD3+ foram recolhidos para cada condição de coloração. Os valores de compensação foram estabelecidos usando corantes de anticorpo simples e esferas de compensação BD (Becton Dickinson) e calculados e aplicados automaticamente pelo instrumento. Os dados foram analisados usando software FlowJo (versão 8.8.4, Treestar). Para imunofenotipagem geral, as células foram adquiridas usando um citómetro Accuri C6 equipado com um laser azul (488) e vermelho (633 nm). Os valores de compensação foram

estabelecidos usando corantes de anticorpo simples e esferas de compensação BD (Becton Dickinson) e calculados manualmente. Os dados foram analisados usando o pacote de análise de software C-Flow (versão 1.0.264.9, citómetros Accuri).

Histórias clínicas passadas do doente e resposta à terapia

Os sumários de tratamento clínico são delineados na Figura 10. O Doente UPN 01 foi primeiro diagnosticado com LLC de célula B de fase II na idade de 55. O doente era assintomático e foi observado durante cerca de 1-1/2 anos até precisar de terapia para linfocitose progressiva, trombocitopenia, adenopatia e esplenomegalia. Após 4 ciclos de fludarabina, o doente tinha normalização completa das contagens sanguíneas e uma resposta completa por varrimentos de TAC. A progressão foi notada dentro de 5 meses com linfocitose assintomática, trombocitopenia e adenopatia crescente. O doente foi observado sem sintomas durante cerca de 3 anos, e mais tarde precisou de tratamento com Rituximab e fludarabina para leucocitose progressiva, anemia e trombocitopenia. O doente foi tratado com 4 ciclos de rituximab com fludarabina com melhoria parcial em contagens sanguíneas. O doente teve novamente progressão dentro de um ano necessitando terapia manifestada por leucocitose (glóbulos brancos 150.000/ μ L) e trombocitopenia (30.000/ μ L plaquetas) e foi tratado com alemtuzumab com normalização das contagens sanguíneas. A progressão foi notada dentro de 13 meses. O doente recebeu depois um único agente rituximab sem uma resposta significativa e seguido por rituximab, ciclofosfamida, vincristina e prednisona (R-CVP) durante 2 ciclos com resposta mínima e seguido por lenalidomida. A lenalidomida

foi interrompida devido à toxicidade. O doente recebeu 2 ciclos de pentostatina, ciclofosfamida e rituximab com uma resposta mínima.

Mais tarde, o doente recebeu bendamustina como quimioterapia de linfodepleção 4 dias antes da infusão de células CART19. Antes da terapia, os glóbulos brancos eram 14.200/ μ L, hemoglobina 11,4 gm/dl, contagem de plaquetas 78.000/ μ L e ALC era 8000/ μ L. O varrimento de TAC mostrou que adenopatia difusa e a medula óssea estava extensivamente infiltrada com LLC (67% de células). O doente recebeu $1,6 \times 10^7$ células CART-19 ($1,13 \times 10^9$ células CART19 totais/kg como avaliado por FACS). Não se verificaram toxicidades de infusão, o doente ficou neutropénico aproximadamente 10 dias após bendamustina e 6 dias após infusões de células CART19, e começando 10 dias após a primeira infusão de CART19, o doente desenvolveu febres, tremores e hipotensão transiente. Ao mesmo tempo, um raio X do peito e varrimento de TAC demonstraram uma pneumonia no lóbulo superior esquerdo tratada com antibióticos. As febres persistiram durante cerca de 2 semanas e resolveram-se quando havia uma recuperação de neutrófilos. O doente não teve mais sintomas infecciosos ou constitucionais.

O doente conseguiu uma resposta rápida e completa como representado na Figura 5. Entre 1 e 6 meses após a infusão não foram detetadas quaisquer células LLC circulantes no sangue por citometria de fluxo. A medula óssea em 1, 3 e 6 meses após infusões de células CART-19 apresenta ausência sustentada do infiltrado linfocítico por teste de morfologia e citometria de fluxo. Os varrimentos de TAC em 1 e 3 meses depois da infusão mostram resolução completa da

adenopatia anómala. O doente teve uma leucopenia persistente (glóbulos brancos 1000-3900/uL) e trombocitopenia (~100.000/uL plaquetas) e hipogamaglobulinia suave (IgG 525 mg/dL, normal 650-2000 mg/dL) mas sem complicações infecciosas.

O doente UPN 02 foi tratado com células CART19 na idade de 77. O doente tinha uma história relevante de doença arterial coronária e foi primeiro diagnosticado com LLC em 2000 na idade de 68, quando o doente apresentou fadiga e leucocitose. O doente foi relativamente estável durante 4 anos em que o doente desenvolveu leucocitose progressiva (195.000/ μ L), anemia e trombocitopenia precisando de terapia. O teste genético nesse momento mostrou que as células de LLC tinham deleção do cromossoma 17p. Devido à doença progressiva, o doente foi tratado com um programa de 12 semanas de alemtuzumab com uma resposta parcial e melhoria em contagens sanguíneas. Dentro de um ano e meio o doente tinha leucocitose progressiva, anemia, trombocitopenia e esplenomegalia. A análise do cariotípico confirmou a deleção do cromossoma 17p, agora com uma deleção do cromossoma 13q. O doente foi tratado novamente com alemtuzumab durante 18 semanas com melhoria da leucocitose e estabilização da anemia e esplenomegalia. O doente tinha evidência de leucocitose progressiva, anemia e trombocitopenia dentro de um ano. O tratamento incluiu 2 ciclos de bendamustina com rituximab resultando em doença estável mas sem melhoria significativa, como mostrado na Figura 5A.

O doente recebeu apenas bendamustina como quimioterapia de linfodepleção antes da infusão de células CART-19. O doente recebeu $4,3 \times 10^6$ células CAR19/kg ($4,1 \times 10^8$ células totais)

em 3 infusões desdobradas, complicadas por febres transientes tão altas como 102° graus durante 24 horas. No dia 11 após a primeira infusão, o doente recebeu um reforço de $4,1 \times 10^8$ células CART19 ($4,3 \times 10^6/\text{kg}$) e esta infusão foi complicada por febres, tremores e por falta de ar sem hipoxia, necessitando de uma hospitalização de 24 horas. Não havia qualquer evidência de isquemia cardíaca, e os sintomas resolveram-se. No dia 15 após a primeira infusão de CART-19 e no dia 4 após a infusão de células CART19 de reforço, o doente foi admitido ao hospital com febres altas (até 104° F), frios e tremores. Testes exaustivos com culturas de sangue e urina e CXR não conseguiram identificar uma fonte de infecção. O doente queixou-se de falta de ar, mas não tinha hipóxia. Um ecocardiograma mostrou hipocinesia grave. A fração de ejeção foi 20%. O doente recebeu 1 mg de prednisona por kg durante um dia e 0,3 mg por kg durante aproximadamente uma semana. Isto resultou em rápida resolução das febres e disfunção cardíaca.

Coincidente com o início das febres altas, o doente teve uma queda rápida nos linfócitos de sangue periférico como representado na Figura 5A. Embora o doente tivesse normalização da contagem de glóbulos brancos, o doente tinha LLC circulante persistente, anemia moderada estável e trombocitopenia. A medula óssea apresentou infiltração extensiva persistente de LLC um mês após a terapia, apesar da dramática citorredução do sangue periférico, e os varrimentos de TAC mostraram uma redução parcial da adenopatia e esplenomegalia. Cinco meses após infusões de células CART19, o doente desenvolveu linfocitose progressiva. Nove meses após as infusões, o doente tinha linfocitose ($16.500/\mu\text{L}$) com anemia modesta estável e

trombocitopenia com adenopatia estável. O doente permanece assintomático e não teve mais terapia.

O doente UPN 03 foi diagnosticado com LLC de fase I assintomática na idade de 50 e foi seguido com observação durante 6 anos. Mais tarde, o doente teve leucocitose progressiva (contagem de glóbulos brancos 92.000/ μ L) e adenopatia progressiva que precisou de terapia. O doente recebeu 2 ciclos de rituximab com fludarabina que resultou na normalização das contagens sanguíneas e melhoria significativa, embora resolução não completa da adenopatia. O doente teve cerca de um intervalo sem progressão de 3 anos, seguido durante os 6 meses seguintes por leucocitose rapidamente progressiva (glóbulos brancos 165.000/ μ L) e por adenopatia progressiva que precisou de terapia. O doente recebeu um ciclo de fludarabina e 3 ciclos de rituximab com fludarabina com normalização das contagens sanguíneas e resolução da adenopatia palpável. O doente teve um intervalo sem progressão aproximado de 20 meses até que o doente desenvolveu novamente leucocitose de progressão rápida e adenopatia. Neste momento, a medula óssea estava extensivamente infiltrada com LLC e a análise cariotípica mostrou que as células continham deleção do cromossoma 17p com FISH, demonstrando uma deleção TP53 em 170/200 das células. O doente recebeu um ciclo de rituximab com bendamustina, seguido por 4 ciclos de apenas bendamastina (devido a uma reação alérgica grave ao rituximab). O doente teve normalização inicial das contagens sanguíneas, mas imediatamente após a descontinuação da terapia teve leucocitose progressiva e adenopatia.

Células T autólogas foram recolhidas por aférese e criopreservadas do doente UPN3. O doente foi depois tratado

com alemtuzumab durante 11 semanas com uma excelente resposta hematológica. Houve uma melhoria, embora resolução não completa da adenopatia. O doente teve doença ativa, mas estável durante os próximos 6 meses. Mais tarde, o doente recebeu pentostatina e ciclofosfamida como quimioterapia de linfodepleção antes da infusão de células CART19.

Três dias após a quimioterapia, mas antes da infusão de células, a medula óssea apresentava-se hipercelular (60%) com aproximadamente 40% de participação por LLC. Devido a limitações de fabrico inerentes às recolhas de aférese de doentes de LLC como representado na Tabela 3 e (Bonyhadi et al., 2005, J Immunol 174:2366-2375), o doente foi infundido com um total de $1,46 \times 10^5$ células CART19+ por kg ($1,42 \times 10^7$ células CART19+ totais) durante 3 dias. Não houve qualquer toxicidade de infusão. Catorze dias após a primeira infusão, o doente começou a ter arrepios, febres tão altas quanto 102° F, tremores, náuseas e diarreia que foram tratados sintomaticamente. O doente não tinha quaisquer sintomas respiratórios ou cardíacos. No dia 22 após a infusão, uma síndrome de lise tumoral foi diagnosticada manifestada por um LDH elevado, ácido úrico e complicada por insuficiência renal. O doente foi hospitalizado e tratado com fluido de ressuscitação e rasburicase com normalização rápida do ácido úrico e da função renal. Foi realizada uma avaliação clínica detalhada com um CXR, culturas de sangue, urina e fezes, e foram negativos ou normais.

Dentro de 1 mês das infusões CART-19, o doente tinha eliminação de LLC circulante a partir do sangue e medula óssea por morfologia, citometria de fluxo, citogenética, e análise de FISH e varrimentos de TAC mostraram resolução da

adenopatia anómala (Figura 5C). A remissão do doente foi sustentada para além de 8 meses da infusão inicial de células CART19.

Os resultados das experiências são agora descritos.

Protocolo clínico

Três doentes com LLC avançada, resistente a quimioterapia, foram registados num ensaio clínico piloto como representado na Figura 1. Todos os doentes foram exaustivamente pré-tratados com várias quimioterapias e regimes biológicos como mostrado na Figura 10. Dois dos doentes tinham LLC deficiente em p53, uma deleção que prevê resposta fraca à terapia convencional e progressão rápida (Dohner *et al.*, 1995, *Blood*, 851580-1589). Cada um dos doentes tinha grandes cargas tumorais após a quimioterapia preparativa, incluindo infiltração extensiva de medula (40 a 95%) e linfoadenopatia; o doente UPN 02 também tinha linfocitose periférica significativa. As células T CART19 foram preparadas como representado na Figura 1B e os detalhes do fabrico das células e da caracterização do produto para cada doente são mostrados na Tabela 4. Todos os doentes foram pré-tratados 1-4 dias antes das infusões de células T CART19 com quimioterapia de linfodepleção. Um plano de infusão de células de dose desdobrada foi usado porque o ensaio testava um CAR que incorpora um domínio de sinalização co-estimulador 4-1BB como representado na Figura 1A.

Tabela 4: Critérios de libertação de produto CART19 e produtos de aférese

	Ensaio	Especificação	UPN 01	UPN 02	UPN 03
Produto de aférese					
	Citometria de fluxo para CD3+ de CD45+	N/A	4,46%	2,29%	2,67%
Produto CART19					
	Número total de células Infundidas	~2-5x10 ⁹	5x10 ⁹	1,275x10 ⁹ 1,275x10 ⁹ [2,55x10 ⁹ total]	3x10 ⁸
	Viabilidade celular	≥ 70%	96,2%	95,3 (90,5) ¹	90,3
	% Células CD3+	≥ 80%	88,9%	98,8	98,9
	Nº Esferas Residuais / 3x10 ⁶ Células	≤ 100 esferas	3,95	1	4
	Endotoxina	≤ 3,5 EU/mL	<0,5 EU/mL	<0,5 EU/mL	<0,5 EU/mL
	Micoplasma	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Esterilidade (Bactec)	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento	crescimento
	Cultura fúngica	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento	crescimento

	Ensaio	Especificação	UPN 01	UPN 02	UPN 03
Produto de aférese					
	ELISA BSA	$\leq 1 \mu\text{g/mL}$	<0,5 ng/mL	<0,5 ng/mL	<0,5 ng/mL
	Lentivírus Competentes em Replicação (RCL)	RCL Não detetável	Não detetável	Inconclusivo ²	Inconclusivo ²
	Eficiência de transdução (Expressão de scFv)	$\geq 20\%$	22,6%	23%	4,74% ⁴
	Sequência de ADN do vetor (CART19 PCR)	0,2 - 3 cópias /célula	0,15 ³	0,275	0,101

1= Dose N°2.

2 = Valor de ensaio no Dia 12 abaixo de LOQ e tinha diminuído desde cedo na expansão, consistente com transição de ADN plasmídico de geração de vetor. Submetido à FDA como uma correção de informação.

3 = Libertação de produto com base na coloração de superfície por FACS.

4 = Exceção de tratamento concedida para critério de libertação por DSMC e IRB externo.

Expansão e persistência in vivo de CART19 e tráfego para a medula óssea

Crê-se que as células T CAR+ expandidas usando esferas CD3/CD28 e expressando um domínio de sinalização 4-1BB sejam uma melhoria face aos CARs que carecem de 4-1BB. Um ensaio de Q-PCR foi desenvolvido para permitir o tráfego quantitativo de células CAR19 no sangue e medula óssea.

Todos os doentes apresentaram expansão e persistência das células CART19 no sangue durante pelo menos 6 meses como representado nas Figuras 2A e 2C. Em particular, os doentes UPN 01 e UPN 03 apresentaram uma expansão de 1.000 a 10.000 vezes de células T CAR+ no sangue durante o primeiro mês de pós-infusão. Os níveis de expansão de pico coincidiram com o início dos sintomas clínicos da pós-infusão no doente UPN 01 (dia 15) e no doente UPN 03 (dia 23). Além disso, seguindo um decaimento inicial que pode ser modelado com uma cinética de primeira ordem, os níveis das células T CART19 estabilizaram em todos os 3 doentes desde o dia 90 a 180 pós-infusão. Significativamente, as células T CART19 também foram traficadas para a medula óssea em todos os doentes, embora a níveis 5 a 10 vezes inferiores aos observados no sangue como representado nas Figuras 2D a 2F. Os doentes UPN 01 e 03 tiveram um decaimento linear logarítmico na medula óssea, com um desaparecimento $T_{\frac{1}{2}}$ de ~35 dias.

Indução de respostas imunes específicas nos compartimentos de sangue e medula óssea após infusão de CART19

Amostras de soro de todos os doentes foram recolhidas e analisadas por lote para determinar quantitativamente os níveis de citocinas, avaliando um painel de citocinas, quimiocinas, e outros fatores solúveis para avaliar potenciais toxicidades e para proporcionar evidência da função das células CART19 como representado na Figura 3. Dos trinta analitos testados, onze apresentaram uma variação de 3 vezes ou mais da linha de base, incluindo 4 citocinas (IL-6, INF- γ , IL-8 e IL-10), 5 quimiocinas (MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, CXCL9, CXCL10) e receptores solúveis para IL-1R α e IL-2R α . Destes, o interferão- γ tinha a maior

variação relativa da linha de base. Interessante, o tempo de pico da elevação de citocina em UPN 01 e UPN 03 correlacionou-se temporalmente com os sintomas clínicos previamente descritos e com os níveis de pico das células CART19 no sangue em cada doente. Apenas variações modestas foram notadas no doente UPN 02, talvez como resultado do tratamento com corticosteroides dado a este doente. A elevação de IL-2 solúvel não foi detetada no soro dos doentes, embora uma das bases racionais pré-clínicas para desenvolver células T CAR+ com domínios de sinalização 4-1BB fossem a reduzida propensão para despoletar secreção de IL-2 comparativamente aos domínios de sinalização CD28 (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17:1453-1464). Isto pode ser relevante para a atividade clínica sustentada porque estudos anteriores mostraram que as células T CAR+ são potencialmente suprimidas por células T reguladoras (Lee et al., 2011, Cancer Res 71:2871-2881), as células que poderiam ser induzidas pelos CARs que segregam quantidades substanciais de IL-2 ou por provisão de IL-2 exógena pós-infusão. Finalmente, foi observada uma indução robusta da secreção de citocinas nos sobrenadantes de aspirados de medula óssea de UPN 03 como representado na Figura 3D que também coincidiu com o desenvolvimento da síndrome de lise tumoral e remissão completa.

Expressão prolongada e estabelecimento de uma população de células CART19 de memória no sangue

Uma pergunta central na imunoterapia do cancro mediada por CAR é se o fabrico otimizado de células e os domínios de co-estimulação aumentam a persistência de células T geneticamente modificadas e permitem o estabelecimento de células T CAR+ de memória nos doentes. Estudos anteriores

não demonstraram expansão robusta, persistência prolongada e/ou expressão de CARs em células T após a infusão (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115; Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24: e20-e22; Lavre et al., 2008, Blood, 112, 2261-2271; Savoldo et al., 2011, J Clin investe doi: 10.1172/JCI46110). A análise de citometria de fluxo de amostras de sangue e medula ao dia 169 pós-infusão revelou a presença de células que expressam CAR19 em UPN 03 (Figuras 4A e 4B), e uma ausência de células B como representado na Figura 4A. Em particular, por ensaio Q-PCR, todos os três doentes têm células CAR+ persistentes em 4 meses e para além como representado nas Figuras 2 e Figuras 6. A frequência *in vivo* de células CAR+ por citometria de fluxo quase igualou os valores obtidos do ensaio de PCR para o transgene CART19. Importante, no doente UPN 03, apenas as células CD3+ expressaram CAR19, uma vez que as células CAR19+ não foram detetáveis em subconjuntos positivos para CD16 ou CD14 como representado na Figura 4A. A expressão de CAR foi também detetada na superfície de 4,2% das células T no sangue do doente UPN 01 no dia 71 pós-infusão como representado na Figura 7.

Em seguida, citometria de fluxo policromática foi usada para realizar estudos detalhados para caracterizar adicionalmente a expressão, fenótipo e função das células CART19 em UPN 03 usando um anticorpo idiotípico anti-CAR (MDA-647) e uma estratégia de seleção mostrada na Figura 8. Foram observadas diferenças assinaláveis na expressão de marcadores de memória e ativação em células CD8⁺ e CD4⁺ com base na expressão de CAR19. No dia 56, as células CAR19 CD8⁺ apresentaram principalmente um fenótipo de memória efetora (CCR7-CD27-CD28-) consistente com exposição prolongada e robusta ao antigénio como representado na

Figura 4C. Pelo contrário, as células CD8⁺ negativas para CAR consistiram em misturas de células de memória central e efetoras, com expressão de CCR7 num subconjunto de células, e números substanciais nas frações CD27+/CD28- e CD27+/CD28+. Enquanto as populações de células negativas para CART19 e CAR expressaram substancialmente CD57, esta molécula foi co-expressa uniformemente com PD-1 nas células CART19, um possível reflexo da extensa história replicativa destas células. Em contraste com a população de células negativas para CAR, a totalidade da população de CART19 CD8⁺ careceu da expressão de CD25 e CD127. No dia 169, embora o fenótipo da população de células negativas para CAR tenha permanecido semelhante à amostra do dia 56, a população CART19 tinha evoluído para conter uma população minoritária com características de células de memória central, notavelmente a expressão de CCR7, níveis mais altos de CD27 e CD28, assim como células CAR+ que eram negativas para PD-1, negativas para CD57 e positivas para CD127.

No compartimento de CD4⁺, no dia 56 as células CAR19 foram caracterizados por falta uniforme de CCR7 e uma predominância das células CD27+/CD28+/PD-1+ distribuídas dentro de compartimentos CD57+ e -, e uma ausência essencial da expressão de CD25 e CD127 como representado na Figura 4B. Pelo contrário, as células negativas para CAR neste ponto do tempo eram heterogéneas na expressão de CCR7, CD27 e PD-1, expressavam CD127 e também continham uma população substancial de CD25+/CD127- (potencial célula T reguladora). No dia 169, embora a expressão de CD28 permaneceu uniformemente positiva em todas as células CAR+CD4⁺, uma fração das células CART19 CD4⁺ tinha evoluído para um fenótipo de memória central com expressão de CCR7,

uma percentagem mais alta de células CD27, o aparecimento de um subconjunto negativo para PD-1, e aquisição da expressão de CD127. As células negativas para CAR permaneceram razoavelmente consistentes com as suas correspondentes do dia 56, à exceção de uma redução na expressão de CD27 e uma diminuição na percentagem de células CD25+/CD127-.

As células CART19 podem reter a função efetora após 6 meses no sangue

Para além da curta persistência e proliferação inadequada *in vivo*, uma limitação de ensaios anteriores, com células T CAR+ foi a perda rápida da atividade funcional das células T infundidas *in vivo*. O elevado nível de persistência da célula CART19 e expressão de superfície da molécula CAR19 no doente UPN 01 e 03 proporcionou a oportunidade de testar diretamente funções efetoras específicas de anti-CD19 nas células recuperadas das amostras de sangue periférico criopreservadas. PBMC do doente UPN 03 foram cultivados com células alvo que eram positivas ou negativas para a expressão de CD19 (Figura 4d). Foi demonstrada função efetora robusta específica de CD19 de células T CART19 por desgranulação específica contra células alvo positivas para CD19 mas não negativas para CD19, como avaliado por expressão de superfície de CD107a. Em particular, a exposição da população CART19 aos alvos positivos para CD19 induziu uma internalização rápida de CAR-19 de superfície como representado na Figura 8 para a expressão de superfície de CAR19 nas mesmas células efetoras, em coloração convencional por citometria de fluxo. A presença de moléculas co-estimuladoras em células alvo não foi requerida para despoletar a desgranulação da célula CART19

porque a linha NALM-6 não expressa CD80 ou CD86 (Brentjens *et al.*, 2007, Clin Cancer Res 13:5426-5435). A função efetora era evidente no dia 56 pós-infusão e foi retida no ponto de tempo de dia 169. Foi também demonstrada função efetora robusta de células T CAR+ e CAR- por estimulação farmacológica.

Atividade clínica de células CART19

Não foram observadas toxicidades significativas durante os quatro dias após a infusão em qualquer doente, a não ser reações febris transientes. Contudo, todos os doentes desenvolveram subsequentemente significativas toxicidades clínicas e laboratoriais entre o dia 7 e 21 após a primeira infusão. Estas toxicidades eram de curto prazo e reversíveis. Dos três doentes tratados até agora, existe 2 CRs e 1 PR a >6 meses pós-infusão de CART19, de acordo com critérios padrão (Hallek *et al.*, 2008, Blood 111:5446). Os detalhes da história clínica passada e da resposta à terapia para cada doente são descritos na Figura 10.

Em resumo, o doente UPN 01 desenvolveu uma síndrome febril, com tremores e hipotensão transiente que começou 10 dias após a infusão. As febres persistiram durante aproximadamente 2 semanas e resolveram-se; o doente não tinha mais sintomas constitucionais. O doente conseguiu uma resposta rápida e completa como representado na Figura 5. Entre 1 e 6 meses após a infusão, não foram detetadas quaisquer células de LLC circulantes no sangue por citometria de fluxo. A medula óssea em 1, 3, e 6 meses após infusões de células CART19 mostra ausência sustentada de

infiltrado linfocítico por análise de morfologia e citometria de fluxo como representado na Figura 5B. Varrimentos de TAC em 1 e 3 meses após a infusão mostram resolução da adenopatia como representado na Figura 5C. A remissão completa foi sustentada durante 10+ meses no momento deste relatório.

O doente UPN 02 foi tratado com 2 ciclos de bendamustina com rituximab resultando em doença estável como representado na Figura 5A. O doente recebeu uma terceira dose de bendamustina como quimioterapia de linfodepleção antes da infusão de células T CART19. O doente desenvolveu febres a 40°C, tremores e dispneia necessitando de hospitalização de 24 horas no dia 11 após a primeira infusão e no dia do segundo reforço de células CART19. As febres e os sintomas constitucionais persistiram e no dia 15 o doente tinha disfunção cardíaca transiente; todos os sintomas se resolveram após terapia de corticosteroide que foi iniciada no dia 18. Após infusão de CAR19, e coincidente com o início de febres altas, o doente tinha eliminação rápida das células de LLC deficientes em p53 de sangue periférico como representado na Figura 5A e uma redução parcial da adenopatia, a medula óssea apresentava infiltração extensiva persistente de LLC um mês após a terapia, apesar da dramática citorredução de sangue periférico. O doente permanece assintomático.

O doente UPN 03 recebeu pentostatina e ciclofosfamida como quimioterapia de linfodepleção antes da infusão de células CART19. Três dias após a quimioterapia, mas antes da infusão de células, a medula óssea apresentava-se hipercelular (60%) com aproximadamente 50% de envolvimento por LLC. O doente recebeu uma baixa dose das células CART19

($1,5 \times 10^5$ células T CAR+/kg divididas ao longo de 3 dias). Além disso, não havia toxicidades de infusão agudas. Contudo, 14 dias após a primeira infusão, o doente começou a ter tremores, febres, náusea e diarreia. No dia 22 após a infusão, a síndrome de lise tumoral foi diagnosticada requerendo hospitalização. O doente teve resolução de sintomas constitucionais, e dentro de 1 mês das infusões de CART19, o doente apresentava eliminação de LLC circulante do sangue e medula óssea por análise de morfologia, citometria de fluxo, citogenética e FISH. Os varrimentos de TAC mostraram resolução da adenopatia anómala como representado nas Figuras 5B e 5C. A remissão completa foi sustentada para além de 8 meses da infusão inicial de células CART19.

Considerações sobre a razão de CART19 efetora para célula alvo de LLC *in vivo*

Estudos pré-clínicos mostraram que grandes tumores poderiam ser removidos, e que a infusão de $2,2 \times 10^7$ CARs poderia erradicar tumores compreendidos de 1×10^9 células, para uma razão E:T *in vivo* de 1:42 em murganhos humanizados (Carpenito *et al.*, 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:3360-3365), embora estes cálculos não tomassem em consideração a expansão das células T após a injeção. A avaliação da carga tumoral de LLC permitiu ao longo do tempo o cálculo da redução tumoral e das razões E:T de CART19 estimadas atingidas *in vivo* nos três indivíduos com base no número de células T CAR+ infundidas. As cargas tumorais foram calculadas por medição da carga de LLC na medula óssea, sangue e tecidos linfoides secundários. As cargas tumorais da linha de base como mostradas na Figura 10 indicam que cada doente tinha células de LLC na ordem de 10^{12} (isto é,

uma carga tumoral de 1 kg) antes da infusão de CART19. O doente UPN 03 tinha uma carga tumoral calculada da linha de base de $8,8 \times 10^{11}$ células de LLC na medula óssea no dia -1 (isto é, pós-quimioterapia e pré-infusão de CART19), e uma massa tumoral medida em tecidos linfoïdes secundários de $3,3-5,5 \times 10^{11}$ células de LLC, dependendo do método de análise de varrimento de CT volumétrica. Dado que UPN 03 foi infundido com apenas $1,4 \times 10^7$ células CART19, usando a estimativa da carga tumoral total inicial ($1,3 \times 10^{12}$ células de LLC), e que não são detetadas células de LLC após o tratamento, foi conseguido uma impressionante razão E:T de 1:93.000. Por cálculos semelhantes, um razão E:T eficaz *in vivo* de 1:2200 e 1:1000 foi calculada para UPN 01 e UPN 02, como mostrado na Tabela 3). No final, uma contribuição de morte em série por células T CART19, combinada com expansão *in vivo* de CART19 de >1.000 vezes contribuiu provavelmente para os poderosos efeitos anti-leucémicos mediados pelas células CART19.

As células T que expressam receptores quiméricos estabelecem poderosos efeitos antitumorais e de memória nos doentes com leucemia avançada

A expressão *in vivo* limitada e a função efetora dos CARs foi uma limitação central nos ensaios que testam os CARs de primeira geração (Kershaw *et al.*, 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115; Lamers *et al.*, 2006, J Clin Oncol 24: e20-e22; Lavre *et al.*, 2008, Blood, 112, 2261-2271; Park *et al.*, 2007, Mol Ther 15:825833; Pule *et al.*, 2008, Nat Med 14:1264-1270). Com base na modelação pré-clínica que demonstra persistência aumentada dos CARs contendo um módulo de sinalização 4-1BB (Milone *et al.*, 2009, Mol Ther. 17:1453-1464; Carpenito *et al.*, 2009, Proc Nalt Acad Sci

USA 106:3360-3365), foram concebidas experiências para desenvolver uma segunda geração de CARs manipulados com tecnologia de vetor lentiviral. Verificou-se que esta segunda geração de CARs é segura em cenário de infecção crónica por HIV (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103:17372-17377). Os presentes resultados mostram que quando esta segunda geração de CAR foi expressa em células T e cultivadas sob condições concebidas para promover o enxerto de células T de memória central (Rapoport et al., 2005, Nat Med 11:1230-1237; Bondanza et al., 2006, Blood 107:1828-1836), foi observada expansão melhorada de células T CAR após infusão comparativamente aos relatórios anteriores. As células CAR19 estabeleceram memória celular específica de CD19, e mataram células tumorais com razões E:T *in vivo* não previamente conseguidas.

CAR19 é o primeiro ensaio de CAR para incorporar um domínio de sinalização 4-1BB e o primeiro a usar a tecnologia do vetor lentiviral. Os presentes resultados demonstram tráfego eficiente dos CARs para locais de tumor, com o estabelecimento *de facto* de "linfócitos infiltrantes de tumor" que apresentavam especificidade para CD19. A pronunciada expansão *in vivo* permitiu a primeira demonstração de que os CARs recuperados diretamente de doentes podem reter a função efetora *in vivo* durante meses. Um estudo anterior tinha sugerido que a introdução de um CAR de primeira geração em células T específicas de vírus é preferível a células T primárias (Pule et al., 2008, Nat Med 14:1264-1270), contudo os resultados com CARs da segunda geração introduzidos em células T primárias otimamente co-estimuladas coloca esta noção em causa. Sem se pretender estar limitado por qualquer teoria particular, uma observação de cautela é colocada de que os efeitos

clínicos foram profundos e sem precedentes com a lise de cargas tumorais de tamanho de kg em todos os três doentes, acompanhada pela libertação retardada de altos níveis potencialmente perigosos de citocinas em dois dos doentes. Não foram observados os tempestuosos efeitos clássicos das citocinas. Contudo, o presente estudo foi concebido para mitigar esta possibilidade pela infusão deliberada de CART19 durante um período de três dias.

Verificou-se que doses muito baixas de CARs podem induzir potentes respostas clínicas. Este foi um estudo piloto que demonstrou a segurança da conceção do vetor CART19. A observação de que doses de células CART19 várias ordens de grandeza abaixo daquelas testadas em ensaios anteriores podem ter benefício clínico, pode ter implicações importantes para a implementação futura da terapia de CAR numa escala mais ampla, e para a conceção de ensaios para testar CARs dirigidos contra alvos diferentes de CD19.

Os presentes estudos indicam ainda que CART19 é expresso em células T efetoras e de memória central, e isto contribui provavelmente para a sua sobrevivência a longo prazo comparativamente aos relatórios anteriores. Sem se pretender estar limitado por qualquer teoria particular, as células T CAR podem-se diferenciar *in vivo* num estado de tipo memória central após encontro e subsequente eliminação de células alvo (por exemplo, células tumorais de LLC ou células B normais) que expressam o antígeno substituto. De facto, a sinalização de 4-1BB foi reportada como promovendo o desenvolvimento de memória no contexto de sinalização de TCR (Sabbagh *et al.*, 2007, Trends Immunol 28:333-339).

A proliferação e sobrevivência prolongadas de CART19 revelaram aspectos da farmacocinética das células T CAR que não tinham sido previamente reportadas. Foi observado que a cinética da libertação de citocina no soro e medula se correlaciona com os níveis de pico de CART19, assim sendo é possível que o decaimento seja iniciado quando alvos celulares que expressam CD19 se tornam limitantes. O mecanismo da sobrevivência prolongada de CART19 pode estar relacionado com a incorporação acima mencionada do domínio 4-1BB ou com a sinalização através de CAR e/ou TCR natural. Uma possibilidade intrigante é que a sobrevivência prolongada esteja relacionada com a população de CART19 que foi identificada em espécimes de medula, suscitando a hipótese de que os CARs CD19 poderiam ser mantidos por encontro com precursores de células B na medula óssea. Relacionado com esta questão é o que leva à expansão inicial de células CAR19 *in vivo*? Com raras exceções (Savoldo et al., 2011, J Clin Invest doi: 10.1172/JCI46110; Pule et al., 2008, Nat Med 14:1264-1270), o presente estudo é o único ensaio que omitiu infusões de IL-2, de modo que as células CART19 expandiram-se provavelmente em resposta a citocinas homeostáticas ou, mais provavelmente, a CD19 expresso em alvos leucémicos e/ou em células B normais. Neste último caso, isto poderia ser uma característica atrativa para CARs direcionados contra alvos em APCs normais, tais como CD19 e CD20, uma vez que é possível que a auto-renovação de CART19 ocorra em células normais, proporcionando um mecanismo para a memória de CAR por meio de "auto vacinação/reforço" e consequentemente, imuno-vigilância tumoral a longo prazo. Os mecanismos da homeostasia de CART19 podem requerer estudo adicional para explicar os mecanismos celulares intrínsecos e extrínsecos da persistência. Anteriormente a estes resultados, a

maioria dos investigadores viam a terapia de CAR como uma forma transiente de imunoterapia, contudo os CARs com domínios de sinalização otimizados podem ter um papel na indução e consolidação da remissão, assim como para imuno-vigilância a longo prazo.

Potentes efeitos anti-leucémicos foram observados em todos os três doentes, incluindo dois doentes com leucemia deficiente em p53. Estudos anteriores com CARs tiveram dificuldade em separar os efeitos antitumorais da quimioterapia de linfodepleção. Contudo, a libertação retardada de citocinas combinada com a cinética de lise tumoral em doentes refratários a fludarabina que eram coincidentes, e possivelmente dependentes da expansão de CAR *in vivo* no presente estudo, indicam que CART19 medeia potentes efeitos antitumorais. Os presentes resultados não excluem um papel para a quimioterapia na potenciação dos efeitos dos CARs.

Uma exaustiva comparação dos processos de fabrico do vetor, transgene e célula com resultados de estudos em curso noutras centros pode ser requerida para se obter uma compreensão plena das características chave requeridas para obter função sustentada *in vivo* de células T CAR. Ao contrário das terapias de anticorpo, as células T modificadas por CAR têm o potencial para replicar *in vivo*, e a persistência a longo prazo pode conduzir a controlo tumoral sustentado. A disponibilidade de uma terapia imediata compreendida por células T assassinas resistentes não-cruzadas tem o potencial para melhorar o desfecho de doentes com malignidades da célula B. Uma limitação da terapia de anticorpo, como por exemplo, com agentes tais como rituximab e bevacizumab, é que a terapia requer

repetidas infusões de anticorpo, e isso é incómodo e caro. A distribuição de terapia de anticorpo prolongada (neste caso durante pelo menos 6 meses, em 3 dos 3 doentes tratados até agora) com scFv anti-CD19 expresso em células T após uma única infusão de células CART19 tem uma série de vantagens práticas, incluindo conveniências e poupança de custos.

Exemplo 2: Células T modificadas por recetor de抗原 quimérico em leucemia linfoides crônica

Foi concebido um vetor lentiviral que expressa um recetor de抗原 quimérico com especificidade para o抗原 CD19 de célula B, acoplado com os domínios de sinalização CD137 (um recetor co-estimulador em células T [4-1BB]) e CD3-zeta (um componente de transdução de sinal do recetor do抗原 de célula T). Foi observado que uma baixa dose (aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células por kg de peso corporal) de células T modificadas por recetor de抗原 quimérico autólogo reinfundidas num doente com leucemia linfocítica crônica refratária (LLC) se expandiram a um nível que foi mais de 1000 vezes tão alto como o nível inicial do enxerto *in vivo*. Foi também observado que o doente apresentou desenvolvimento retardado da síndrome de lise tumoral e com remissão completa.

Para além da síndrome de lise tumoral, o outro único efeito tóxico de grau 3/4 relativo às células T do recetor de抗原 quimérico foi a linfopenia. As células manipuladas persistiram em altos níveis durante pelo menos 6 meses no sangue e na medula óssea e continuaram a expressar o recetor de抗原 quimérico. Uma resposta imune específica foi detetada na medula óssea, acompanhada

de perda de células B normais e de células da leucemia que expressam CD19. A remissão decorreu 10 meses após o tratamento. A hipogamaglobulinemia foi um efeito tóxico crónico previsto.

Os materiais e métodos empregados nestas experiências são agora descritos.

Materiais e métodos

Procedimentos do estudo

Foi concebido um vetor lentiviral auto-inativante (GeMCRIS 0607-793) que foi sujeito a teste de segurança pré-clínica, como reportado previamente (Milone *et al.*, 2009, Mol Ther, 17: 1453-64). Os métodos de preparação de células T foram também previamente descritos (Porter *et al.*, 2006, Blood, 107:1325-31). A análise quantitativa da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para detetar células T de recetor de antígeno quimérico no sangue e medula óssea. O limite inferior de quantificação foi determinado a partir da curva padrão; os valores médios abaixo do limite inferior de quantificação (isto é, reportáveis mas não quantificáveis) são considerados aproximados. O limite inferior de quantificação do ensaio foi 25 cópias por micrograma de ADN genómico.

A análise do fator solúvel foi realizada com a utilização do soro de sangue completo e medula óssea que foram separadas em alíquotas para utilização única e armazenadas a -80°C. A quantificação de fatores de citocina solúveis foi realizada com a utilização da tecnologia de matriz de esfera e reagentes Luminex (Life Technologies).

Aférese N°1

Um procedimento de aférese de 12-15 litros é realizado no centro de aférese. As células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) são obtidas para a geração de célula T CART-19 durante este procedimento. De uma única leucáfereze, pelo menos 50×10^9 glóbulos brancos são recolhidos para fabricar células T CART-19. Os leucócitos de sangue de linha de base também são obtidos e criopreservados.

Quimioterapia citorredutora

A quimioterapia é iniciada aproximadamente 5-10 dias antes da infusão, de modo que as células CART-19 possam ser dadas 1-2 dias após conclusão da quimioterapia. O momento do início da quimioterapia depende assim do comprimento do regime. A finalidade da quimioterapia é induzir linfopenia a fim de facilitar o enxerto e expansão homeostática das células CART-19. A quimioterapia pode também ser escolhida para reduzir a carga tumoral da doença. A quimioterapia citorredutora é escolhida e administrada por oncologistas comunitários. A escolha da quimioterapia depende da doença subjacente aos doentes e de terapias prévias. Fludarabina (30 mg/m²/dia x 3 dias) e ciclofosfamida (300 mg/m²/dia x 3 dias) são os agentes de escolha, uma vez que existe muita experiência com a utilização destes agentes para facilitar a imunoterapia adotiva. São apropriados outros regimes aceitáveis usando fármacos aprovados pelo FDA, incluindo CHOP, HyperCVAD, EPOCH, DHAP, ICE ou outros regimes.

Análise da reavaliação tumoral

Uma reavaliação tumoral limitada é realizada no final da quimioterapia a fim de proporcionar medições da carga tumoral da linha de base. Isto inclui avaliações de imagiologia, exame físico e doença residual mínima (MRD). Os indivíduos submetem-se ao seguinte para o teste de pré-infusão: exame físico, documentação de eventos adversos e recolha de sangue para ensaio hematológico, químico e de gravidez (se aplicável).

Preparação de células T CART-19

Células T autólogas são manipuladas para expressar um anticorpo extracelular de cadeia simples (scFv) com especificidade para CD19. O scFv extracelular pode redirecionar a especificidade das células T transduzidas para células que expressam CD19, uma molécula que é restringida na expressão à superfície das células malignas e células B normais. Para além de scFv CD19, as células são transduzidas para expressar uma molécula de sinalização intracelular compreendida da cadeia TCR ζ ou de um domínio de sinalização tandem compreendido dos módulos de sinalização 4-1BB e TCR ζ . O scFv é derivado de um anticorpo monoclonal de murganho e contém assim sequências de murganho, e os domínios de sinalização são inteiramente de sequências humanas nativas. As células T CART-19 são produzidas através de isolamento de células T por aférese, e usando tecnologia do vetor lentiviral (Dropulic *et al.*, 2006, Human Gene Therapy, 17: 577-88; Naldini *et al.*, 1996, Science, 272: 263-7; Dull *et al.*, 1998, J Virol, 72: 8463-71) para introduzir o scFv:TCR ζ :4-1BB em células T CD4 e CD8. Em alguns doentes, um controlo de scFv:TCR ζ : é introduzido numa porção das células para uma experiência

competitiva de repopulação. Estes receptores são "universais" uma vez que ligam antígeno de um modo independente de MHC, assim, uma construção de receptor pode ser usada para tratar uma população de doentes com tumores positivos para o antígeno CD19.

As construções de CAR foram desenvolvidas na Universidade da Pensilvânia, e o vetor de grau clínica foi produzido na Lentigen Corporation. As células CART-19 são produzidas na Clinical Cell and Vaccine Production Facility na Universidade da Pensilvânia de acordo com o processo mostrado na Figura 11. No final das culturas celulares, as células são criopreservadas em crio-meio infusível. Uma única dose de células T transduzidas com CART-19 compreendendo a infusão de $2,5 \times 10^9$ a 5×10^9 células totais, é administrada em 1 ou 2 sacos. Cada saco contém uma alíquota (volume dependente da dose) de crio-meio contendo os seguintes reagentes de grau infusível (%v/v): 31,25 plasmalyte-A, 31,25 dextrose (5%), 0,45 NaCl, até 7,50 DMSO, 1,00 dextrano 40, 5,00 albumina de soro humano com cerca de $2,5-5 \times 10^9$ células T autólogas por saco. Para maior segurança, a primeira dose é dada como uma dose desdobrada nos dias 0, 1 e 2, com ~10% das células no dia 0, 30% no dia 1 e 60% no dia 2.

Armazenamento

Os sacos (10 a 100 mL de capacidade) contendo células T transduzidas com CART-19 são armazenados em condições de banco de sangue num congelador a -135°C monitorizado. Os sacos de infusão são armazenados no congelador até serem necessários.

Descongelação de células

Após registo das células na farmácia de investigação, as células congeladas são transportadas em gelo seco até à cabeceira do indivíduo. As células são descongeladas na cabeceira, um saco de cada vez, usando um banho de água mantido a 36°C a 38°C. O saco é suavemente massajado até as células terem acabado de descongelar. Não deve haver quaisquer grumos congelados deixados no recipiente. Se o produto de células CART-19 parecer ter um saco danificado ou vertido ou então parece estar afetado, não deve ser infundido,

Pré-medicação

Os efeitos secundários que se seguem às infusões de células T podem incluir febre, arrepios e/ou náuseas transientes. Recomenda-se que o indivíduo seja pré-medicado com acetaminofeno 650 mg por via oral e cloridrato de difenidramina 25-50 mg por via oral ou I.V., antes da infusão das células CART-19. Estas medicações podem ser repetidas cada seis horas, se necessário. Pode ser prescrito um programa de medicação anti-inflamatória não-esteroide se o doente continuar a ter febre não aliviada pelo acetaminofeno. Recomenda-se que doente não receba de forma alguma, corticosteroides sistémicos, tais como hidrocortisona, prednisona, prednisolona (Solu-Medrol) ou dexametasona (Decadron), exceto no caso de uma emergência com risco de vida, uma vez que estes podem ter um efeito adverso nas células T. Se forem necessários corticosteroides para uma reação de infusão aguda, é recomendada uma dose inicial de 100 mg de hidrocortisona.

Administração/infusão

As infusões começam 1 a 2 dias após conclusão da quimioterapia. O dia das primeiras infusões, os doentes têm uma contagem sanguínea completa com diferencial, e avaliação das contagens de CD3, CD4 e CD8 uma vez que a quimioterapia é dada em parte para induzir linfopenia. Sem se pretender estar limitado por qualquer teoria particular, crê-se que uma dose inicial i.v. de $2,5-5 \times 10^9$ células CART-19 seja ótima para este protocolo. Porque existem cerca de 1×10^{12} células T num adulto saudável, a dose total proposta é equivalente a cerca de 0,5% da massa corporal total de células T (Roedere, 1995, Nat Med, 1: 621-7; Macallan et al., 2003, EUR J Immunol, 33: 2316-26). A primeira dose é administrada usando uma dose desdoblada nos dias 0 (10%), 1 (30%) e 2 (60%). Os indivíduos recebem a infusão numa sala isolada. As células são descongeladas na cabeceira do doente como aqui descrito noutra parte. As células descongeladas são dadas a uma taxa de infusão tão rapidamente quanto tolerado, de modo que a duração da infusão seja aproximadamente 10-15 minutos. As células T transduzidas são administradas por infusão intravenosa rápida, a um caudal de aproximadamente 10 mL a 20 mL por minuto através de um conjunto sanguíneo tipo Y sem látex de calibre 18 com uma torneira de 3 vias. A duração da infusão é aproximadamente 15 minutos. Um ou dois sacos de células modificadas com CART-19 são transferidos para o gelo, e as células são administradas ao indivíduo enquanto frias. Nos indivíduos que recebem misturas de células CART-19, a fim de facilitar a mistura, as células são administradas simultaneamente usando um adaptador em Y. Os indivíduos são infundidos e pré-medicados como aqui descrito noutra parte. Os sinais vitais dos indivíduos são avaliados e oximetria

de pulso é feita antes da dosagem, no fim da infusão e posteriormente cada 15 minutos durante 1 hora e até que esta seja estável e satisfatória. Uma amostra de sangue para determinação do nível de CART-19 de linha de base é obtida antes da infusão e 20 minutos pós-infusão. Os doentes que sofrem toxicidades da sua quimioterapia citorredutora anterior têm o seu plano de infusão atrasado até estas toxicidades se resloveram. As toxicidades específicas que justificam o atraso das infusões de células T incluem: 1) Pulmonar: necessidade de oxigénio suplementar para manter a saturação maior que 95% ou presença de anomalias radiográficas no raio X do peito que são progressivas; 2) Cardíaca: nova arritmia cardíaca não controlada com gestão médica. 3) Hipotensão que exige suporte de pressor. 4) Infeção ativa: culturas sanguíneas positivas para bactérias, fungos ou vírus dentro de 48 horas da infusão de células T. Uma amostra de soror para potássio e ácido úrico é recolhida antes da primeira infusão, assim como duas horas após cada infusão subsequente.

Análises laboratoriais pós-infusão para avaliar o enxerto e a persistência

Os indivíduos voltam no dia 4 e 10 após a infusão inicial de células CART-19 para recolha de sangue para níveis séricos de citocinas, e PCR de CART-19 a fim de avaliar a presença de células CART-19. Os indivíduos voltam uma vez por semana durante três semanas para se submeterem ao seguinte: exame físico, documentação de eventos adversos e recolha de sangue para hematologia, química, enxerto e persistência das células CART-19 e para laboratórios de investigação.

Segunda infusão

Sem se pretender estar limitado por qualquer teoria particular, crê-se que uma segunda dose de células CART-19 pode ser dada no dia 11 aos doentes, desde que apresentem tolerância adequada à primeira dose e tenham sido produzidas suficientes células CART-19. A dose é $2-5 \times 10^9$ células totais. Uma amostra de soro para potássio e ácido úrico pode ser recolhida duas horas após a infusão,

Segunda aférese

Um procedimento de aférese de 2 L é realizado no centro de aférese. PBMC são obtidas para investigação e criopreservadas. Os indivíduos submetem-se ao seguinte: exame físico, documentação de eventos adversos e recolha de sangue para hematologia, química, enxerto e persistência das células CART-19 e para laboratórios de investigação. Além disso, é feita reavaliação tumoral a fim de proporcionar medições da carga tumoral. O teste de reavaliação tumoral é determinado pelo tipo de doença e inclui imagiologia, avaliações de MRD, aspirados de medula óssea e biópsia e/ou biópsia dos nódulos linfáticos.

Avaliações mensais 2 a 6 meses pós-infusão

Os indivíduos voltam numa base mensal durante 2 a 6 meses pós-infusão de células CART-19. Nestas visitas do ensaio, os indivíduos submetem-se ao seguinte: medicação concomitante, exame físico, documentação de eventos adversos e recolha de sangue para hematologia, química, enxerto e persistência das células CART-19 e para

laboratórios de investigação. O ensaio de ADN do HIV é realizado nos meses 2-6 pós-infusão de células CART-19 para excluir a presença de RCL detetáveis.

Avaliações trimestrais até 2 anos pós-infusão

Os indivíduos são avaliados numa base trimestral até 2 anos pós-infusão. Nestas visitas do ensaio, os indivíduos submetem-se ao seguinte: medicação concomitante, exame físico, documentação de eventos adversos e recolha de sangue para hematologia, química, enxerto e persistência das células CART-19 e para laboratórios de investigação. O ensaio de ADN do HIV é realizado nos 3 e 6 meses pós-infusão de células CART-19 para excluir a presença de RCL detetáveis.

Os resultados das experiências são agora descritos.

História do doente

O doente recebeu um diagnóstico de LLC de fase I em 1996. Ele primeiro necessitou de tratamento após 6 anos de observação para leucocitose progressiva e adenopatia. Em 2002, foi tratado com dois ciclos de rituximab mais fludarabina; este tratamento conduziu à normalização das contagens sanguíneas e à resolução parcial da adenopatia. Em 2006, recebeu quatro ciclos de rituximab e fludarabina para a progressão da doença, novamente com normalização das contagens sanguíneas e regressão parcial da adenopatia. Esta resposta foi seguida por um intervalo de 20 meses sem

progressão e por um intervalo sem tratamento de 2 anos. Em Fevereiro de 2009, apresentou leucocitose rapidamente progressiva e a adenopatia recorrente. A sua medula óssea estava extensivamente infiltrada com LLC. A análise citogénica mostrou que 3 de 15 células continham uma deleção do cromossoma 17p e o ensaio de hibridação *in situ* de fluorescência (FISH) mostrou que 170 de 200 células tinham uma deleção envolvendo TP53 no cromossoma 17p. Ele recebeu rituximab com bendamustina durante um ciclo e três ciclos adicionais de bendamastina sem rituximab (devido a uma reação alérgica grave). Este tratamento resultou apenas a melhoria transiente na linfocitose. A adenopatia progressiva foi documentada por meio de tomografia Axial computorizada (TAC) após terapia.

Células T autólogas foram recolhidas por meio de leucaférrese e criopreservadas. O doente depois recebeu alemtuzumab (um anticorpo monoclonal dirigido à superfície celular de linfócito maduro anti-CD52) durante 11 semanas, com hematopoiese melhorada e uma resolução parcial da adenopatia. Durante os 6 meses seguintes, tinha doença estável com envolvimento persistente e extensivo da medula e adenopatia difusa com múltiplos nódulos linfáticos de 1 a 3 cm. Em julho de 2010, o doente foi registado num ensaio clínico de fase 1 de células T modificadas por recetor de anticorpo quimérico,

Infusões celulares

Células T autólogas do doente foram descongeladas e transduzidas com lentivírus para expressar o recetor de anticorpo quimérico específico para CD19 (Figura 12A); os identificadores de sequência para o vetor lentiviral e as

sequências relevantes são apresentadas na Tabela 5. Quatro dias antes da infusão de células, o doente recebeu quimioterapia concebida para depleção dos linfócitos (pentostatina a uma dose de 4 mg por metro quadrado de área superficial corporal e ciclofosfamida a uma dose de 600 mg por metro quadrado) sem rituximab (Lamanna *et al*, 2006, J Clin Oncol, 24: 1575-81). Três dias após a quimioterapia, mas antes da infusão de células, a medula óssea estava hipercelular com aproximadamente 40% de envolvimento por LLC. As células de leucemia expressaram a cadeia leve kappa e CD5, CD19, CD20 e CD23. A análise citogénica mostrou dois clone separados, resultando ambos na perda do cromossoma 17p e do locus TP53 (46,XY,del(17)(p12)[5]/46,XY,der(17)t(17;21)(q10;q10)[5]/46,XY[14]). Quatro dias após a quimioterapia, o doente recebeu um total de 3×10^8 células T, das quais 5% foram transduzidas, para um total de $1,42 \times 10^7$ células transduzidas ($1,46 \times 10^5$ células por kg) desdobradas em três infusões intravenosas diárias consecutivas (10% no dia 1, 30% no dia 2 e 60% no dia 3). Não foram administradas citocinas pós-infusão. Não foram assinalados efeitos tóxicos das infusões.

Tabela 5: Identificadores de sequência para o vetor de transferência pELPS-CD19-BBz

SEQ ID N°: N°	IDENTIDADE
SEQ ID N°: 1	vetor de transferência pELPS-CD19-BBz (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 2	RSV's U3 (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 3	Repetição HIV R (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 4	Repetição HIV U5 (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 5	Gag/Pol parcial (sequência de ácidos nucleicos)

SEQ ID N°: N°	IDENTIDADE
SEQ ID N°: 6	cPPT (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 7	Promotor alfa EF1 (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 8	CD 19-BBzeta CAR (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 9	Hu marmota PRE (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 10	Repetição R (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 11	Repetição U5 (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 12	CD19-BBzeta CAR (sequência de aminoácidos)
SEQ ID N°: 13	Líder CD8 (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 14	Anti-CD19scFv (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 15	Charneira CD8 (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 16	Transmembrana CD8 (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 17	4-IBB (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 18	CD3zeta (sequência de ácidos nucleicos)
SEQ ID N°: 19	Líder CD8 (sequência de aminoácidos)
SEQ ID N°: 20	Anki-CD19scFv (sequência de aminoácidos)
SEQ ID N°: 21	Charneira CD8 (sequência de aminoácidos)
SEQ ID N°: 22	Transmembrana CD8 (sequência de aminoácidos)
SEQ ID N°: 23	4-1BB (sequência de aminoácidos)
SEQ ID N°: 24	CD3zeta (sequência de aminoácidos)

Resposta e avaliações clínicas

Catorze dias após a primeira infusão, o doente começou a ter arrepios e febres baixas associados com fadiga de grau 2. Durante os 5 dias seguintes, os arrepios intensificaram-se e sua temperatura aumentou para 39,2°C (102,5°F),

associada a tremores, diaforese, anorexia, náuseas e diarreia. Não tinha qualquer sintoma respiratório ou cardíaco. Devido às febres, foram realizados radiografia ao peito e culturas de sangue, urina e fezes, e foram todos negativos ou normais. A síndrome de lise tumoral foi diagnosticada no dia 22 após a infusão (Figura 12B). O nível de ácido úrico era 10,6 mg por decilitro (630,5 µmol por litro), o nível de fósforo era 4,7 mg por decilitro (1,5 mmol por litro) (gama normal, 2,4 a 4,7 mg por decilitro [0,8 a 1,5 mmol por litro]), e o nível de lactato desidrogenase era U 1130 por litro (gama normal, 98 a 192). Havia uma evidência de lesão renal aguda, com um nível de creatinina de 2,60 mg por decilitro (229,8 µmol por litro) (nível de linha de base, <1,0 mg por decilitro [<88,4 µmol por litro]). O doente foi hospitalizado e tratado com fluido de ressuscitação e rasburicase. O nível de ácido úrico voltou à gama normal dentro de 24 horas e o nível de creatinina no prazo de 3 dias; ele saiu do hospital no dia 4. O nível de lactato desidrogenase diminuiu gradualmente, tornando-se normal ao longo do seguinte mês.

No dia 28 após a infusão de células CART19, a adenopatia não era já palpável e no dia 23 não havia nenhuma evidência de LLC na medula óssea (Figura 12C). O cariótipo era agora normal em 15 de 15 células (46, XY), e o teste de FISH era negativo para a deleção TP53 em 198 de 200 células examinadas; isto é considerado como estando dentro dos limites normais em controlos negativos. A análise por citometria de fluxo não mostrou qualquer LLC residual e as células B não eram detetáveis (<1% de células dentro da seleção de linfócito CD5+CD10-CD19+CD23+). Varrimento de TAC realizada no dia 31 após a infusão mostrou resolução da adenopatia (Figura 12D).

Três e 6 meses após a infusão de células CART19, o exame físico permaneceu normal, sem adenopatia palpável e um varrimento de TAC realizado 3 meses após a infusão de células CART19 mostrou remissão sustentada (Figura 12D). Estudos de medula óssea em 3 e 6 meses também não mostraram qualquer evidência de LLC por meio de análise morfológica, análise de cariotípico (46, XY) ou análise por citometria de fluxo, também com uma falta continuada de células B normais. A remissão tinha sido sustentada durante pelo menos 10 meses.

Toxicidade das células CAR19

As infusões de células tiveram efeitos tóxicos não agudos. O único evento adverso sério (grau 3 ou 4) assinalado foi a síndrome de lise tumoral de grau 3 descrita acima. O doente tinha linfopenia de grau 1 na linha de base e linfopenia de grau 2 ou 3 começando no dia 1 e continuando durante pelo menos 10 meses após a terapia. Linfopenia de grau 4, com uma contagem absoluta de linfócitos de 140 células por milímetro cúbico, foi registada no dia 19, mas desde o dia 22 durante pelo menos 10 meses, a contagem absoluta de linfócitos variou entre 390 e 780 células por milímetro cúbico (linfopenia de grau 2 ou 3). O doente tinha trombocitopenia de grau 1 transiente (contagem de plaquetas, 98.000 a 131.000 por milímetro cúbico) do dia 19 ao dia 26 e neutropenia de grau 1 ou 2 (contagem absoluta de neutrófilos, 1090 a 1630 por milímetro cúbico) do dia 17 ao dia 33. Outros sinais e sintomas que foram relacionados provavelmente com o tratamento do ensaio incluíram elevações de grau 1 e 2 nos níveis de aminotransferase e fosfatase alcalina, que se desenvolveram 17 dias após a

primeira infusão e se resolveram no dia 33. Os sintomas constitucionais de grau 1 e 2 consistiram em febres, arrepios, diaforese, mialgias, dores de cabeça e fadiga. A hipogamaglobulinemia de grau 2 foi corrigida com infusões de globulina imune intravenosa.

Análise de citocinas de medula óssea e soro

A resposta clínica do doente foi acompanhada de um aumento retardado nos níveis de citocinas inflamatórias (Figura 13A a Figura 13D), com níveis de interferão- γ , quimiocinas CXCL9 e CXCL10 responsivas a interferão- γ , e interleucina-6 que eram 160 vezes mais altos que os níveis da linha de base. A elevação temporal nos níveis de citocinas corresponderam aos sintomas clínicos, com picos a 17 a 23 dias após a primeira infusão de células CART19.

Os sobrenadantes de aspirados de medula óssea em série foram medidos para citocinas e mostraram evidência de ativação imune (Figura 13E). Foram assinalados aumentos significativos no interferão- γ , CXCL9, interleucina-6 e recetor solúvel de interleucina-2, em comparação aos níveis da linha de base no dia antes da infusão de células T; os valores voltaram a apresentar pico no dia 23 após a primeira infusão de células CART19. O aumento em citocinas de medula óssea coincidiu com a eliminação de células de leucemia da medula. O fator α de necrose tumoral no soro e medula permaneceu inalterado.

Expansão e persistência de células T do recetor de antígenio quimérico

PCR de tempo real detetou ADN que codifica o recetor de抗igénio quimérico anti-CD19 (CAR19) começando no dia 1 após a primeira infusão (Figura 14A). Foi assinalada uma expansão de mais de 3 log das células *in vivo* ao dia 21 após a infusão. A níveis de pico, as células CART19 no sangue eram responsáveis por mais de 20% dos linfócitos circulantes; estes níveis de pico coincidiram com a ocorrência de sintomas constitucionais, a síndrome de lise tumoral (Figura 12B), e elevações nos níveis de citocinas séricas (Figura 13A a Figura 13D). As células CART19 permaneceram detetáveis em altos níveis 6 meses após as infusões, embora os valores tenham diminuído por um fator de 10 dos níveis de pico. O tempo de duplicação das células T de recetor de抗igénio quimérico no sangue foi aproximadamente 1,2 dias, com uma semi-vida de eliminação de 31 dias.

Células T do recetor de抗igénio quimérico na medula óssea

As células CAR19 foram identificadas nos espécimes de medula óssea, começando 23 dias após a primeira infusão (Figura 14B) e persistiram durante pelo menos 6 meses, com uma semi-vida de decaimento de 34 dias. Os níveis mais altos de células CART19 na medula óssea foram identificados na primeira avaliação 23 dias após a primeira infusão e coincidiram com indução de uma resposta imune, como indicado por perfis de secreção de citocinas (Figura 13E). A análise de citometria de fluxo da aspirados de medula óssea indicou uma expansão clonal de células CD5+CD19+ na linha de base que estava ausente 1 mês após a infusão e numa amostra obtida 3 meses após a infusão (dados não mostrados). Células B normais não foram detetadas após o tratamento (Figura 14C).

Tratamento com células CART19 geneticamente modificadas autólogas

É aqui descrito o desenvolvimento retardado da síndrome de lise tumoral e de uma resposta completa 3 semanas após o tratamento com células T autólogas geneticamente modificadas para se direcionarem para CD19 através de transdução com um vetor lentivírus que expressa anti-CD19 ligado a domínios de sinalização CD3-zeta e CD137 (4-1BB). As células geneticamente modificadas estavam presentes em altos níveis na medula óssea durante pelo menos 6 meses após a infusão. A geração de uma resposta imune específica de CD19 na medula óssea foi demonstrada pela libertação temporal de citocinas e pela ablação de células da leucemia que coincidiram com a infiltração de pico de células T do recetor de抗igénio quimérico. O desenvolvimento da síndrome de lise tumoral após imunoterapia celular não tinha sido reportado previamente (Baeksgaard *et al.*, 2003, Cancer Chemother Pharacol, 51: 187-92).

A manipulação genética de células T autólogas para se direcionarem a抗igénios específicos de tumor é uma estratégia atrativa para a terapia do cancro (Sadelain *et al.*, 2009, Curr Opin Immunol, 21: 215-23; Jena *et al.*, 2010, Blood, 116: 1035-44). Uma característica importante da abordagem aqui descrita é que as células T do recetor de抗igénio quimérico podem reconhecer alvos tumorais de um modo não restrito por HLA, de modo que receptores quiméricos de抗igénio "disponíveis imediatamente" possam ser construídos para tumores com uma grande variedade de características histológicas. Vetores lentivirais derivados de HIV foram usados para a terapia do cancro, uma abordagem

que pode ter algumas vantagens sobre a utilização de vetores retrovirais (June *et al.*, 2009, Rev Nat Immunol, 9: 704-16).

Em ensaios anteriores de células T do recetor de抗igénio quimérico, as respostas tumorais objetivas foram modestas, e a proliferação *in vivo* de células modificadas não era sustentada (Kershaw *et al.*, 2006, Clin Cancer Res, 12: 6106-15; Lavre *et al.*, 2008, Blood, 112: 2261-71; Pule *et al.*, 2008, Nat Med, 14: 1264-70). Brentjens e colegas reportaram resultados preliminares de um ensaio clínico de recetores de抗igénio quiméricos direcionados a CD19 ligados a um domínio de sinalização CD28 e observaram respostas tumorais transientes em dois dos três doentes com LLC avançada (Brentjens *et al.*, 2010, Mol Ther, 18: 666-8); contudo, os recetores de抗igénio quiméricos desapareceram rapidamente da circulação.

Era inesperado que a dose muito baixa das células T do recetor de抗igénio quimérico que foram infundidas resultasse numa resposta antitumoral clinicamente evidente. De facto, a dose infundida de $1,5 \times 10^5$ células T do recetor de抗igénio quimérico por kg era diversas ordens de grandeza abaixo das doses usadas em estudos anteriores de células T modificadas para expressar recetores de抗igénio quiméricos ou recetores de células T transgénicos (Kershaw *et al.*, 2006, Clin Cancer Res, 12: 6106-15; Brentjens *et al.*, 2010, Mol Ther, 18: 666-8; Morgan *et al.*, 2010, Mol Ther, 18: 843-51; Johnson *et al.*, 2009, Blood, 114: 535-46). Sem se pretender estar limitado por qualquer teoria particular, é especulado que a quimioterapia pode potenciar os efeitos do recetor de抗igénio quimérico.

A persistência prolongada das células CART19 no sangue e na medula óssea do doente resulta da inclusão do domínio de sinalização 4-1BB. É provável que a eliminação mediada por células CART19 de células B normais, tenha facilitado a indução de tolerância imunológica ao recetor de抗igenio quimérico, uma vez que as células CAR19 que expressam o fragmento de anticorpo de Fv de cadeia simples contendo sequências de murino não foram rejeitadas. Dada a ausência de células de leucemia positivas para CD19 detetáveis neste doente e, sem se pretender estar limitado por qualquer teoria particular, é possível que a homeostasia das células T do recetor de抗igenio quimérico tenha sido conseguida, pelo menos em parte, da estimulação produzida por precursores iniciais de células B à medida que começaram a emergir na medula óssea. A invenção refere-se à descoberta de que pode existir um novo mecanismo para manter células T do recetor de抗igenio quimérico de "memória".

Embora CD19 seja um alvo tumoral atrativo, com expressão limitada a células B normais e malignas, existe a preocupação de que a persistência das células T do recetor de抗igenio quimérico possa mediar deficiência a longo prazo de células B. De facto, no doente, as células B estavam ausentes do sangue e medula óssea durante pelo menos 6 meses após a infusão. Este doente não tinha infeções recorrentes. O direcionamento de células B através de CD20 com rituximab é uma estratégia eficaz e relativamente segura para doentes com neoplasmas da célula B, e a linfopenia da célula B a longo prazo é gerível (Molina, 2008, Ann Rev Med, 59: 237-50). Os doentes tratados com rituximab foram reportados ter um retorno de células B dentro de meses após a descontinuação da terapia.

Não é ainda claro se tal recuperação ocorre em doentes cujas células T anti-células B persistem *in vivo*.

Os doentes que têm LLC com deleções de *TP53* têm curtas remissões após terapias convencionais (Dohner *et al.*, 1995, Blood, 85: 1580-9). A transplantacão alogénica de medula óssea foi a única abordagem que induziu remissões a longo prazo nos doentes com LLC avançada (Gribben *et al.*, 2011, Biol Blood Marrow Transplant, 17: Supl:S63-S70). Contudo, o potente efeito enxerto-contra-tumor resultante está associado a considerável morbidade devido à alta frequência de doença crónica de hospedeiro-contra-enxerto, que é frequentemente especialmente grave em doentes mais idosos - aqueles que são tipicamente afetadas por LLC (Gribben *et al.*, 2011, Biol Blood Marrow Transplant, 17: Supl:S63-S70; Sorror *et al.*, 2008, Blood, 111: 446-52). Os dados aqui apresentados sugerem que as células T autólogas geneticamente modificadas podem contornar esta limitação.

O início retardado da síndrome de lise tumoral e a secreção de citocinas, combinado com vigorosa expansão de células T do recetor de抗igénio quimérico *in vivo* e proeminente atividade antileucemia, aponta para funções efetoras substanciais e sustentadas das células CART19. As experiências aqui descritas destacam a potência desta terapia e proporcionam suporte para o estudo detalhado de células T autólogas geneticamente modificadas para se direcionarem para CD19 (e outros alvos) através de transdução de um recetor de抗igénio quimérico ligado a potentes domínios de sinalização. Ao contrário da terapia mediada por anticorpos, as células T modificadas por recetor de抗igénio quimérico têm o potencial para replicar *in vivo*, e a persistência a longo prazo pode

conduzir ao controlo tumoral sustentado. Outros dois doentes com LLC avançada também receberam infusões de CAR19 de acordo com este protocolo, e todos os três apresentaram respostas tumorais. Estes resultados justificam o estudo continuado de células T redirecionadas para CD19 para neoplasmas de célula B.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

June, Carl H

Porter, David L

Kalos, Michael

Levine, Bruce L

<120> UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS t MODIFICADAS POR RECEPTOR DE ANTIGÉNIO QUIMÉRICO PARA TRATAR O CANCRO

<130> 46483-6001-00-WO.601218

<150> 61/421,470

<151> 2010-12-09

<150> 61/502,649

<151> 2010-06-29

<160> 27

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 9174

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 1

gcgcgctcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa	60
cttaatcgec ttgcagcaca tcccccttgc gccagctggc gtaatagega agaggccgc	120
accgatcgcc ctccccaaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatgggacgc gcccgttagc	180
ggcqcatcaa qcgccggcggg tgtgggttgtt acgcccacgg tgaccgctac acttgccage	240
gccctagegc ccgcctccctt cgcttccttc cttcccttc tcgcacgtt cgccggcttt	300
ccccgtcaag ctctaaatcg ggggctccctt ttagggttcc gatttagtgc ttacggcac	360
ctcgacccca aaaaacttga ttaggggtat gggtcacgtt gtggccatc gcccgtata	420
acgggttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact ctgtttccaa	480
actggAACAA cactcaaccc tatctcggtt tattctttt atttataagg gatTTGccg	540
atttccggct attggtaaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaatttttaac	600
aaaatattaa cgcttacaat ttaggtggca cttttgggg aaatgtgcgc ggaaccctta	660
tttggattt tttctaaata cattcaaata tgtatccgt catgagacaa taaccctgat	720
aaatgcttca ataataattga aaaaggaaga gtatgagttt tcaacatttc cgtgtccccc	780
ttatccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccaggaa acgctgggtga	840
aagtaaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca	900

acagcggtaa gatcctttag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt	960
ttaaagttct gctatgtggc gggttattat ccgttattga cccggggcaa gagcaactcg	1020
gtcgcggcat acactattct cagaatgact tggtttagta ctcaccagtc acagaaaage	1080
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata	1140
acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgctttt	1200
tgcacaacat ggggatcat gtaactcgcc ttgatcggt ggaaccggag ctgaatgaag	1260
ccatacaaa cgacgagcgt gacaccacqa tgcctgtgc aalggcaaca acqttqcgc	1320
aactattaac tggcgaacta cttaactctag cttccggca acaattaata gactggatgg	1380
aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcgccct tcggctggc tggtttattg	1440
ctgatataatc tggagccgggt gagcglgggl ctcgoggtat cattgcagca ctggggcag	1500
atggtaagec ctccccgtatc gtatgttatct acacgacggg gagtccaggca actatggatg	1560
aacgaaatag acagatcqct gagataggtg ctcactgtat taagcattgg taactgtcag	1620
accaagtttata ctcatatata cttagattt atttaaaact tcattttaa tttaaaagga	1680
ttaggtgaa gatcctttt gataatctca tgacaaaaat coontaacgt gagttttcg	1740
tccactgace gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgatgat ccttttttc	1800
tgccgtataa ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgtt accagcgggtg gtttgttgc	1860
cggatcaaga gctaccaact ctlllccga aggttaactgg cttagcaga ggcagataac	1920
caaatactgt tcttcttagtg tagccgtatg taggccacca cttaagaacat tctgttagcac	1980
cgcctacata ccccgctctg ctaatcctgt taccoagtggc tgcgtccagt ggcgataagt	2040
cgtgttttac cgggttggac tcaagacgtt agttaccgga taaggcgcag cggcgggt	2100
gaacgggggg ttctgtcaca cagccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat	2160
acctacagcg ttagtctatga gaaagcgcaca cgttcccgaa aaggagaaaag gccgacaggt	2220
atcccgtaag cggcagggtc ggaacaggag aqgcacgag ggagcttcca gggggaaacg	2280
cctggatatct ttatagtcct gtcgggttcc gccacctctg acttgagcgt cgtttttgt	2340
gatgtctgtc aggggggggg agcctatggaa aaaacgcccag caacggggcc tttttacgg	2400
tcctggccat ttctgtggct tttgttcaca tgcgttaccc tgcgttaccc cctgattctg	2460
tggataaccq tattaccgccc tttgagttagt ctgatacgcg tgcgcgcacq cgaacgaccg	2520
agcgcacgca gtcagtgcgc gaggaagcgg aagagcgcac aatacgcacaa cccctctcc	2580
ccgcgcgttgc cccgatccat taatgcacgt ggcacgcacag gttcccgac tgaaagcgg	2640
gcagtgagcg caacgcattt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac	2700
actttatgtt cccggctgt atgttgcgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag	2760

gaaacagota tgaccatgat tacgccaagg gcgcattaa cccctactaa agggacaaa 2820
agctggagct gcaagttaa tttgtttaa tgcaatactc ttgttagtott gcaacatgg 2880
aacatggagt tagcaacatg ctttacaagg agagaaaaag caccgtcat gccgatgg 2940
ggaagtaagg tggtacgatc gtgccttatt aggaaggcaa cagacgggtc tgacatggat 3000
tggacgaaacc acilgaattgc cgcattgcag agatattgtt ttttaagtgcc tagctcgata 3060
cataaaacggg tctctcttgt tagaccagat ctgagcttgg gagctcttgc gctaactagg 3120
gaacccactg cttaagctc aataaaqctt gccttgagtg cttaagtag tagtgtgccc 3180
tctgttgtgt gactctggta actagagatc ctcagaccc ttttagtcaag tttggaaaat 3240
ctcttagcagt ggccgcggaa cagggacttgc aaagcgaaag gggaaaccaga ggagctctc 3300
cgacgcaggga ctgcgttgc tgaagcgccgc acggcaagag gcgacggggcg ggcacttgg 3360
agtaegccaa aaattttgac tagcggaggc tagaaggaga gagatgggtg cgagagcg 3420
agtattaaac gggggagaat tagatcgaga tggggaaaaat ttccgttaag gccagggg 3480
aagaaaaaat ataaaattaa acatatagtt tggcaagea gggagctaga acgattcg 3540
gttaatccctg gcctgtttaga aacatcagaa ggctgttagac aaatactgg acagctacaa 3600
ccatcccttc agacaggatc agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc 3660
ttttgtgtgc atcaaaggat agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagalagag 3720
gaagagcaaa acaaaagttaa gaccacccgc cagcaagccgg ccgcgtatct tcagaccc 3780
aggaggagat atgagggaca attggagaag tgaatttatataaataaaat taqtaaaaat 3840
tgaaccatata ggagtagcac ccaccaaggc aaagagaaga gtgtgtcaga gagaaaaaaag 3900
agcagtggaa ataggagctt tggccgttgg gttttggaa gcagcaggaa gcaactatgg 3960
ccgcagcgatca atgacgtga cggtacaggc cagacaattt ttgtctggta tagtgcagca 4020
gcagaacaat ttgtgtggg ctattgaggg gcaacagcat ctgttgcaac tcacagtctg 4080
gggcattcaag cagcccccagg caagaatctt ggctgtggaa agatcacata aggatcaaca 4140
gtctctgggg atttgggtt gctctggaaa actcatttgc accactgctg tgccttggaa 4200
tgcgtttgg agtaataaaat ctctggaaaca gatttggaaat cacacgacat ggtggagtg 4260
ggacagagaaa attaacaattt acacaagctt aatacactcc ttaattgaag aatcgcaaaa 4320
ccagcaagaa aagaatgaac aagaattattt ggaatttagat aaatggccaa gtttgggg 4380
ttgggttaac ataaacaaat tttttgtggta tataaaatataaataatga tagtaggg 4440
cttggtaggt ttaagaatag tttttgtgtt actttctata gtgaatagag ttaggcagg 4500
atattcacca ttatcggttcc agacccaccc cccaaaccccg agggggacccg acaggcccg 4560

aggatagaa gaagaaggta gagagagaga cagagacaga tccattcgat tagtgaacgg 4620
atctcgacgg tatcgattag actgtagecc aggaatatgg cagcttagatt gtacacatt 4680
agaaggaaaa gttatcttgg tagcagttca ttagccagt ggatataat aagcagaagt 4740
aattccagca gagacaggcc aagaaacago atacttcctc taaaatttag caggaagatg 4800
gccagtaaaa acaglatacata cagacaatgg cagcaatlc accagtacta cagttaggc 4860
cgccctgttgg tggcggggga tcaagcagga atttgcatt ccctacaatc cccaaagtca 4920
aggagtaata gaatlatga ataaagaatt aaagaaaatt ataggacagg taagagatca 4980
ggctgaacat cttaagacag cagttacaaat ggcagtttc atccacaatt taaaagaaa 5040
aggggggatt gggggglaca glgcagggg aagaatagta gacataatag caacagacat 5100
acaaaactaaa gaattacaaa aacaaattac aaaaattcaa aattttcggg tttattacag 5160
ggacagcaga gatccagttt ggctgcattt atcacgttag gtcgggtgc cggcagtg 5220
gcagagcgc aatggccac agtccccgag aagttggggg gaggggtcgg caattgaacc 5280
ggtgcataa qaaqgtggcg cggggtaaac tggaaqaqtg atgtcgtgt aatggctccgc 5340
cttttcccg agggtggggg agaaccgtat ataagtgcag tagtcgcgt gaacgttctt 5400
tttcgcacaa ggttgcgc cagaacacag glaagtgcg tgcgtggc cggcggccct 5460
ggctcttta cgggttatgg ccctgcgtg ctttgcatta ctccacactg gtcagttac 5520
gtgattcttgc atcccgagct tcgggttgg aqgggtggg aqagtgcag gcgttgcgt 5580
taaggagccc ctgcgcctcg tgcttgagtt gaggcctggc ctggcgctg gggcccccgc 5640
gtgcgaatct ggtggcacct tcggccctgt ctgcgtgtt tgcataagtc tctagccatt 5700
taaaattttt gatgacactgc tgcacactgg tatttcgggtt ttggggccg cggcggccgt 5760
ggccaagatc tgcacactgg tatttcgggtt ttggggccg cggcggccgt 5820
gcgtcccaagc gcatgttc ggcggccgg ggcctgcgag cggccacc gagaatcgga 5880
cgggggtagt ctcaagctgg cggccctgt ctggcgctg gctcgccccc gccgtgtatc 5940
gcggccct gggccggcaag gtcggcccg tcggcaccag ttgcgtgagc gggaaatgg 6000
ccgttcccg ggcctgcgtc aqggagctca aaalggagga cggccgcgtc gggagagcgg 6060
gggggtgagt caoccacaca aaggaaaaagg gtcggccgt cttcagccgt cgcttcatgt 6120
gactccactg agtaccggc ggcgtccagg cacctcgatt agttctcgag ctggcgatgg 6180
acgtcgatgtt taggttgggg ggaggggttt tatgcgtatgg agtttcggca cactgagttgg 6240
gtggagactg aagtttaggcc agcttggcac ttgtatgtaat ttccttgaa atttgcctt 6300
tttgagttt gatcttgggtt catttcacaa gtcagacag tggttcaaaat tttttttttt 6360
ccatccagg tgcgtgtatc tagaggatcc atggccctac cagtcggccgc ctgcgtctctg 6420

cgctggcct tgctgtccca cgccgccagg coggacatcc agatgacaca gactacatec 6480
tccctgtetg cctctctggg agacagagtc accatcagtgc aggggnaag tcaggacatt 6540
agtaaatatt taaattggta tcagcagaaa ccagatggaa ctgttaaact cctgatctac 6600
catacatcaa gattacaetc aggagtccc tcaaggttca gtggcagtgg gtctggaaaca 6660
gattattcte tcaccattag caacctggag caagaagata ttgcactta ctttgccaa 6720
cagggttaata cgttccgtt cacgttcgga ggggggacca agctggagat cacaggtggc 6780
ggtggtctgg ggggtgggtgg gtccgggtggc ggccggatctg aggtgaaact gcaggagtc 6840
ggacctggcc tggtggcgcc ctcacagagc ctgtccgtca catgcactgt ctccagggtc 6900
tcattaccctg acratgggtt aagctggatt cgccagccctc cacgaaagggt tctggagtgg 6960
ctgggagctaa tacggggtagt tggaaaccaca tactataatt cagctctcaa atccagactg 7020
accatcatca aggacaactc caagagccaa gtttcttaa aaatgaacag tctgcaaaact 7080
gtgacacacg ccatttacta ctgtgccaata cattattact acgggtggtagt ctatgtatg 7140
gactactggg gccaaggAAC ctcagtcacc gtctccctaa ccacgacgccc agcgcggcga 7200
ccaccaacac cggcccccac catcgctcg cagccccgtt ccctgcgcggc agaggcgtgc 7260
cgcccgccgg cggggggggc agtgcacacg agggggctgg acttcgcctg tgatatatctac 7320
atctggggcgc cttggccgg gacttgtggg gtcccttcctcc tgcactgggt tatccaccctt 7380
tactgcadaac ggggcagaaa gaaactctgt tatataattca aacaaccatt tatgagacca 7440
gtacaaacta ctcacagagga agatggctgt agctgcogat ttccagaaga agaagaagga 7500
ggatgtgaac tgagagtgaa gttcagcagg agcgcagacg ccccccgtta caagcaggggc 7560
cagaaccacg ttataaaoga gtcacatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac 7620
aagagacgtg gcccggaccc tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaqqaa 7680
ggcgtgtaca atgaactgca gaaagataag atggcgagg cctacagtgc gattggatg 7740
aaaggcgagc gcccgggggg caaggggcac gatggccctt accagggtct cagtcacac 7800
accaaggacac ctcacgacgc cttcacatg cagggccctgc cccctcgcta agtcgacaaat 7860
caacatctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgcactggta ttcttaacta tggtgcctt 7920
tttcgttat gtggataacgc tgctttaatg ctttgcgtatc atgcatttgc ttcccgatg 7980
gttttcattt ttccttcattt gtataaatcc tggttgcgtt ctctttatga ggagttgtgg 8040
cccggtgtca ggcaacqgtgg cgtqgtgtqc actgtgtttg ctgacgcaccc ccccaactgg 8100
tggggcattt ccaccacctg tcagtcctt tccgggactt tgccttccc cttccctatt 8160
gccacggcggg aactcategc cgcgtgtgttgc ggcacaggggc tggcgtgttgc 8220

ggcactgaca attccgtgg tttgtcgaaa aagctgacgt cctttccatg gctgctcgcc	8280
tgtgttgc ca cccggatttc gggggggacg ttcccttgc acgtcccccc ggcctcaat	8340
ccagcggacc ttccctcccc cgccctgctg cccggctctgc ggccctttcc ggttcttgc	8400
cttcgcacctc agacgagtcg gatccctt tggcccgct ccccgcttgg aattcgagct	8460
cggtaacctt aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga ttccatggccac tttttaaaag	8520
aaaagggggg actggaaggg ctaattcaact cccaaacgaag acaagatctg ctttttgctt	8580
gtactgggtc tctctggta gaccagalct gacccctggga gctctctggc taacttaggga	8640
accactgtt taagcctcaa taaagcttgc ttggagtgtt ccaaggatgt tggtcccgctc	8700
tgttgtgtga ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttgtcagtg tgaaaaatct	8760
ctagcgttag tagttcatgt catcttatta ttccgttattt ataacttgca aagaaatgaa	8820
tatcagagag tgagaggaac ttgtttattt cagcttataa tggttacaaa taaagcaata	8880
gcatcacaaa ttccacaaa aaagcatttt ttccactgca ttcttagttt ggtttgtcca	8940
aactcatcaa tgtatcttcatgtt catgtctggc ttccatgttcc cccggccctaa ctcggcccat	9000
cccgccccctt actccggcca gttccggcca ttatccggcc catggctgac taatttttt	9060
tatccatgtca gaggccgagg ccgcctcggtt ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg	9120
cttttttggaa ggccttagggaa cgtacccaaat tccggccatata ctgtatgttta ttac	9174

<210> 2

<211> 228

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 2

atgttagtctt atgeaaact ctgttagtct tgcacacatgg taacgatgag tttagcaacat	60
gccttacaag gagagaaaaa gcaccgtgca tggcgatgtgg tggaaagttaag gtggtagcat	120
cgtgccttat taggaaggca acagacgggt ctgacatggc ttggacgaac cactgaattg	180
ccgcattgca gagatattgt atttaagtgc cttagctcgat acataaac	228

<210> 3

<211> 98

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 3

gggtctctctt ggttagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaaccca	60
cgtttaaggc ctcaataaaag cttgccttga gtgtttca	98

<210> 4

<211> 85

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 4

agtatgttgtt gcccgtctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gaccctttta	60
gtcagtgtgg aaaatctcta gcagt	85

<210> 5

<211> 1377

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 5

cgaacaggga	cttcaaagcg	aaaggaaac	cagaggagct	ctctcgacgc	aggactcgcc	60
ttgcgtgaage	gcgcacggca	agaggcgagg	ggcggcqact	ggtgagtao	ccaaaaattt	120
tgactagcgg	aggctagaag	gagagagatg	ggtgcgagag	cgtcagtatt	aagggggga	180
gaatttagatc	gcatggaa	aaaaltcgggt	taaggccagg	gggaaagaaa	aaalataaat	240
taaaacatat	agtatggca	agcaggagc	tagaacatt	cgcagttaat	cctggcctgt	300
tagaaacatc	agaaggctgt	agacaaatac	tggcacagct	acaaccatcc	cttcagacag	360
gatcagaaga	acttagatca	ttatataata	cagtagcaac	cctctattgt	gtgcataaaa	420
ggatagat	aaaagacacc	aaggaagctt	tagacaagat	agaggaagag	caaacaaaaa	480
gtaagaccac	cccacagcaa	gcggccgctg	atcttcagac	ctggaggagg	agatatgagg	540
gacaatttgg	gaagtgaatt	atataaatat	aaagtagtaa	aaattgaacc	attaggagta	600
gcacccacca	aggcaaagag	aagagtggtg	cagagagaaa	aaagagcagt	ggaatagga	660
gttttgttcc	ttgggttctt	gggagcagca	ggaagcacta	tggcgcago	gtcaatgacg	720
ctgacggta	aggccagaca	attattgtct	ggtatagtgc	agcagcagaa	caatttgcgt	780
aggctattt	aggcacaaca	gcatctgtt	caactcacag	tctggggcat	caagcagctc	840
caggcaagaa	tcctggctgt	ggaaagatac	ctaaaggatac	aacagctct	ggggatttgg	900
ggttgctctg	gaaaactcat	ttgcaccact	gctgtgcctt	ggaatgtctag	ttggagtaat	960
aaatctctgg	aacagatttg	gaatcacacg	acctqqatgg	agtggacag	agaaatthaac	1020
aattacacaa	gtttaataca	ctcctaatt	gaagaategc	aaaaccagca	agaaaagaaat	1080
gaacaagaat	tatttggatt	agataaatgg	gcaagtttgc	ggaattgggt	taacataaca	1140
aattggctgt	ggttatataaa	attattcata	atgatagtag	gaggcttgg	aggtttaaga	1200
atagtttttgc	ctgtacttgc	tatagtgaat	agagtaggc	aggatattc	accattatcg	1260
tttcagaccc	acctccccac	cccgagggg	cccgacaggc	ccgaaggaat	agaagaagaa	1320
ggtgqaqaga	gagacagaga	cagatccatt	cgattagtga	acggatctcg	acggtat	1377

<210> 6

<211> 547

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 6

tagactgttag cccaggaata tggcagctag attgtacaca tttagaagga aaagtttatct	60
tggtagcagt tcatgttagcc agtggatata tagaaggcaga agtaattcca gcagagacag	120
ggcaagaaac agcatacttc ctcttaaaat tagcaggaag atggccagta aaaacagttac	180
atacagacaa tggcagcaat ttccaccatgc ctacagttaa ggccgcgtgt tggtgggggg	240
ggatcaagca ggaatttggc attccctaca atccccaaag tcaaggagta atagaatcta	300
tgaataaaga attaaagaaa attataggac aggtaagaga tcaggctgaa catcttaaga	360
cagcagtaca aatggcagta ttcatccaca attttaaaag aaaagggggg attgggggg	420
acagtgcagg gggaaagaata gtagacataa tagcaacaga catacaaact aaagaattac	480
aaaaacaaat tacaaaaatt caaaatttc gggtttatta caggcacgc agagatccag	540
tttgct	547

<210> 7

<211> 1178

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 7

gctccgggtgc ccgtcagtgg gcagagegca catcgcccac agtccccgag aagttggggg	60
gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg cgggttaaac tggaaagt	120
atgtcgtgtt ctggctccgc ctttttcccg agggtggggg agaaccgtat ataagtgcag	180
tagtcgcgtt gaaacctttt tttcgcaacq ggtttccgc cagaacacag qtaagtgccg	240
tgtgtggttc ccgcgggcct ggccttttta cgggttatgg cccttgctg cttgaatta	300

cttccacactg gctgcagttac gtgattcttg atcccgagct tcgggttggga agtgggtggg	360
agaggatcgat gccttgcgtt taaggagccc cttcgcctcg tgcttgagtt gagggctggc	420
ctggggcgctg gggccgcccgc gtgcgaatct ggtggcacct tcgcgcctgt ctgcgtgtt	480
togataatgtc tcttagccatt taaaattttt gatgacactgc tgccgacgtt ttttctggc	540
aagatagtc tgtaaatgcg ggccaagate tgcacactgg tatttcggtt ttggggccg	600
cggggccgcga cggggcccggt gogtcccagc gcacatgttc ggcgaggggg ggcctgcgag	660
cgcgcgcacc gagaatcgga cgggggtagt ctcaagctgg ccggcctgtt ctgggtgcctg	720
gcctcgccgc gccgtgtatc gccccgcctt gggccgcaag gctggccogg tcggcaccag	780
ttgcgtgagc gggaaagatgg cgcgttcccc gcctgtgc agggagctca aatggagga	840
cgcggcgctc gggagagcgg gcgggtgagt cacccacaca aaggaaaagg gccttccgt	900
cctcaqccgt cgcttcatgl gactocactt aqtaaaaaa ggcgttccgtt caccctcgatt	960
agtttcgttccatg cttttggagt acgtcgatctt taggttgggg ggaggggttt tatgcgttgg	1020
agtttccca cactgagtgg gtggagactg aagtttagcc agttggcac ttgtatgtat	1080
tctccllgga atttgcctt tttgagttt gatettggtt catttcataag cctcagacag	1140
tggttcaaaag tttttttttt ccatttcagg tgctgtga	1178

<210> 8

<211> 1459

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 8

atggccttac cagtgcacgc ctgtgccttg cgcgtggcct tgctgttcca cgcgcgcagg	60
ccggacatcc agatgacaca gactacatcc tccctgtctg cctctctggg agacagatc	120
accatcagt ttcaggggcaag tcaggacatt agttaaatatt taaattggta tcagcaaaaa	180
ccagatggaa ctgtttaact cctgatctac catacatcaa gattacactc aggagtccca	240
tcaaggttca gtggcagtgg gtcgttccaa gattatttcc tcaccattag caacctggag	300
caagaagata ttgcactta cttttgccaa caggtaata cgcgtccgtt cacgttggaa	360
ggggggacca agctggagat cacaggtggc ggtggctgg cgggtggcgt gtcgggtggc	420
ggcgatctg aggtgaaact gcaggagtca ggacctggcc tggggccgc ctacacagago	480
ctgtccgtca catgcactgt ctcaagggttc tcattaccgg actatggtgt aagctggatt	540
cgccacgcctc caaaaagggt tctggagttt ctggggatcc tatggggtag tggaaaccaca	600

tactataatt cagctctcaa atccagactg accatcatca aggacaactc caagagccaa	660
gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaaact galgacacag ccatttacka ctgtgccaaa	720
cattattact acggtgttag ctatgcatac gactactggg gccaaggAAC ctcagtcacc	780
gtctoactcaa ccacgacgccc agcgcccgccca ccaccaaacac cggcccccac catcgctcg	840
cagccccctgt ccctgcgcgc agaggcgtgc cggccagegg cggggggcgc aglgcacacg	900
agggggctgg acttgcctg tgatatctac atctggcgc ccttggcgg gacttggcgg	960
gtccttctcc tgtcaactggt tatcaccctt tactgcaaaac gggcagaaaa gaaactcccg	1020
tatataattca aacaaccatt tatgagacca gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt	1080
agctgcccgtat ttccagaaga agaagaaggA ggatgtgaac tgagagtgaat gtcagcagg	1140
agcgcagacg ccccccgtat caagcaggc cagaaccacg tctataacga gctcaatcta	1200
ggacqaagaq aggagtaeGA tgltttggac aagagacgtg ggccggaccc tqaqatgggg	1260
ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggctgtaca atgaactgca gaaagataag	1320
algggggaggccctacatgtat gattggalG aaaggcgacg cccggggggg caagggccac	1380
gatggcctt accagggtat cagtagcc accaaggaca cctacgacgc cttcacatg	1440
caggccctgc cccctcgct	1459

<210> 9

<211> 591

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 9

atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac tatgttgctc	60
cttttacgtat atgtggatac gctqctttaa tgcctthgta tcatgttatt gcttccngta	120
tgggttcat ttctctccctt ttttataat cctgggtgt gtctctttat gaggagttgt	180
ggcccggtgt caggcaacgt ggctgtgtgt gcactgtgtt tgctgacgca acccccactg	240
gttggggcat tgcacccacc tgcacgttcc ttccggac ttccgttcc cccctcccta	300
ttggccacggc ggaactcatac gccgcctgca ttgcggcgtg ctggacaggg gctcggtgt	360
tgggcactga caattccgtg gtgttgcgg ggaagctgac gtcctttcca tggctgtcg	420
cctgtgtgc cacctggatt ctgcgggggA cgtcttctg ctacgtccct taggcctca	480
atccagcgga ccttcttcc cgcggcctgc tgccggctct gccgccttt ccgcgttcc	540
gccttcgecc tcagacyagt cggatctccc tttggccgc ctcggccct g	591

<210> 10
<211> 98
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Chemically Synthesized

<400> 10
gggtctctctt ggtagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaaccca 60
ctgccttaaggc ctcataaaag cttgccttga gtgcattca 98

<210> 11
<211> 84
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 11
agttagtgtgtt gcccgctgtgt tgtgtgactc tggttaactag agatccctca gaccctttta 60
gtcagtgtgg aaaatctata gcag 84

<210> 12
<211> 486
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 12

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Glu
 130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser
 145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
 165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
 180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 195 200 205

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
 210 215 220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys
 225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 305 310 315 320

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 325 330 335

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 340 345 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
 355 360 365

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 370 375 380

Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 385 390 395 400

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 405 410 415

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 420 425 430

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 435 440 445

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 450 455 460

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 13

<211> 63

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 13

atggccttac cagtgaccgc ctlgctcctg ccgcgtggct tgctgctcca cggcgccagg	60
ccg	63

<210> 14

<211> 726

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 14

gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc	60
atcaatggca gggcaagtca ggacattagt aaatatttaa attggtatca gcagaaacca	120
gatggaaactg taaaactctt gatctaccat acatcaagat tacactcagg agtccccatca	180
aggttcagtg gcagtgggtc tggAACAGAT tattctctca ccattagcaa cctggagcaa	240
gaagatattg ccacttactt ttGCCAACAG ggtataaCGC ttccgtacac gttcggaggg	300
ggggaccaAGC tggagatcac aggtggcggt ggctcgggcg gtgggggtc gggggccggc	360
ggatctgagg taaaactgca ggagtccagg cctggcttgg tggcccccac acagagccgt	420
tccgtcacat gcactgttcc aggggtctca ttacccgact atgggtgtaa ctggattcgc	480
cagcccccac gaaagggtct ggagtggctg ggagtaatat ggggttagtga aaccacatac	540
tataattcag ctctcaaatc cagactgacc atcatcaagg acaactccaa gagccaagtt	600
ttctaaaaaa tgaacagtct gcaaaactgtat gacacagcca tttactactg tgccaaacat	660
tattactacg gtggtagcta tgctatggac tactggggcc aaggaacccctc agtcaccgtc	720
tcctca	726

<210> 15

<211> 135

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 15

accacgacgc cagcgcccg accaccaaca ccggcgccca ccatcgctc gcagccccgt 60

tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gaggggggtg 120

gacttcgcct gtgat 135

<210> 16

<211> 72

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 16

atctacatct gggcgccctt ggccggact tgtgggtcc ttctcctgtc actggttatc 60

accctttact gc 72

<210> 17

<211> 126

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 17

aaacggggca gaaagaaaact octgtatata ttcaaacaac catttatgaq accagtacaa	60
actactcaag aggaagatgg ctgttagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt	120
gaactg	126

<210> 18

<211> 336

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 18

agaglgaagt tcagcaggag cgccagacgcc ccgcgtaca agcagggeca gaaccagctc	60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttgacaa gagacgtggc	120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg octgtacaat	180
gaactgcaga aagataagat ggccggaggcc tacagtgaga ttggatgaa aggccagcgc	240
cgagggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc	300
tacgacgccc ttcacatgca ggcctgccc cctcgc	336

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 19

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu	
1	5
	10
	15

His Ala Ala Arg Pro	
	20

<210> 20

<211> 242

<212> PRT

<213> SequênciA Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 20

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1															15
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr
															30
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile
															45
Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
															60
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln
															80
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr
															95
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr	Gly	Gly	Gly	Ser	
															110
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Cly	Gly	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu
															125
Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys
															140
Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg
															160
Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser
															175
Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile
															190
Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln
															205
Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly
															220
Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val
															240
Ser	Ser														

<210> 21

<211> 47

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 21

Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala
1									10						15
Ser	Gln	Pro	Ieu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly
								20						30	
Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	
								35						45	

<210> 22

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 22

Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Ieu
1								5							15
Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys										
								20							

<210> 23

<211> 42

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 23

Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met
1				5				10					15		
Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe
	20				25						30				
Pro	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu							
	35				40										

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 24

Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly
1				5			.	10				15			
Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr
	20				25						30				
Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys
	35				40						45				
Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys
	50			55					60						
Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg
	65			70				75			80				
Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala
					85			90				95			
Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg
	100				105						110				

<210> 25

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 25

gaaaagctgac tgccctatt tg 22

<210> 26

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<900> 26

gagaggaagt gctgggaaca at 22

<210> 27

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizada Quimicamente

<400> 27

ctccccagtc tcftt 15

REIVINDICAÇÕES

1. Célula T geneticamente modificada para expressar um CAR, em que o CAR compreende (a) um domínio de ligação de抗原 que é um scFv anti-CD19 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 20, (b) uma região de sinalização 4-1BB co-estimuladora, e (c) um domínio de sinalização zeta CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24, para utilização num método para tratamento do cancro num ser humano, em que é obtida uma remissão do cancro, e em que o ser humano é resistente a pelo menos um agente quimioterapêutico.
2. Célula T para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o cancro compreende um tumor não-sólido, tal como um tumor hematológico.
3. Célula T para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o cancro é leucemia ou linfoma.
4. Célula T para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que a leucemia é:
 - (i) uma leucemia aguda ou leucemia crónica; ou
 - (ii) leucemia linfocítica aguda.
5. Célula T para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o cancro é:
 - (i) leucemia linfocítica aguda pré-B (indicação pediátrica), leucemia linfocítica aguda do adulto, linfoma de células do manto ou linfoma difuso de grandes células B;

- (ii) linfoma não-Hodgkin;
 - (iii) mieloma múltiplo; ou
 - (iv) doença de Hodgkin.
6. Célula T para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o cancro é leucemia linfocítica crónica.
7. Célula T geneticamente manipulada para expressar um CAR, em que o CAR compreende (a) um domínio de ligação de抗ígeno que é um scFv anti-CD19 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 20, (b) uma região de sinalização 4-1BB co-estimuladora, e (c) um domínio de sinalização zeta CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24, para utilização num método para tratamento do cancro que compreende a administração da referida célula T a um ser humano diagnosticado com cancro, em que o referido método gera uma população de células T geneticamente manipuladas que persistem no ser humano durante pelo menos oito meses, nove meses, dez meses, onze meses, doze meses, dois anos ou três anos após a administração, e em que o ser humano é resistente a pelo menos um agente quimioterapêutico.
8. Célula T para utilização de acordo com a reivindicação 7, em que a população persistente de células T geneticamente manipuladas compreende pelo menos uma célula selecionada do grupo que consiste numa célula T que foi administrada ao ser humano, uma progenia de uma célula T que foi administrada ao ser humano e uma sua combinação.

9. Célula T para utilização de acordo com a reivindicação 7, em que a população persistente de células T geneticamente manipuladas compreende uma célula T de memória.
10. Célula T geneticamente manipulada para expressar um CAR, em que o CAR compreende (a) um domínio de ligação de抗ígeno que é um scFv anti-CD19 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 20, (b) uma região de sinalização 4-1BB co-estimuladora, e (c) um domínio de sinalização zeta CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24, para utilização num método para tratamento do cancro que compreende a administração da referida célula T a um ser humano diagnosticado com cancro, em que o referido método expande uma população de células T geneticamente manipuladas no ser humano, e em que a célula T geneticamente manipulada administrada produz uma população de células T de progenia no ser humano, e em que o ser humano é resistente a pelo menos um agente quimioterapêutico.
11. Célula T para utilização de acordo com a reivindicação 10, em que as células T de progenia no ser humano compreendem uma célula T de memória.
12. Célula T para utilização de acordo com a reivindicação 10, em que a população de células T de progenia persiste no ser humano durante pelo menos três meses, quatro meses, cinco meses, seis meses, sete meses, oito meses, nove meses, dez meses, onze meses, doze meses, dois anos ou três anos após a administração.

13. Célula T para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 7-12, em que o cancro é como definido em qualquer uma das reivindicações 2-5 ou em que o cancro é leucemia linfocítica crónica.
14. Célula T para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 6, 7 ou 10, em que o ser humano tem leucemia linfocítica crónica que é leucemia CD19+ refratária e linfoma.
15. Célula T para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-14, em que a célula T é uma célula autóloga ou alógénica.
16. Célula T para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-15, em que a referida célula é administrada após terapia ablativa da célula B, tal como com agentes que reagem com CD20, por exemplo, Rituxan.
17. Célula T para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-16, em que a referida célula é administrada numa composição farmacêutica numa dosagem de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal ou 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal.
18. Célula T para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-17 em que:
 - (i) a região de sinalização 4-1BB co-estimuladora comprehende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 23;
 - (ii) o CAR comprehende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID N°: 12;

- (iii) o scFv anti-CD19 é codificado pela SEQ ID N°: 14;
- (iv) a região de sinalização 4-1BB é codificada por SEQ ID N°: 17 e o domínio de sinalização zeta CD3 é codificado por SEQ ID N°: 18;
- (v) o scFv anti-CD19 é codificado por SEQ ID N°: 14, a região de sinalização 4-1BB é codificada por SEQ ID N°: 17 e o domínio de sinalização zeta CD3 é codificado por SEQ ID N°: 18; ou
- (vi) o CAR é codificado pela sequência de ácidos nucleicos apresentada em SEQ ID N°:8.

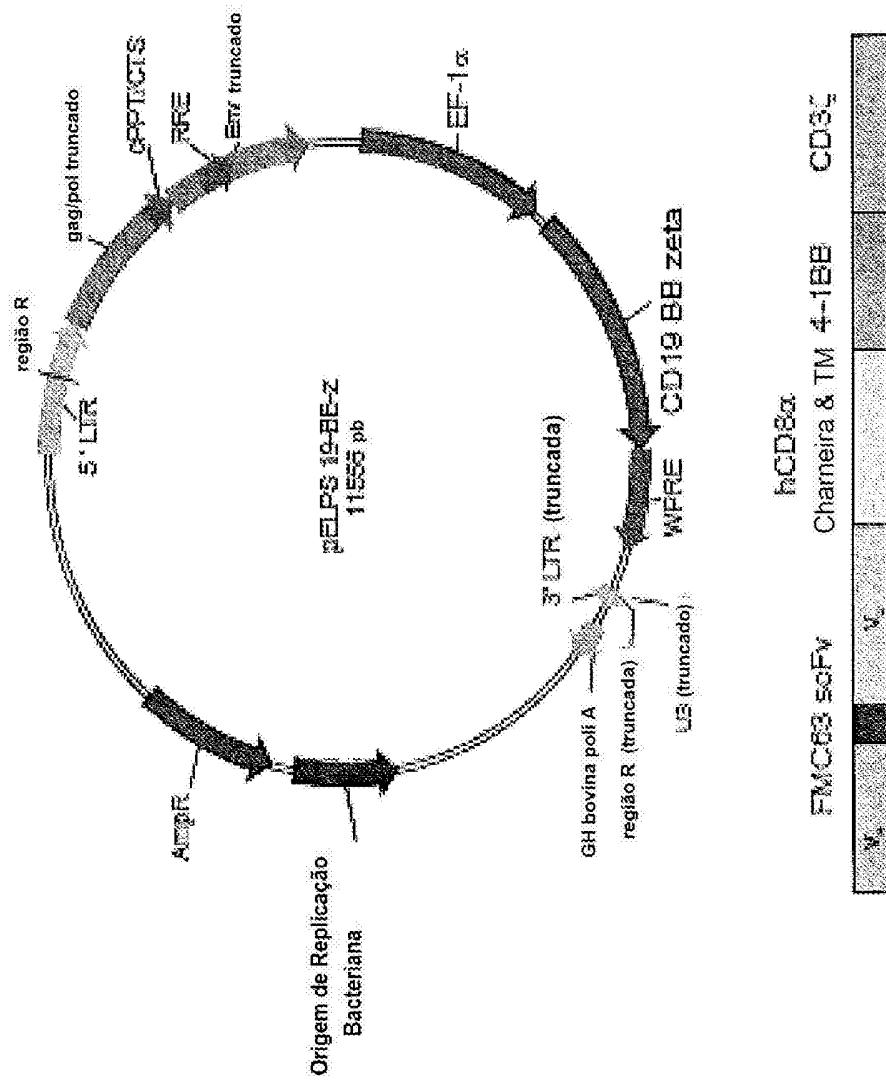


Figura 1A

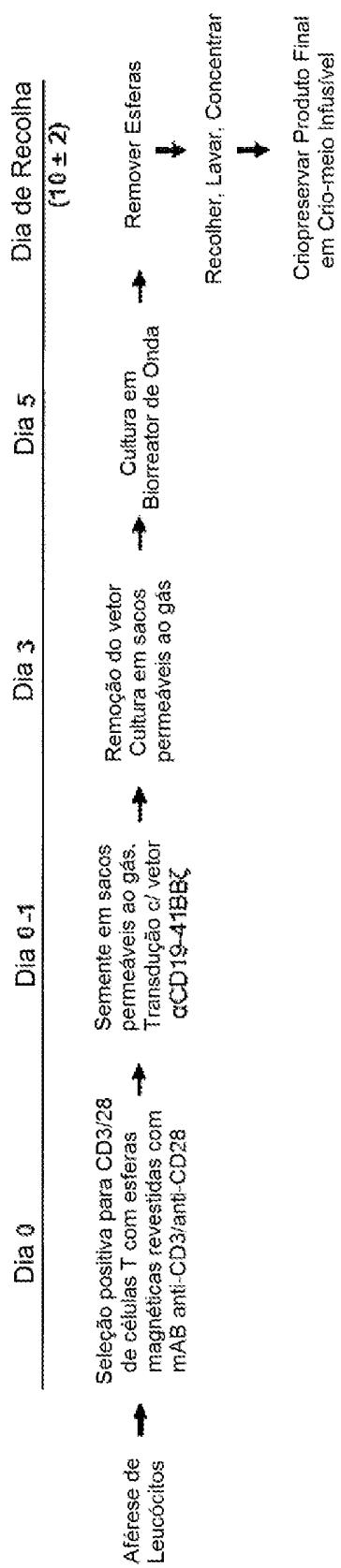


Figura 1B

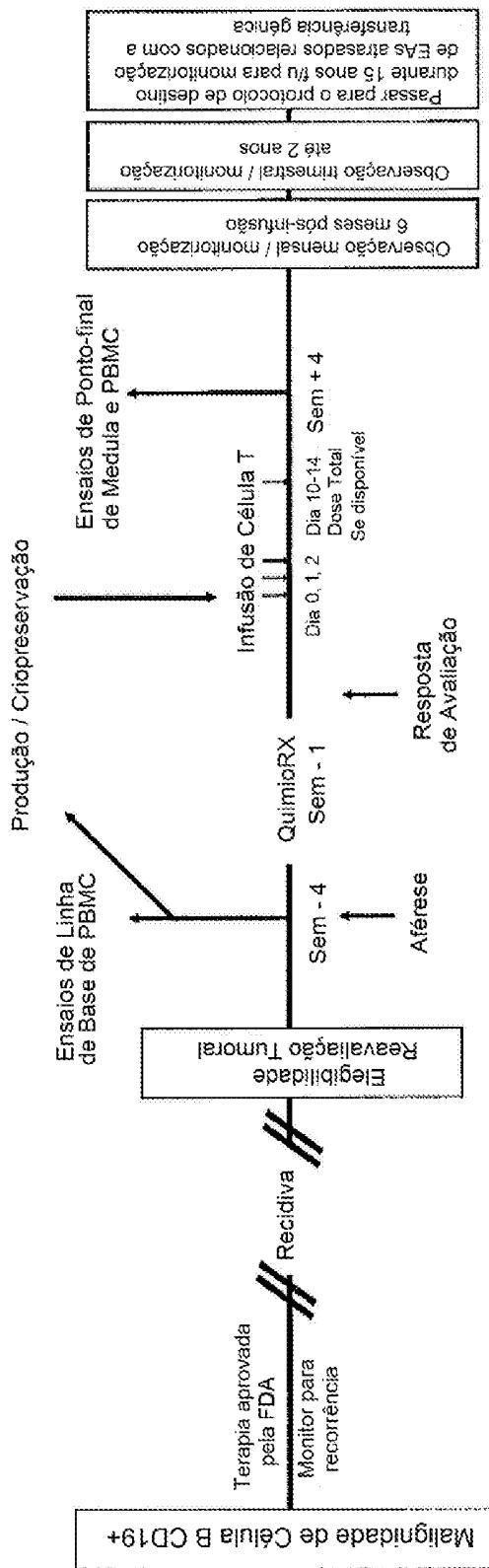
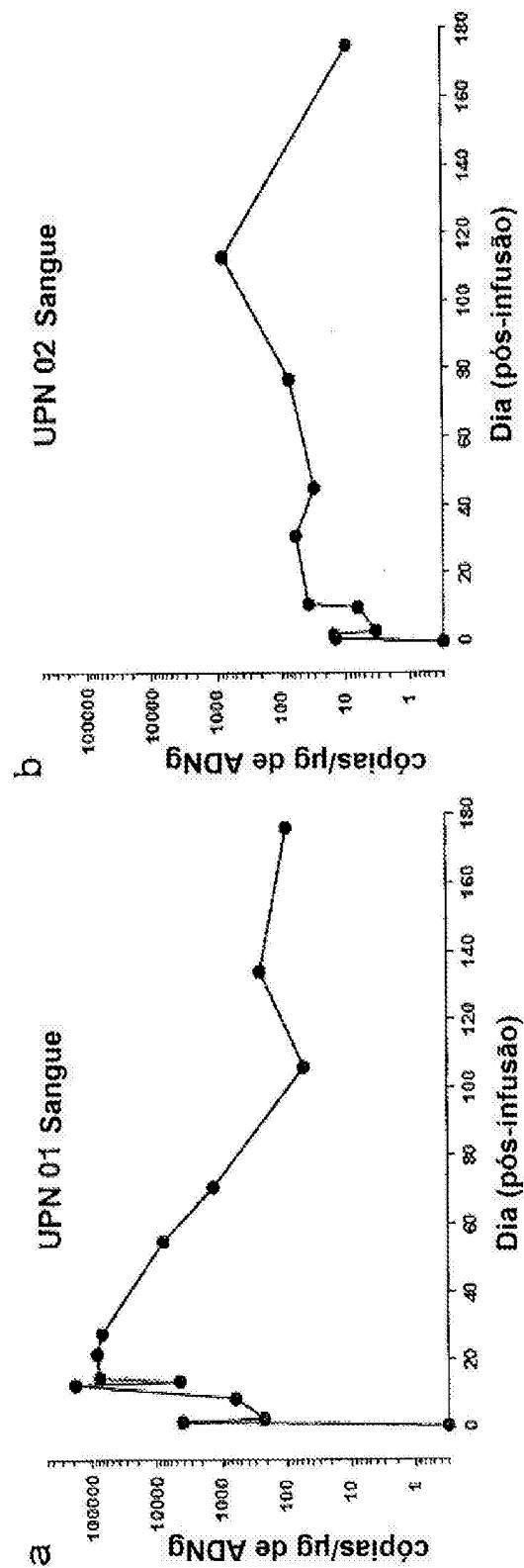
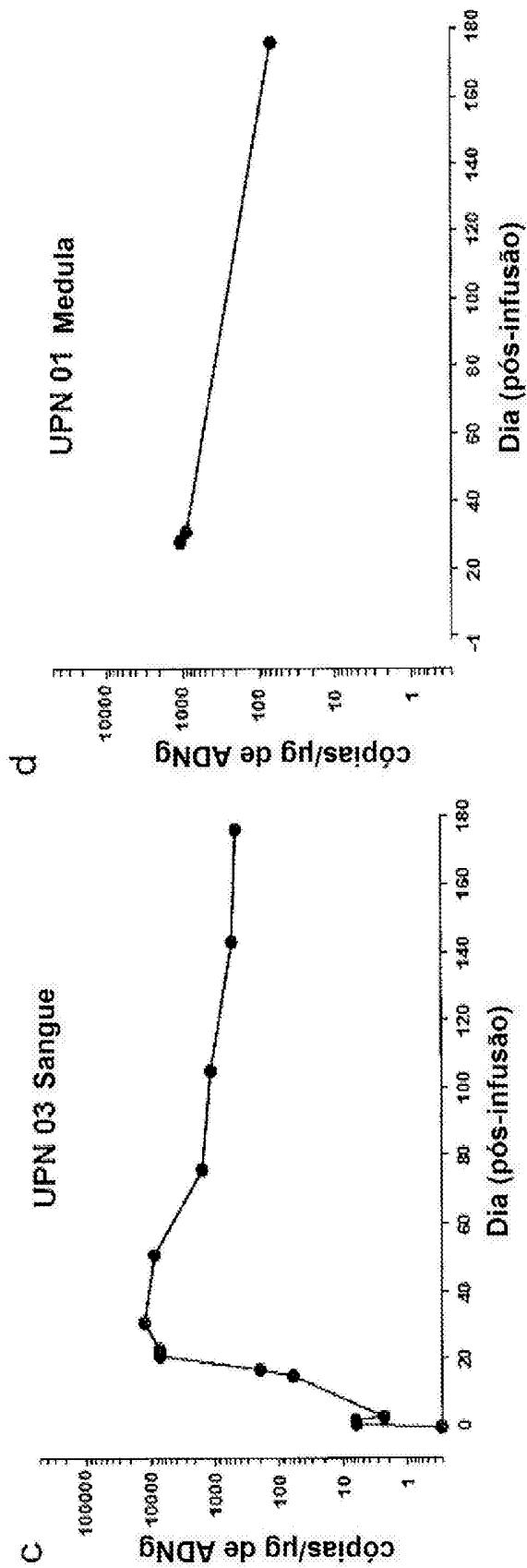


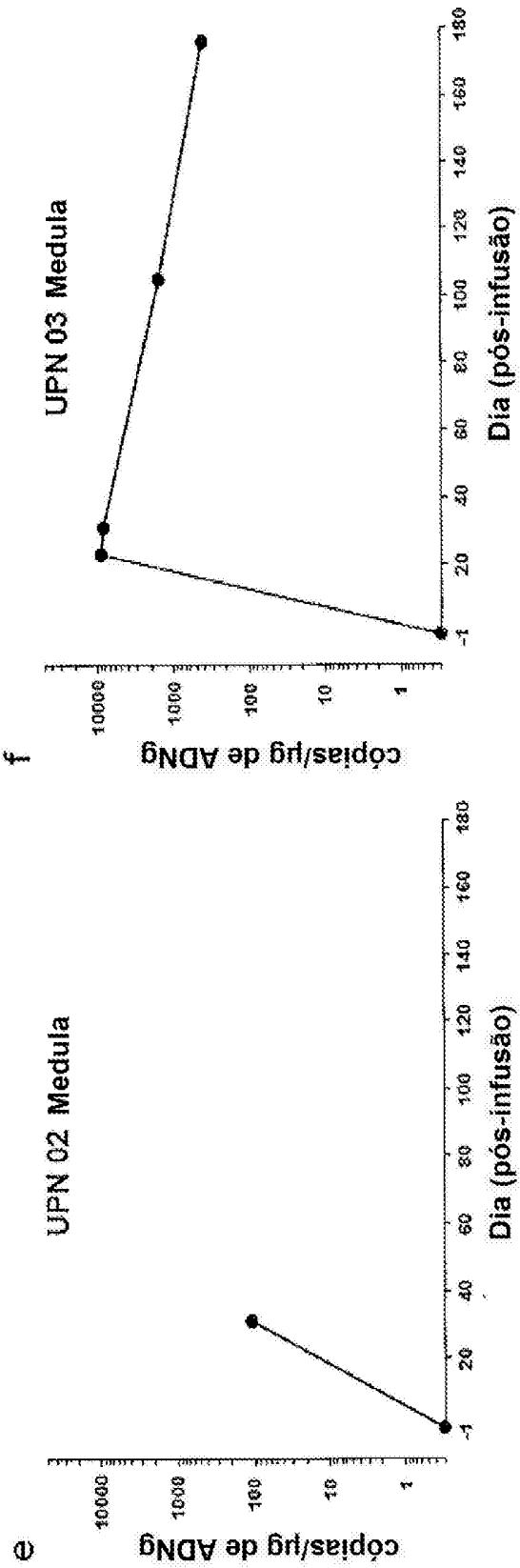
Figura 1C



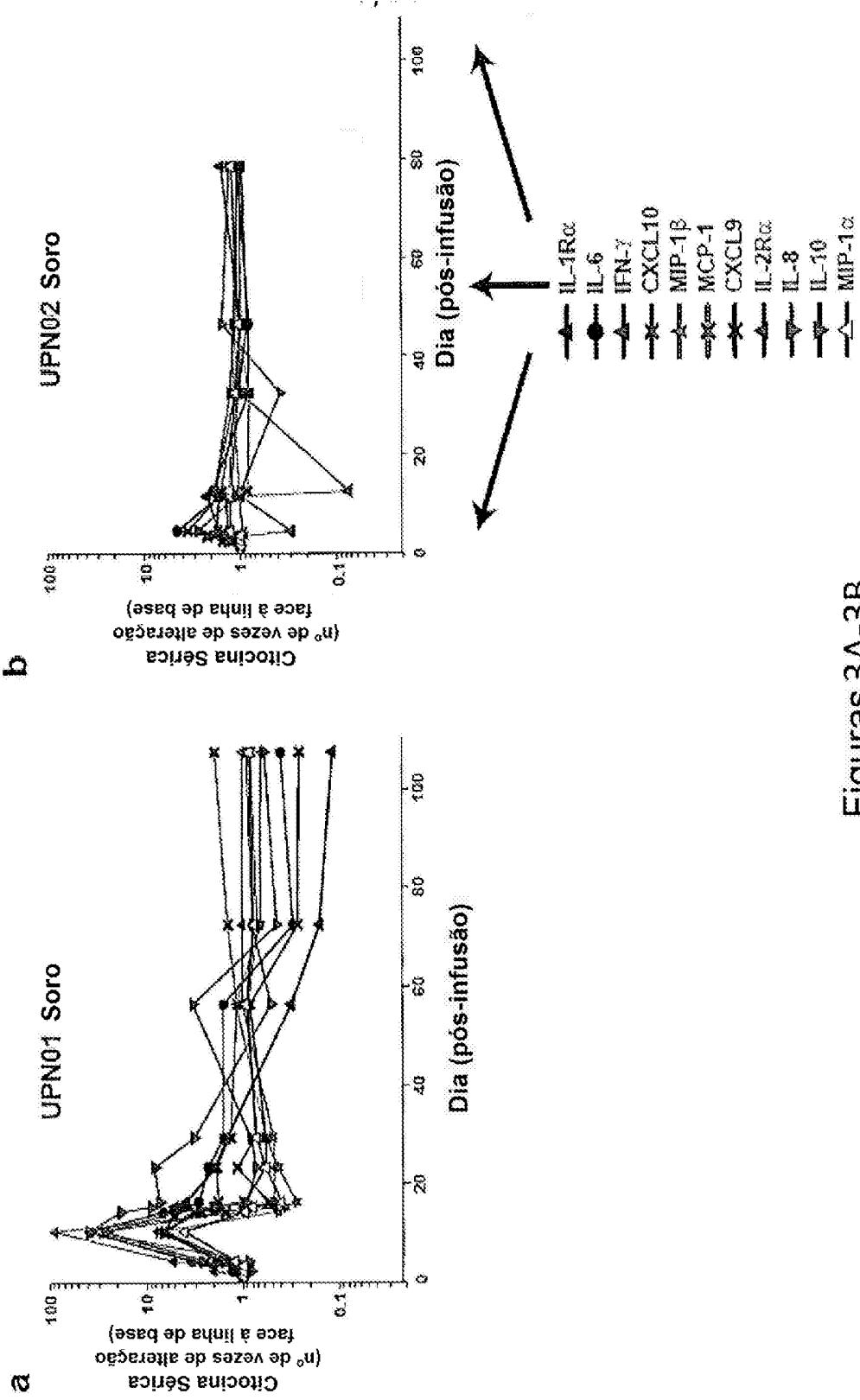
Figuras 2A-2B



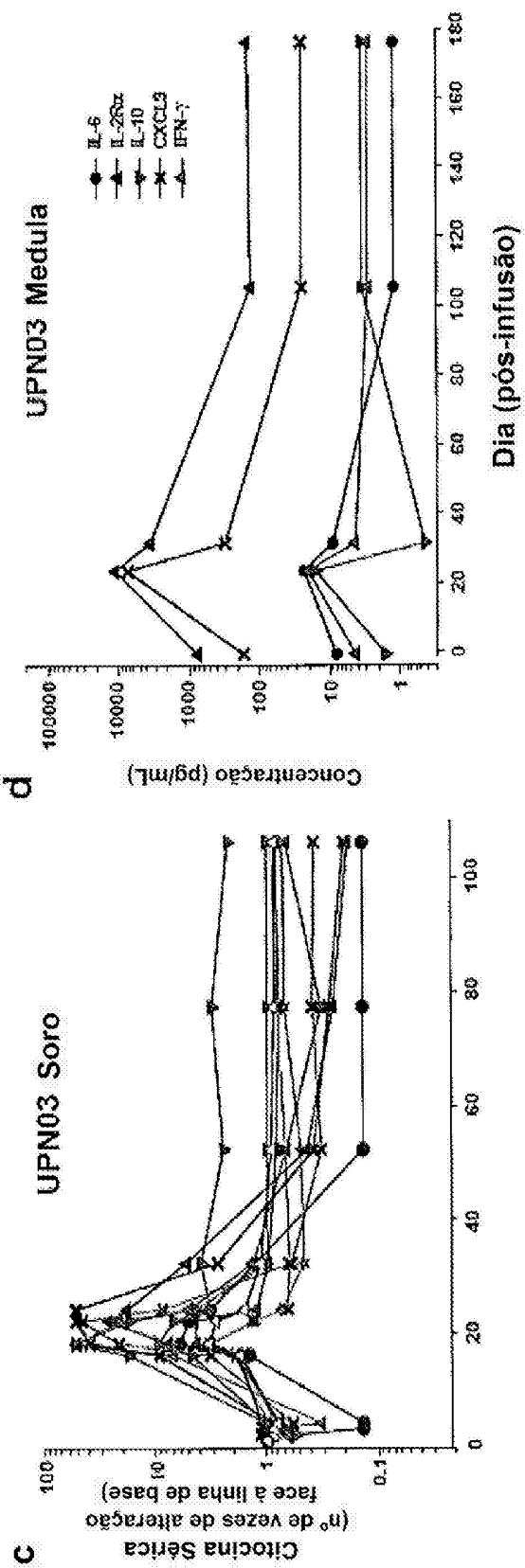
Figuras 2C-2D



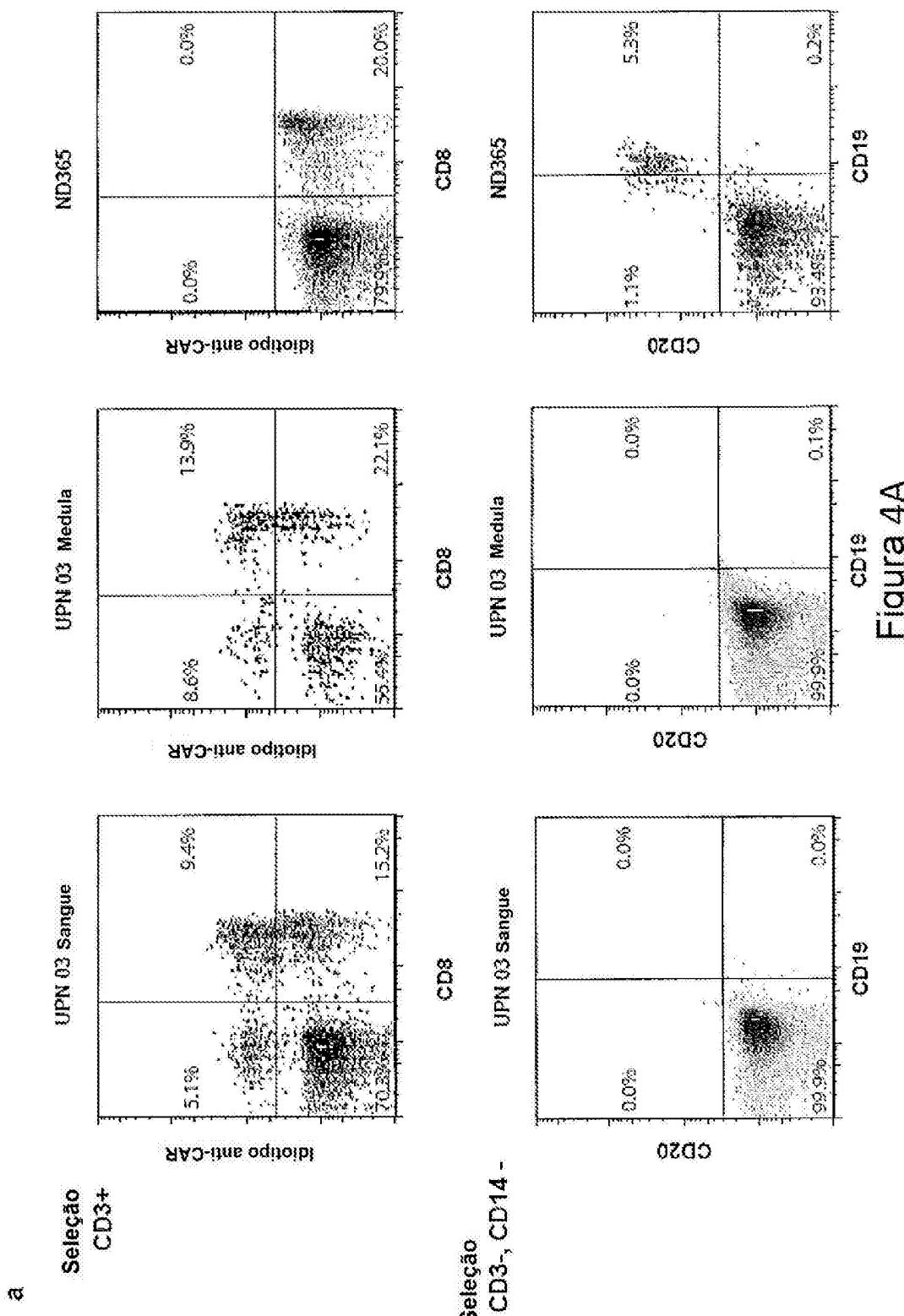
Figuras 2E-2F



Figuras 3A-3B



Figuras 3C-3D

**Figura 4A**

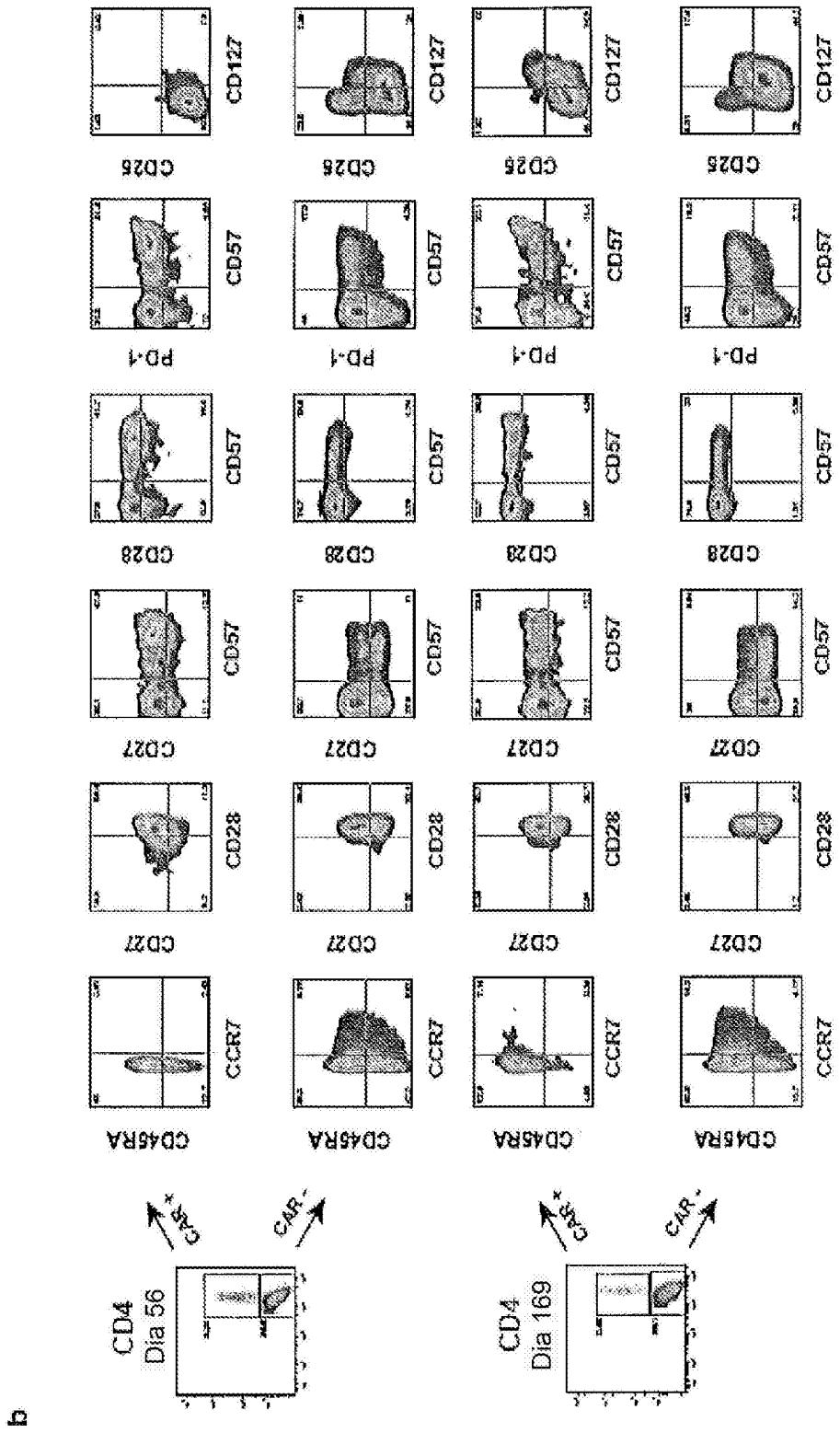


Figura 4B

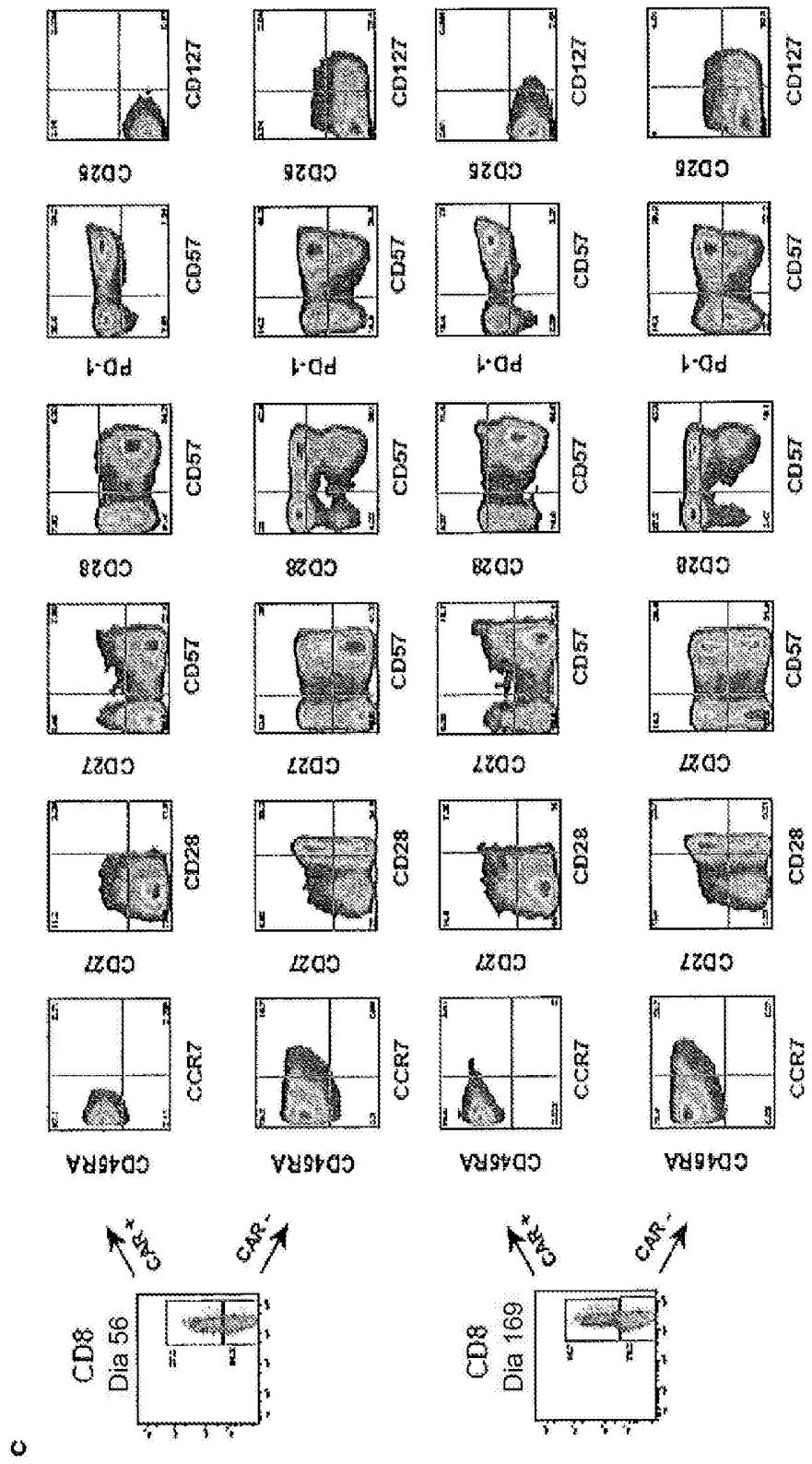


Figura 4C

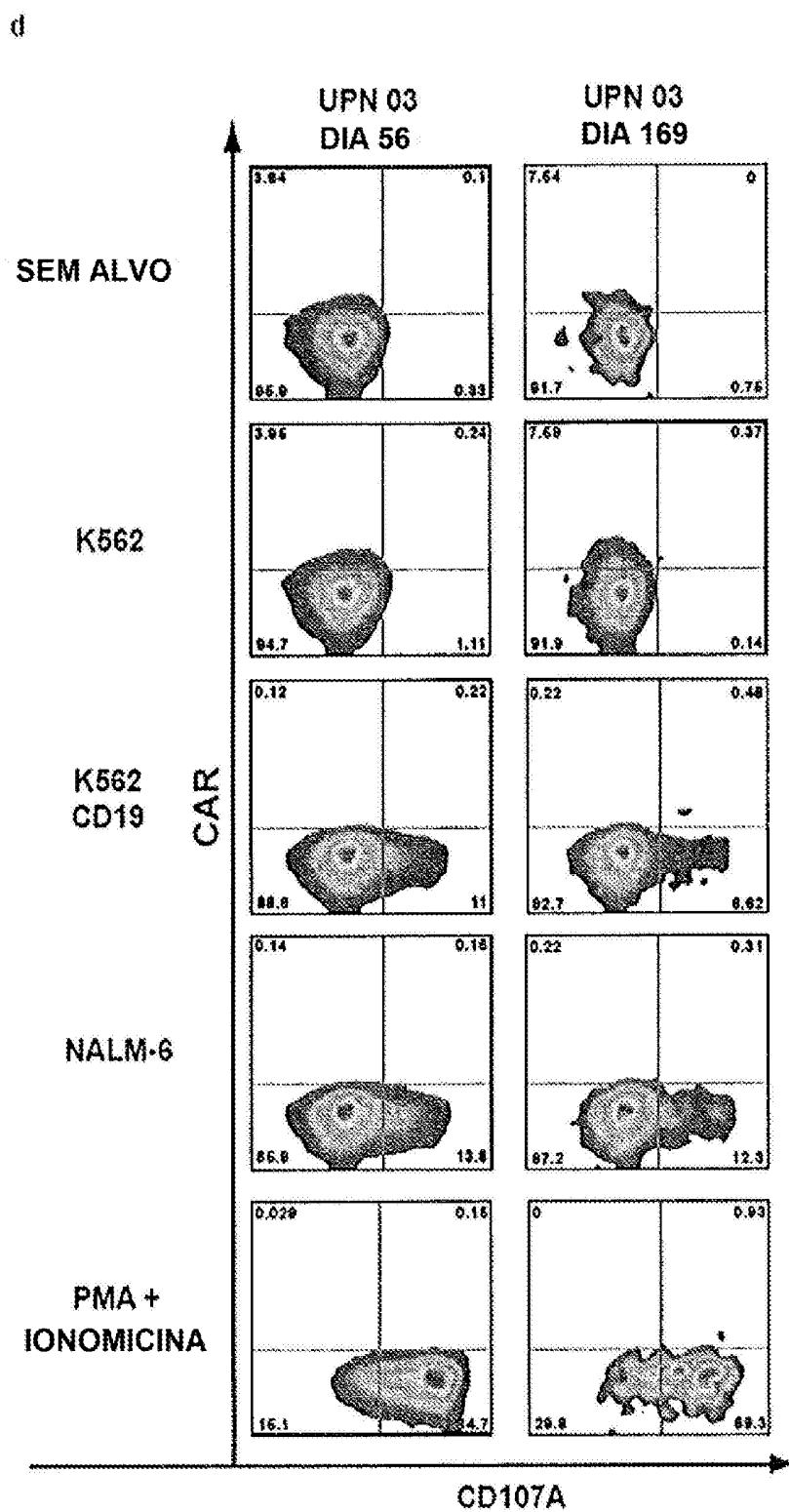


Figura 4D

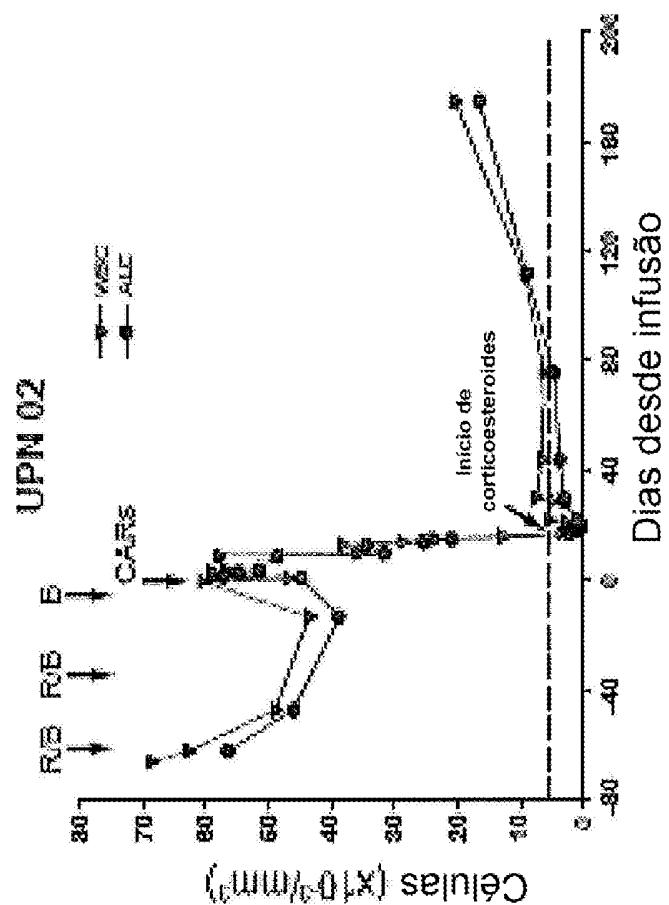
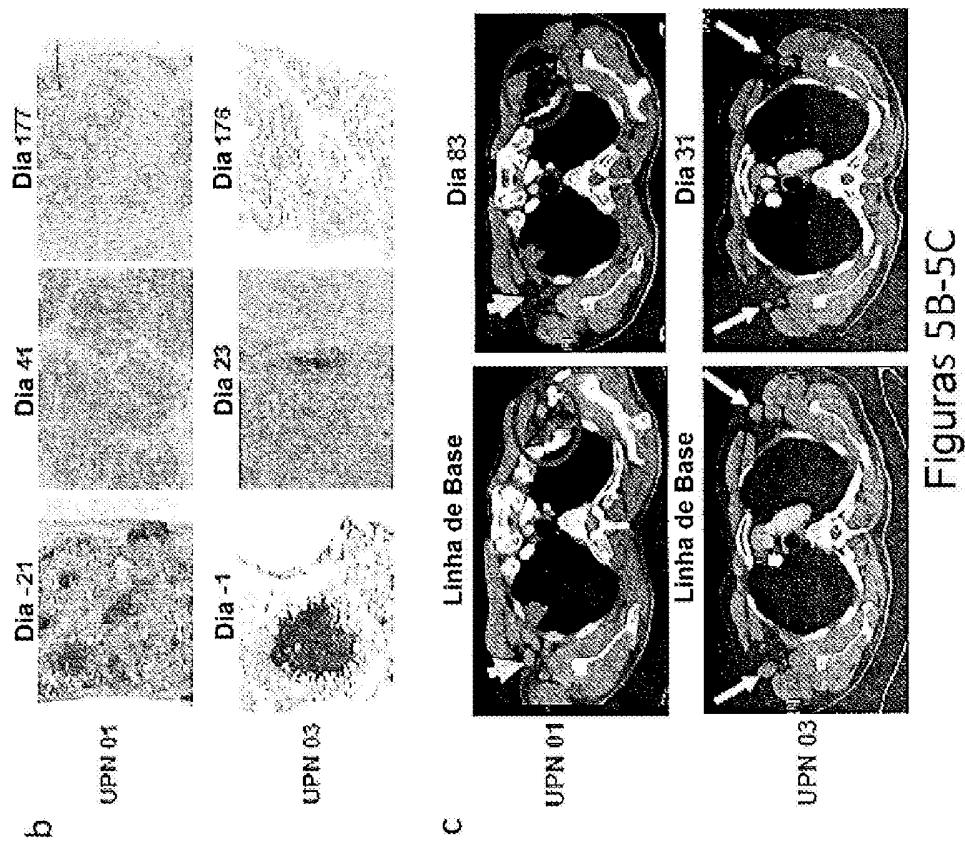


Figura 5A



Figuras 5B-5C

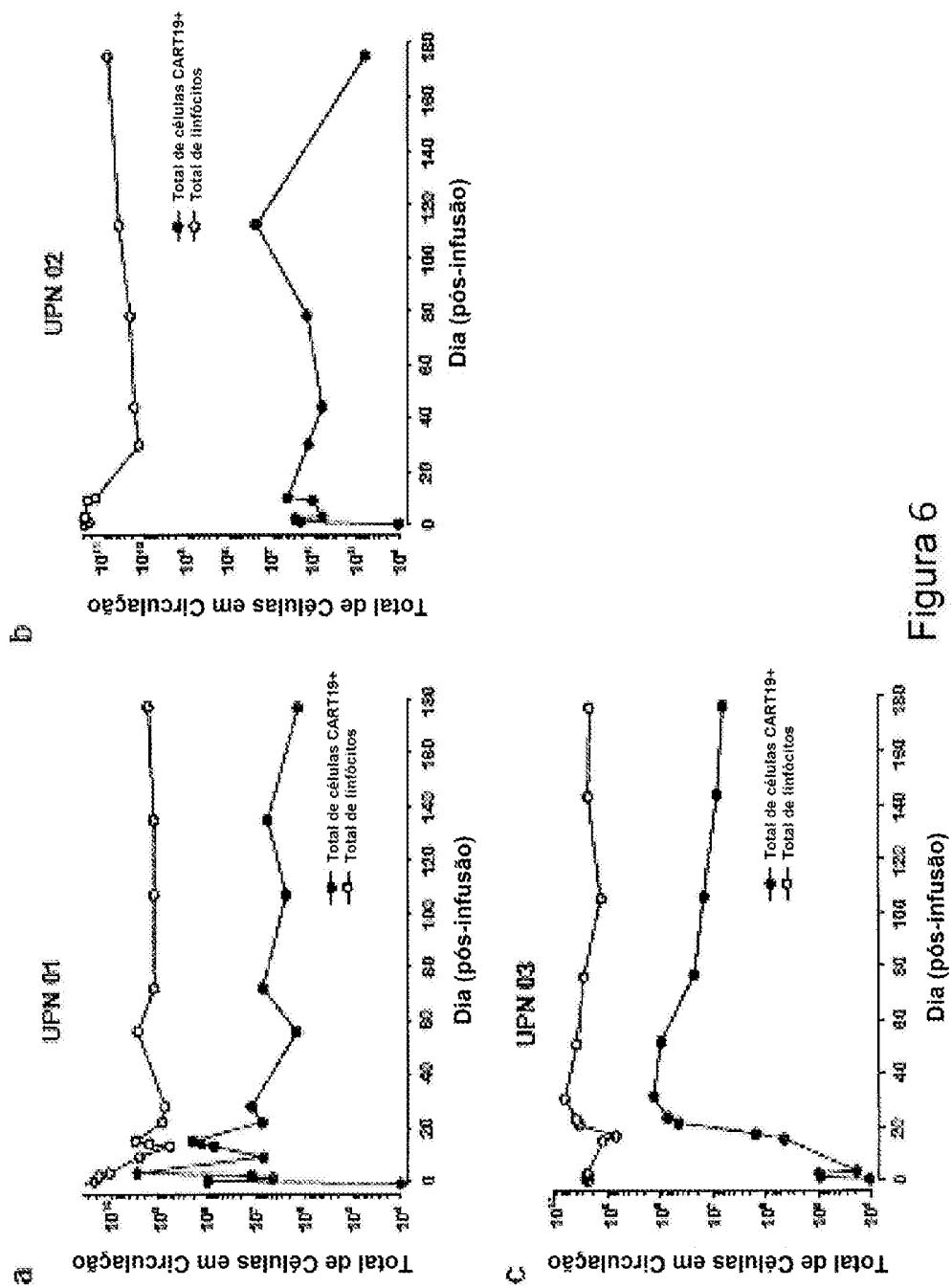


Figura 6

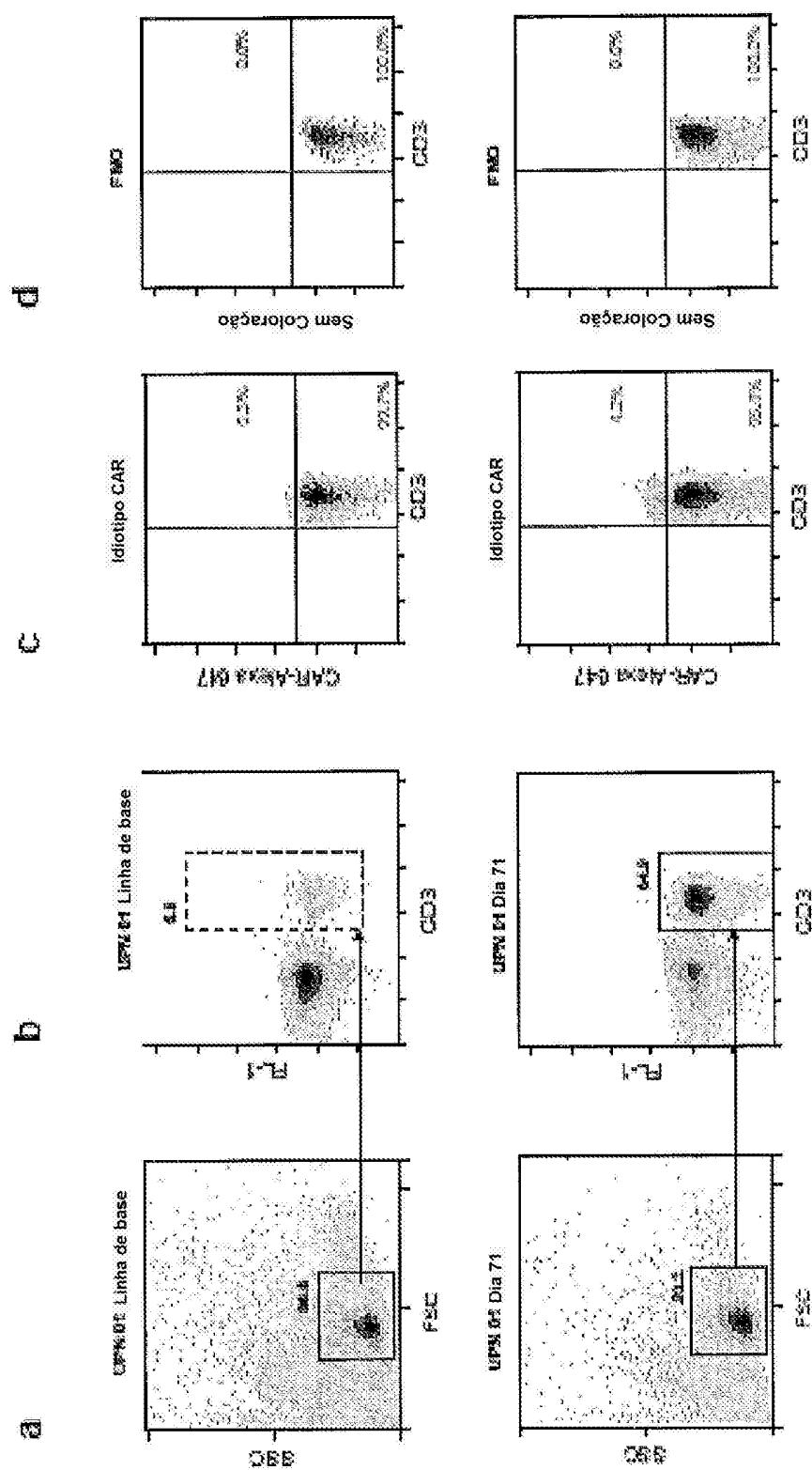


Figura 7

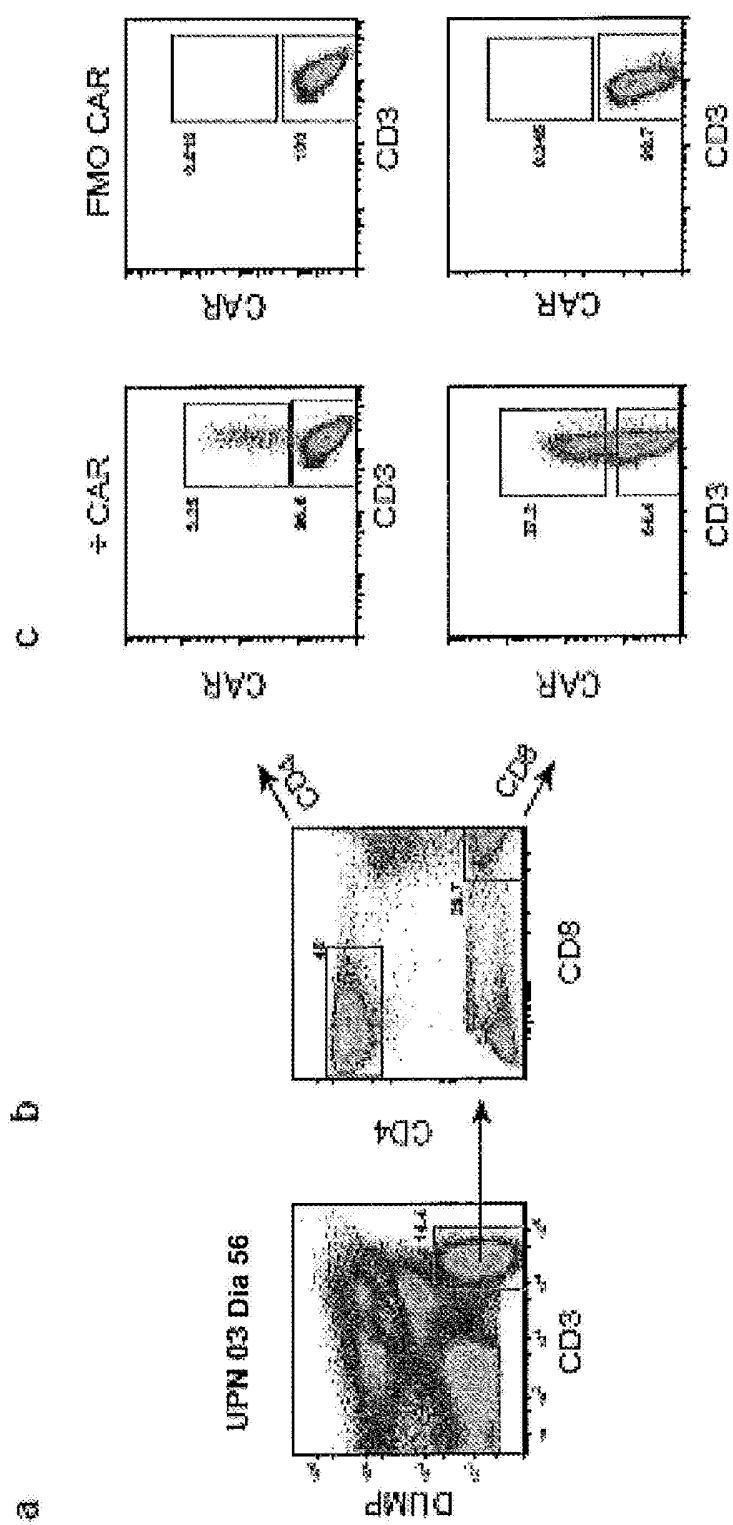


Figura 8

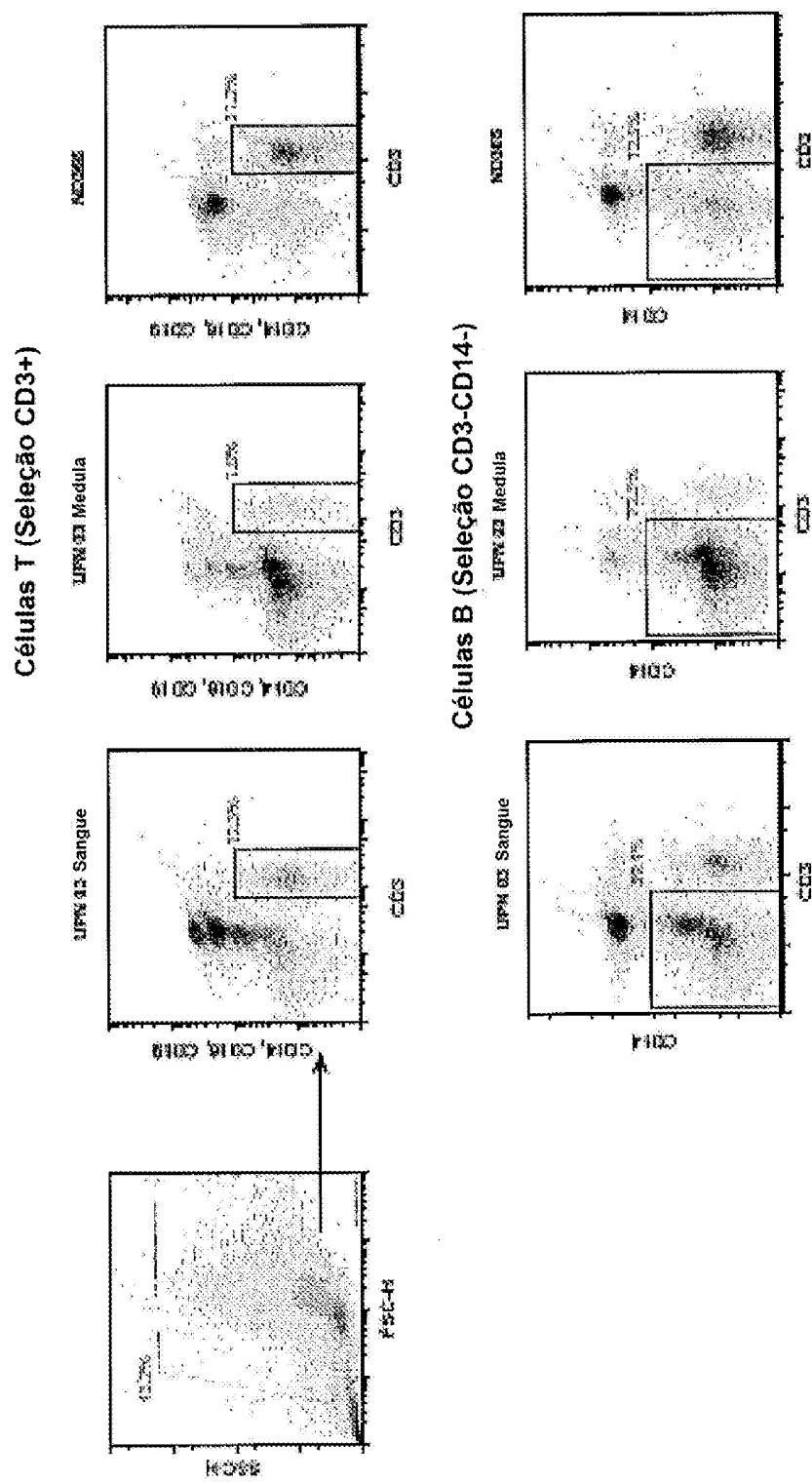


Figura 9

Indivíduo UPN	Idade/sexo Câncer tipo	Terapias previas	Carga Tumoral de LLC na Linha de base	Dose total de CART19 (células/kg)	Resposta D +30 (Duração)	
21	65m normal	Fusostatina x 4 ciclos (2022) Bisantinimab x 4 ciclos (2025) Avantuzumab x 12 sem (2026) Bimabimab 2 programas (2028) R-CyPR x 2 ciclos (2029) Levamisomab (2029) PCR x 2 ciclos (5/18-6/18/2019) Bemarimab x 1 ciclo (7/31-8/17/19) pré-CART19	Hipercelular 70% LLC 2,4x10 ⁷ células LLC (Dia -14) 1,7x10 ⁷ células LLC (Dia -1)	N/A {Dia do Ensaio}	5,2x10 ⁷ -1,3x10 ⁸ células LLC (Dia -37)	1,1x10 ⁷ (1,6x10 ⁷ /kg) (8+meses)
32	77m des 17/p123	Ambrolanib x 16 sem (5/2027) Amitriptilina x 16 sem (3/2029) Bemarimab / Bimabimab: 7/17/20/Ciclo 1 7/28/20/Ciclo 2 8/26/20/Ciclo 3) pré-CART19	Hipercelular 70% LLC 3,2x10 ⁷ células LLC (Dia -47)	2,75x10 ⁷ células LLC (Dia -1)	1,2x10 ⁷ -2,3x10 ⁷ células LLC (Dia -24)	5,8x10 ⁷ (1,3x10 ⁷ /kg) (5 meses)
23	69f (17/p13)	R-EPR-B108 x 2 ciclos (2022) R-Bisantinimab x 4 ciclos (12/26-1/27) R-Bemarimab x 1 ciclo (2028) Bemarimab x 3 ciclos (3-5/28) Amitriptilina x 11 sem (12/28-3/19) Bemarimab x 1 ciclo (6/19-7/19) (6/19) pré-CART19	Hipercelular 40% LLC 8,8x10 ⁷ células LLC (Dia -1)	N/A {Dia -10}	3,2x10 ⁷ -5,5x10 ⁷ células LLC (Dia -10)	1,4x10 ⁷ (1,48x10 ⁷ /kg) (7+meses)

1. UPN 32 Câncer tipo (Nomecnatura ISCN): 45,XY,sex(11)(q25),+del(1)(p13)(q13;q35),add(9)(p22),7del(13)(q14q34).
14,del(17)(p13)(q24)

2. UPN 33 Câncer tipo (Nomecnatura ISCN): 46,XY,sex(17)(p12)(11q14-45,del(17)(q17-21)(q11.2;q11.2)(q43q42-45,XY,-17)(p23)

3. Ver Materiais Suplementares para métodos de determinação da carga tumoral

Figura 10

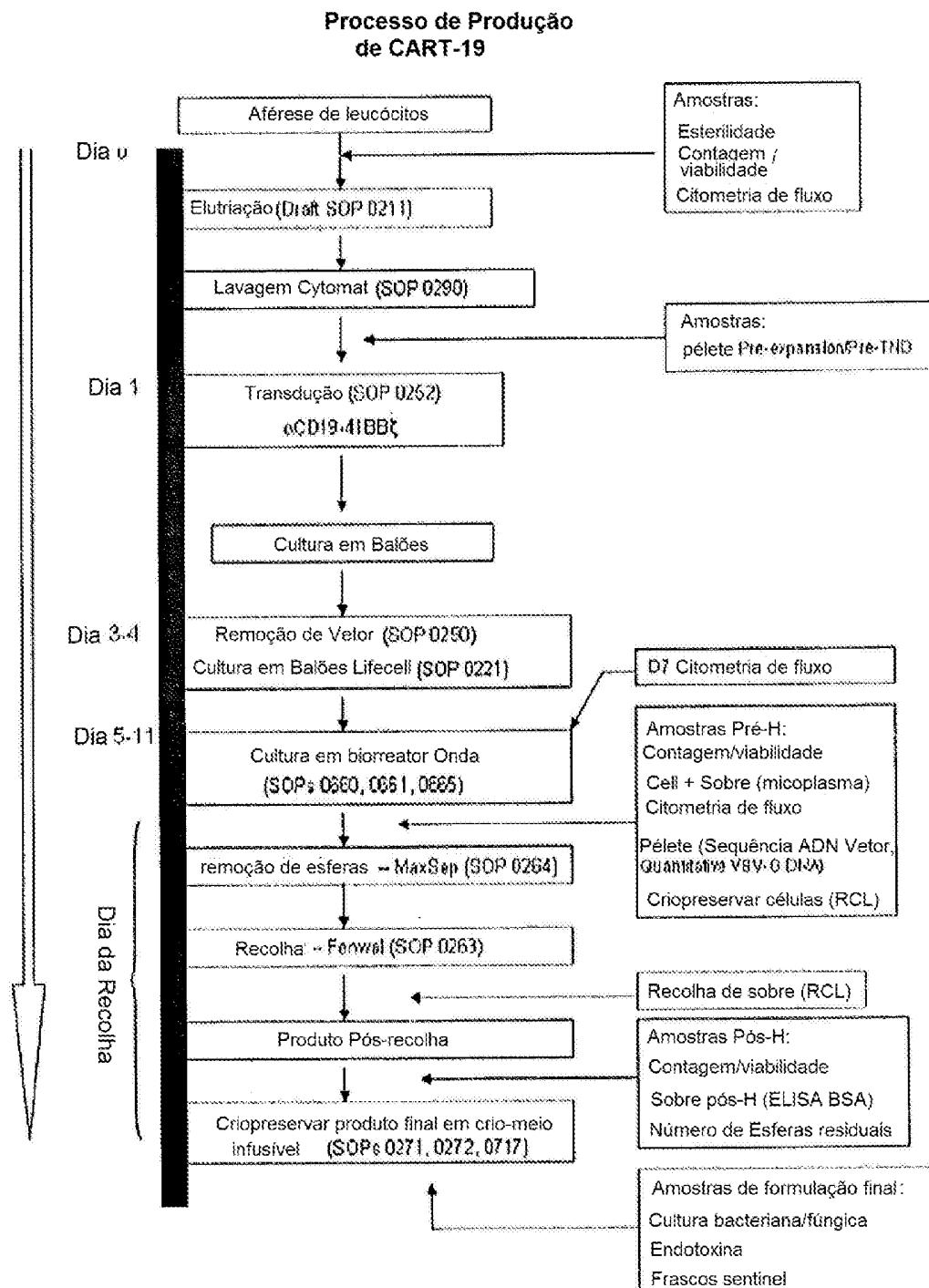
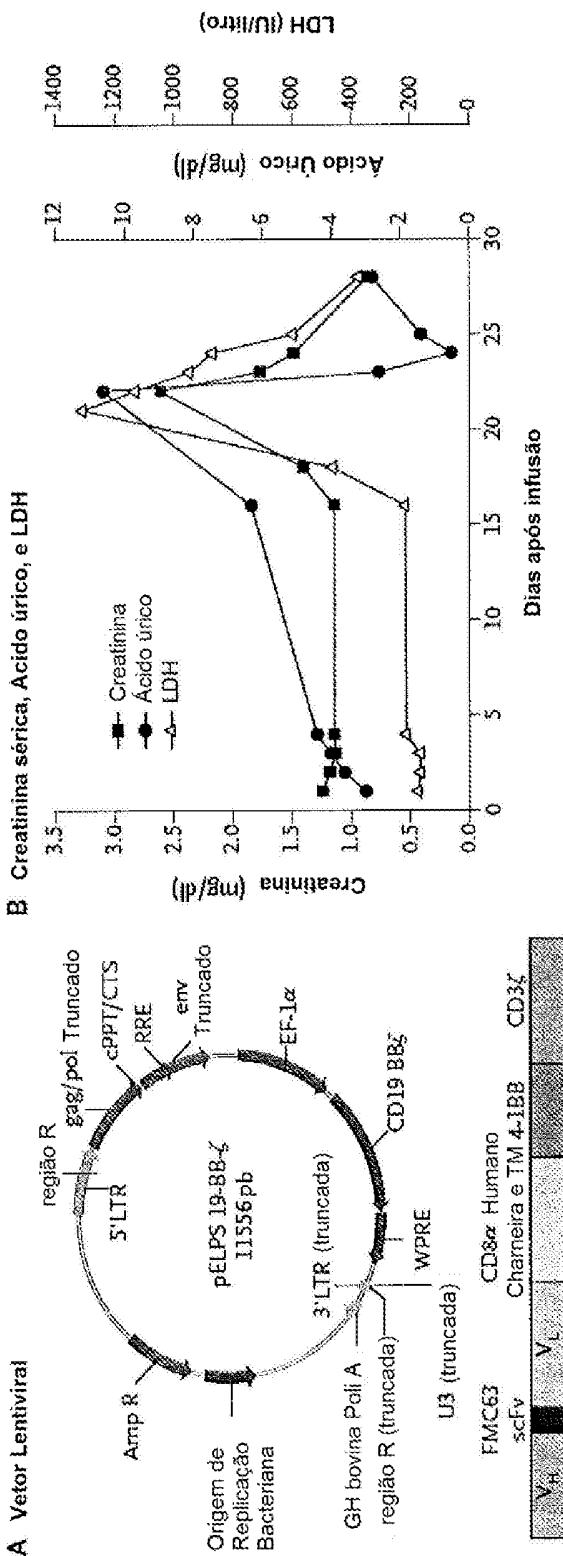
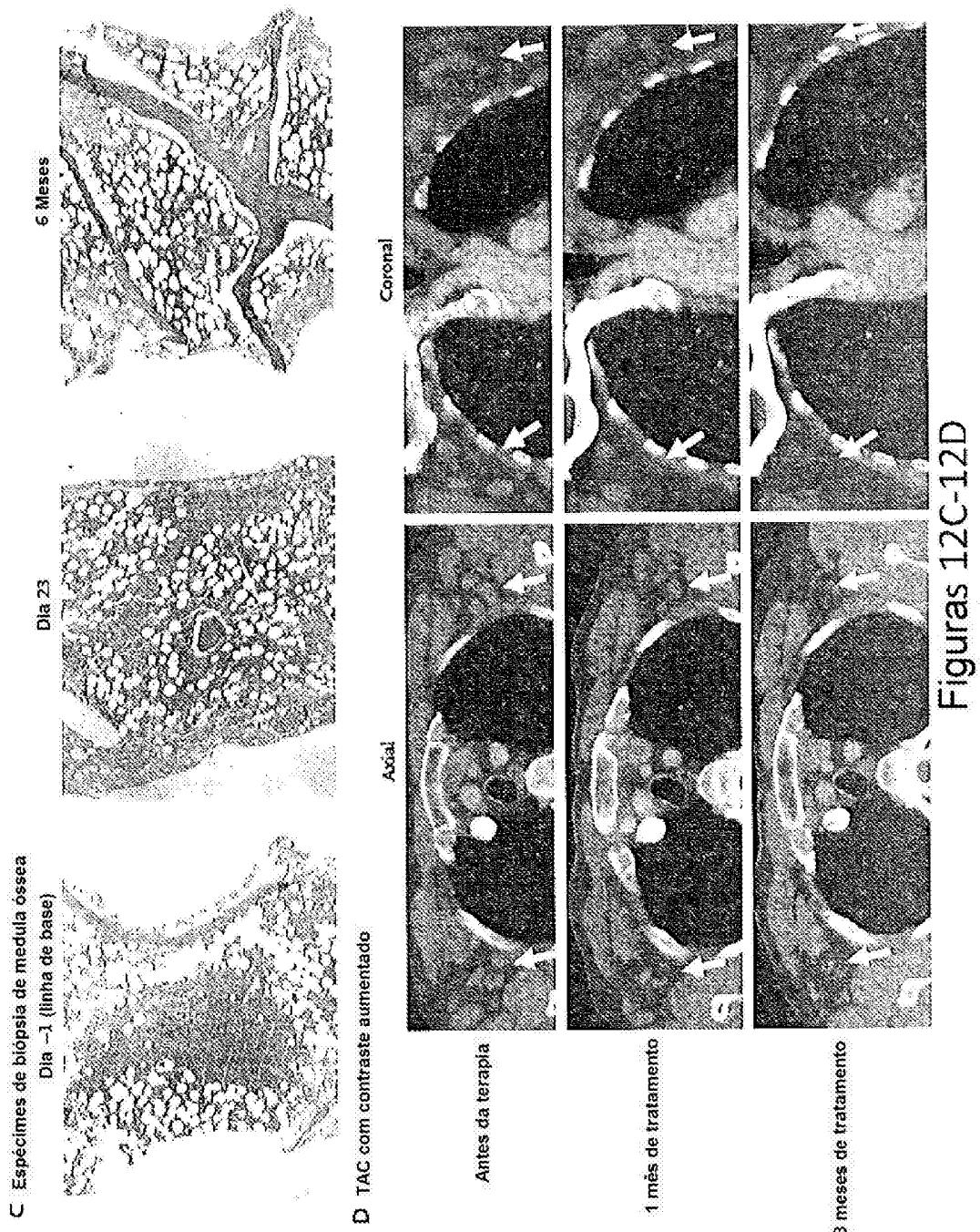
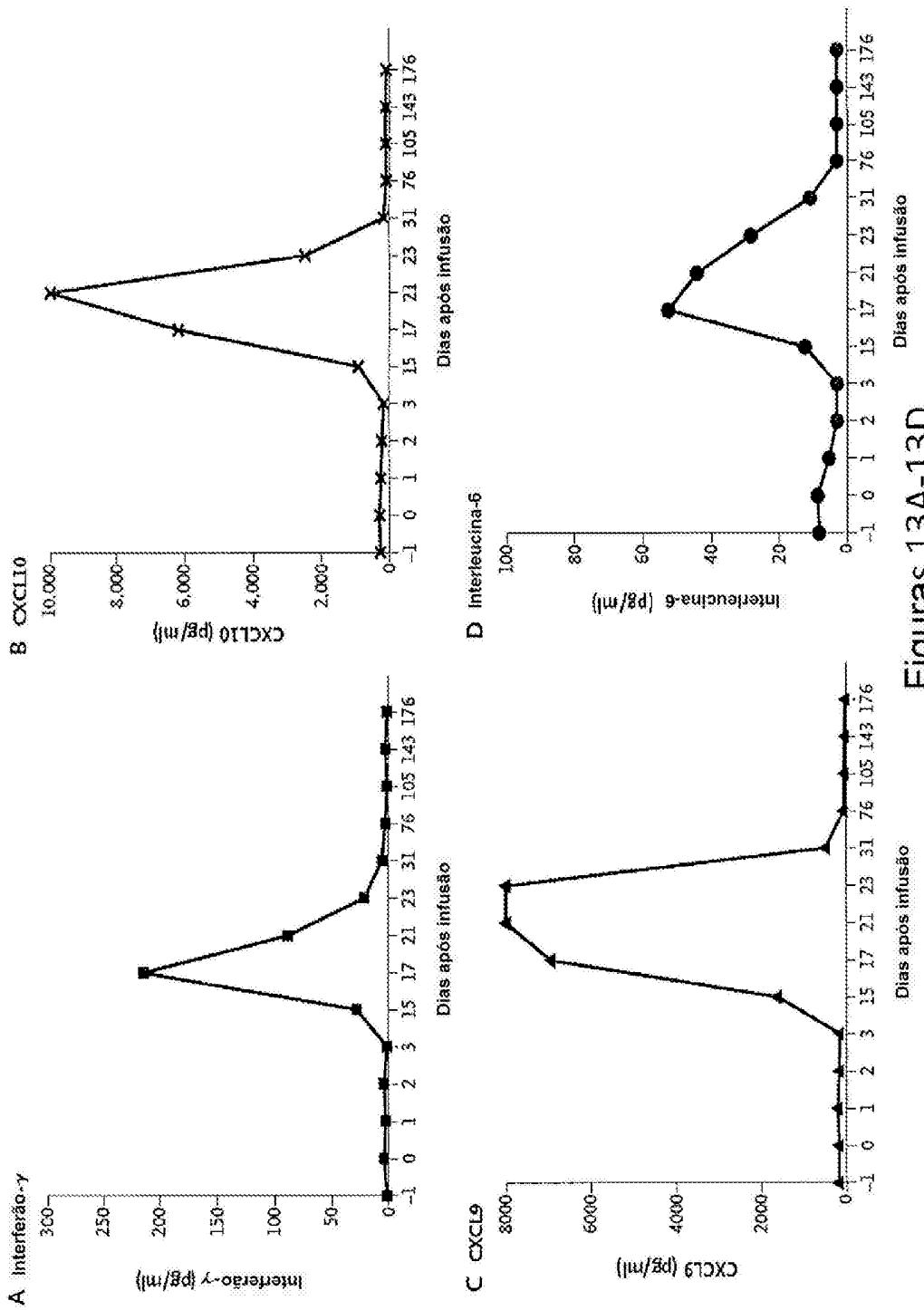


Figura 11



Figuras 12A-12B



**Figuras 13A-13D**

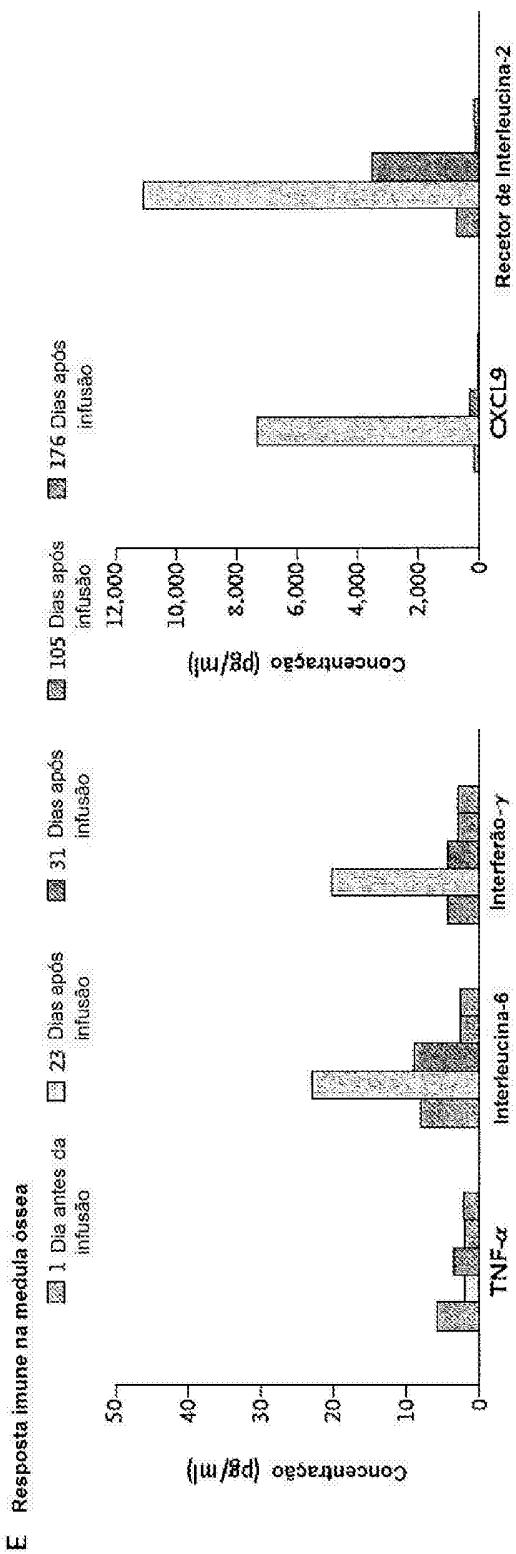
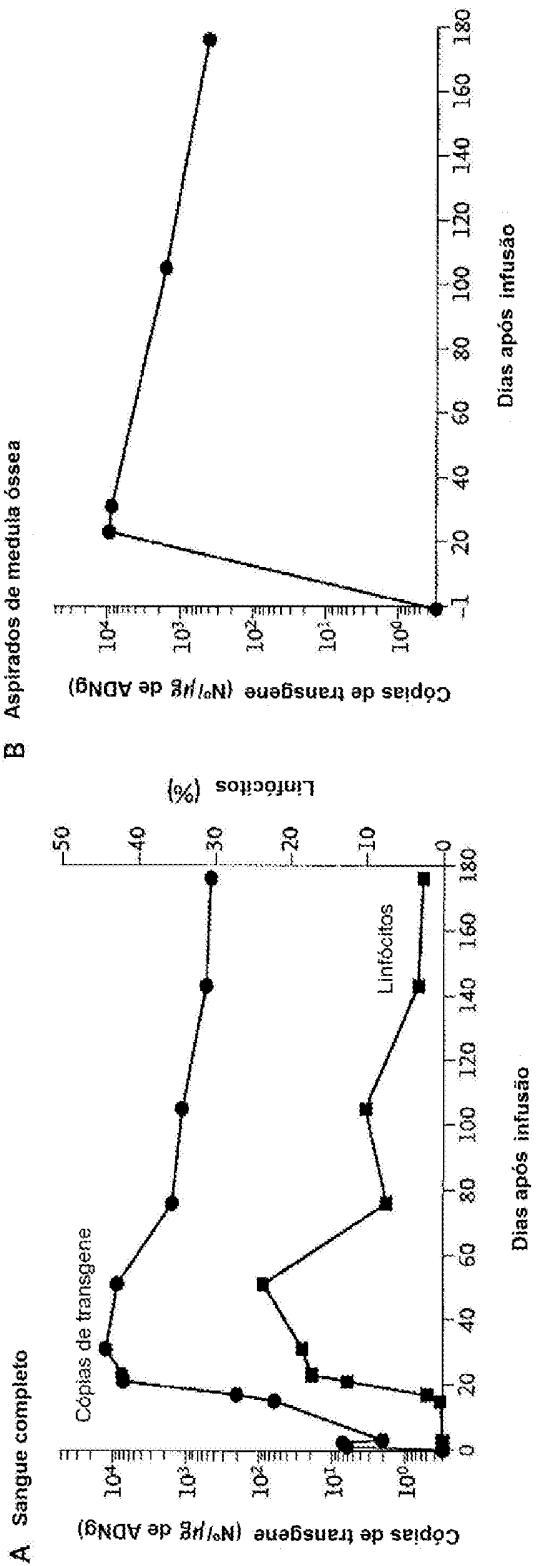


Figura 13E



Figuras 14A-14B

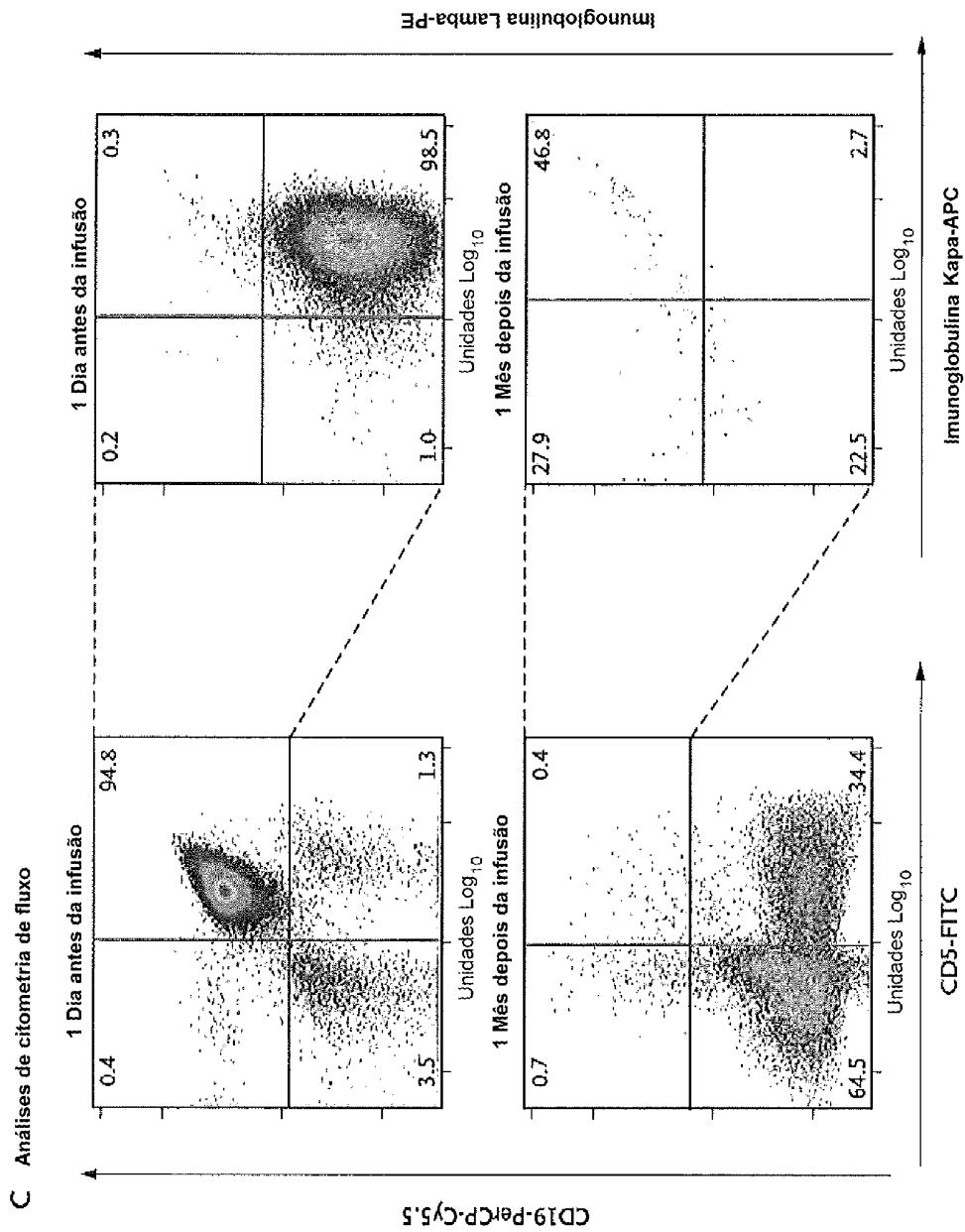


Figura 14C