



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 122021026169-5 B1

(22) Data do Depósito: 09/12/2011

(45) Data de Concessão: 12/12/2023

(54) Título: USO DE UMA CÉLULA

(51) Int.Cl.: C12N 7/00; A61K 39/00; A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: 09/12/2010 US 61/421,470; 29/06/2011 US 61/502,649.

(73) Titular(es): THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA.

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

(86) Pedido PCT: PCT US2011064191 de 09/12/2011

(87) Publicação PCT: WO 2012/079000 de 14/06/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/12/2021

(62) Pedido Original do Dividido: BR112013014265-0 - 09/12/2011

(57) Resumo: A presente invenção fornece composições e métodos para tratar o câncer em um ser humano. A invenção diz respeito 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 de transmembrana, uma região sinalizadora coestimuladora e um domínio de sinalização CD3 zeta.

USO DE UMA CÉLULA

REFERÊNCIA CRUZADA RELACIONADA COM O PEDIDO

Dividido do pedido BR112013014265-0 de 09/12/2011

[001] Este pedido reivindica a prioridade do Pedido Provisório U.S. N° 61/421.470, depositado em 9 de dezembro de 2010 e Pedido Provisório U.S. N° 611.502.649, depositado em 29 de junho de 2011, todos os quais são incorporados aqui por referência em suas totalidades.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A grande maioria de indivíduos tendo malignidades de célula B, incluindo leucemia linfocítica crônica (CLL), morrerão de sua doença. Um método para o tratamento destes indivíduos é modificar geneticamente as células T para alvejar os antígenos expressados em células tumorais através da expressão de receptores de antígenos quiméricos (CARs). CARs são receptores de antígeno que são projetados para reconhecer os antígenos de superfície celular de uma maneira independente de antígeno de leucócito humano. Tentativas no uso de células geneticamente modificadas que expressam CARs para o tratamento destes tipos de indivíduos que se satisfizeram com sucesso muito limitado. Ver, por exemplo, Brentjens et al., 2010, *Molecular Therapy*, 18:4, 666-668; Morgan et al., 2010, *Molecular Therapy*, publicado online 23 de fevereiro de 2010, páginas 1 a 9; e Till et al., 2008, *Blood*, 112:2261-2271.

[003] Na maioria dos cânceres, antígenos específicos para tumor ainda não são bem definidos, mas, em malignidades de célula B, o CD 19 é um alvo tumoral atrativo. A expressão de CD19 está restrito às células B normais ou malignas (Uckun, et al. *Blood*, 1988, 71:13-29), de modo que o CD19 é um alvo amplamente aceito para testar CARs de maneira segura. Enquanto o CARs pode disparar a ativação de célula T de uma maneira similar ao receptor de célula T endógena, um impedimento principal para a aplicação clínica desta tecnologia até hoje foi limitada na expansão *in vivo* de

células CAR+ T, o desaparecimento rápido das células após a infusão e desapontamento da atividade clínica (Jena, et al., *Blood*, 2010, 116:1035-1044; Uckun, et al. *Blood*, 1988, 71:13-29).

[004] Desta maneira, existe uma necessidade urgente na técnica para composições e métodos para o tratamento de câncer usando-se CARs que podem se expandir *in vivo*. A presente invenção indica esta necessidade.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005] A presente invenção fornece uma sequência de ácido nucleico isolada que codifica um receptor antígeno quimérico (CAR), em que o CAR compreende um domínio de ligação de antígeno, um domínio de transmembrana, uma região sinalizadora coestimuladora e um domínio de sinalização de CD3 zeta, em que o domínio de sinalização de CD3 zeta compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 24.

[006] Em uma forma de realização, a sequência de ácido nucleico codifica um CAR que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 12.

[007] Em uma forma de realização, a sequência de ácido nucleico que codifica um CAR compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 8.

[008] Em uma forma de realização, o domínio de ligação de antígeno no CAR é um anticorpo ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo. Preferivelmente, o fragmento de ligação de antígeno é um Fab ou um scFv.

[009] Em uma forma de realização, o domínio de ligação de antígeno no CAR se liga a um antígeno tumoral. Em uma forma de realização, o antígeno tumoral está associado com uma malignidade hematológica. Em uma outra forma de realização, o antígeno tumoral está associado com um tumor sólido. Ainda, em uma outra forma de realização, o antígeno tumoral é selecionado do grupo que consiste de CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolípídeo F77, EGFRvTIT, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR e qualquer combinação dos mesmos.

[0010] Em uma forma de realização, a região sinalizadora coestimuladora no CAR compreende o domínio intracelular de uma molécula coestimuladora selecionada do grupo que consiste de CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 associado com a função de linfócito (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, 137-H3, um ligante que se liga especificamente com CD83 e qualquer combinação dos mesmos.

[0011] Em uma forma de realização, o domínio de sinalização de CD3 zeta no CAR é codificado por uma sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 18.

[0012] A invenção também fornece um CAR isolado que compreende um domínio de ligação de antígeno, um domínio de transmembrana, uma região sinalizadora coestimuladora e um domínio de sinalização de CD3 zeta, em que o domínio de sinalização de CD3 zeta compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 24.

[0013] A invenção também fornece uma célula que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um CAR, em que o CAR compreende um domínio de ligação de antígeno, um domínio de transmembrana, uma região sinalizadora coestimuladora e um domínio de sinalização de CD3 zeta que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 24.

[0014] Em uma forma de realização, a célula que compreende o CAR é selecionada do grupo que consiste de uma célula T, uma célula matadora natural (NK), um linfócito T citotóxico (CTL) e uma célula T reguladora.

[0015] Em uma forma de realização, a célula que compreende o CAR apresenta uma imunidade antitumoral quando o domínio de ligação de antígeno do CAR liga a seu antígeno correspondente.

[0016] A invenção também fornece um vetor que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um CAR, em que o CAR compreende um domínio de ligação de antígeno, uma região sinalizadora coestimuladora e um

domínio de sinalização de CD3 zeta, em que o domínio de sinalização de CD3 zeta compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 24.

[0017] A invenção também fornece um método para estimular uma resposta imune mediada por célula T a uma população ou tecido de célula alvo em um mamífero. Em uma forma de realização, o método 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 antígeno, uma região sinalizadora coestimuladora e um domínio de sinalização de CD3 zeta que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 24, em que o domínio de ligação de antígeno é selecionado para reconhecer especificamente a população de célula alvo ou tecido.

[0018] A invenção também fornece um método de fornecer uma imunidade antitumoral em um mamífero. Em uma forma de realização, o método 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 antígeno, uma região sinalizadora coestimuladora e um domínio de sinalização de CD3 zeta que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 24, desse modo fornecendo uma imunidade antitumor no mamífero;

[0019] A invenção também inclui um método de tratar um mamífero tendo uma doença, distúrbio ou condição associada com uma expressão elevada de um antígeno tumoral. Em uma forma de realização, o método 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 antígeno, uma região sinalizadora coestimuladora e um domínio de sinalização de CD3 zeta que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 24, desse modo tratando o mamífero.

[0020] Em uma forma de realização, a célula é uma célula T autóloga.

[0021] Em uma forma de realização, o antígeno tumoral é selecionado do grupo que consiste de CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD3311L3Ra, c-Met, PSMA, Glicolípídeo F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-I TCR, MACE A3 TCR e qualquer combinação dos mesmos.

[0022] A invenção também fornece um método de tratar um ser humano com leucemia linfocítica crônica. Em uma forma de realização, o método compreende administrar a um ser humano uma célula T geneticamente projetada para expressar um CAR em que o CAR compreende um domínio de ligação de antígeno, uma região sinalizadora coestimuladora e um domínio de sinalização de célula CD3 zeta que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 24.

[0023] Em uma forma de realização, ser humano é resistente a pelo menos um agente quimioterapêutico.

[0024] Em uma forma de realização, a leucemia linfocítica crônica é leucemia CD19+ refratária e linfoma.

[0025] A invenção também inclui um método de gerar uma população persistente de célula T geneticamente projetada em um ser humano diagnosticado com câncer, Em uma forma de realização, o método compreende administrar a um ser humano uma célula T geneticamente projetada para expressar um CAR em que o CAR compreende um domínio de ligação de antígeno, uma região sinalizadora coestimuladora e um domínio de sinalização de CD3 zeta que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 24, em que a população persistente de célula T geneticamente projetada persiste no ser humano por pelo menos um mês após a administração.

[0026] Em uma forma de realização, a população persistente de célula T geneticamente projetada compreende pelo menos uma célula selecionada do grupo que consiste de uma célula T que foi administrada ao ser humano, uma progênie de uma célula T que foi administrada ao ser humano e uma

combinação dos mesmos.

[0027] Em uma forma de realização, a população persistente de célula T geneticamente projetada compreende uma célula T de memória.

[0028] Em uma forma de realização, a população persistente de célula T geneticamente projetada persiste no ser humano por pelo menos três meses após a administração, Em uma outra forma de realização, a população persistente de célula T geneticamente projetada persiste no ser humano por 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.

[0029] Em uma forma de realização, a leucemia linfocítica crônica é tratada.

[0030] A invenção também fornece um método de expandir uma população de célula T geneticamente projetadas em um ser humano diagnosticado com câncer. Em uma forma de realização, o método compreende administrar a um ser humano uma célula T geneticamente projetada para expressar um CAR em que o CAR compreende um domínio de ligação de antígeno, uma região sinalizadora coestimuladora e um domínio de sinalização de CD3 zeta que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 24, em que a célula T geneticamente projetada administrada produz uma população de células T de progênie no ser humano.

[0031] Em uma forma de realização, as células T de progênie no ser humano compreende uma célula T de memória.

[0032] Em uma forma de realização, a célula T é uma célula T autóloga.

[0033] Em uma outra forma de realização, o ser humano é resistente a pelo menos um agente quimioterapêutico.

[0034] Em uma forma de realização, o câncer é leucemia linfocítica crônica. Em uma outra forma de realização, a leucemia linfocítica crônica é leucemia CD19+ refratária e linfoma.

[0035] Em uma forma de realização, a população de células T de progênie persiste no ser humano por pelo menos três meses após a administração. Em uma outra forma de realização, a população de células T de progênie persistem no ser humano por 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,

[0036] Em uma forma de realização, o câncer é tratado.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0037] A seguinte descrição detalhada das formas de realização preferidas da invenção serão melhor entendidas quando lidas em conjunção com os desenhos anexos. Para o propósito de ilustrar a invenção, são mostradas nos desenhos, as formas de realização que são presentemente preferidas. Deve ser entendido, entretanto, que a invenção não é limitada às disposições e instrumentalidades precisas das formas de realização mostradas nos desenhos.

[0038] A Figura 1, que compreende as Figuras 1A até 1C, é uma série de imagens das representações esquemáticas do vetor de transferência de gene e transgene, projeto de fabricação de célula T modificada por gene e de protocolo clínico. A Figura 1A descreve os vetores lentivirais e transgene que mostram os elementos funcionais principais. Um vetor lentiviral de grau clínico pseudotipado de proteína G de vírus da estomatite vesicular (pELPs 19BBz progetato) que direciona a expressão de antiCD19 seFv derivado de anticorpo monoclonal de murino FMC63, domínio de junta e transmembrana CD8 α humano e domínios de sinalização de 4-1BB e CD3zeta humanos foi produzido. A expressão constitutiva do transgene foi direcionado pela inclusão de EF-1 α (promotor do fator 1 α de alongamento); LTR, repetição e terminal longo; RRE, elemento de resposta rev. (cPPT) e a sequência de terminação central (CTS). A figura não está em escala. A Figura 1B descreve a fabricação de célula T. As células autólogas foram obtidas por intermédio

de uma aférese e as células T foram enriquecidas pela elutriação de célula mononuclear, células de leucemia lavadas e residuais esgotadas pela ação de contas paramagnéticas revestidas com antiCD3/CD28 par a seleção positiva e ativação de células T. O vetor lentiviral foi adicionado no período de ativação da célula e foi lavado no dia 3 após o início da cultura. As células foram expandidas em um dispositivo de plataforma de agitação (WAVE Bioreactor System) por 8 a 12 dias. No dia final da cultura, as pérolas foram removidas pela passagem em um campo magnético e as células CART19 T coletadas e criopreservadas em meio colocável em infusão. A Figura IC descreve o projeto de protocolo clínico. Aos indivíduos foi dada a quimioterapia de linfoanulação, como descrito, seguido por infusão de CART19 #1 por gotejamento de fluxo por gravidade i.v. em um período de 15 a 20 minutos. A infusão foi dada usando-se um método de dose dividida por 3 dias (10 %, 30 %, 60 %) começando de 1 a 5 dias após a finalização da quimioterapia. Os ensaios de ponto final foram conduzidos no estudo de 4 semanas. Na conclusão do monitoramento ativo, os indivíduos foram transfectados a um protocolo de destinação por longo prazo segue assim como pelas instruções da FDA.

[0039] Figura 2, que compreende as Figuras 2A até 2F, é uma série de imagens que demonstram expansão *in vivo* sustentada e a persistência no sangue e medula óssea de células CART19. O DNA isolado de sangue total como descrito na Figura 2A até 2C ou medula óssea como descrito na Figura 2D até 2F, as amostras obtidas de UPN 01 como descrito na Figura 2A e 2D, UPN 02 como descrito na Figura 2B e 2E e UPN 03 como descrito na Figura 2C e 2F foi submetido na carga à análise de Q-PCR usando-se um ensaio qualificado para detectar e quantificar as sequências CART 19. Cada ponto de dado representa a média de medições em triplicata em 100 a 200 ng de DNA genômico, com % de CV máximo menor do que 1,56 %. Parâmetros de aprovação/reprovação para o ensaio incluem faixas pré-estabelecidas para o

arco e a eficiência da amplificação e amplificação de uma amostra de referência. O limite inferior de quantificação para o ensaio estabelecido pela faixa de curva padrão foi 2 cópias de DNA genômico transgene/micrograma; os valores da amostra abaixo cujos números são considerados estimam e representam se pelo menos 213 réplicas geraram um valor de Ct com % de CV para os valores de 15 %. As células CART19 foram submetidas à infusão no dia 0, 1 e 2 para a UPN 01 e UPN 03 e dias 0, 1, 2 e 11 para UPN 02.

[0040] Figura 3, que compreende as Figuras 3A até 3D, é uma série de imagens que demonstram citocinas de soro e de medula óssea antes e após a infusão de célula CAR T; as medições longitudinais de mudanças em citocinas de soro, receptores de quimiocina e citocina em UPN 01 como descrito na Figura 3A, UPN 02 como descrito na Figura 3B e UPN 03 como descrito na Figura 3C, no dia indicado após a infusão de célula CART19 e estimativas seriais dos mesmos analitos na medula óssea de UPN 03 como descrito na Figura 3D. As amostras foram submetidas à análise multiplex usando-se tecnologia de série de pérolas Luminex bead e kits multiplex pré-montados e validados. Os analitos com um uma mudança de ≥ 3 vezes são indicados e plotados como mudança relativa da linha de base como descrito na Figura 3A até 3C ou como valores absolutos como descrito na Figura 3D. Os valores absolutos para cada analito naquele ponto de tempo foram derivados a partir de uma curva padrão com base em proteína recombinante em uma série de dissolução de 8 pontos de 3 vezes, com limites superiores e inferiores de quantificação (ULOQ, LLOQ) determinado pelos valores de corte observados/esperados de 80 a 120 % para as curvas padrão. Cada amostra foi avaliada em duplicata com os valores médios calculados e % de CV na maioria dos casos menor do que 10 %. Para acomodar a apresentação de dados consolidados no contexto da faixa ampla para os valores absolutos, os dados são apresentados como mudança de dobra nos valores de linha de base para cada analito. Nos casos onde os valores de linha de base são foram

detectáveis, metade do valor de curva padrão mais baixo foi usado como o valor de linha de base, as faixas de curva padrão para os analitos e valores de linha de base (dia 0) (listados em parênteses para UPN01, 02 e 03), todos 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-113: 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).

[0041] Figura 4, que compreende as Figuras 4A até 4D, é uma série de imagens que descreve a expressão de CART19 em superfície prolongada e estabelecimento de CARs de memória funcional *in vivo*. A Figura 4A descreve a detecção de linfócitos CD3⁺ que expressam CAR e a ausência de célula B na periferia e medula óssea. Sangue periférico recentemente processado ou células de medula óssea mononuclear obtidas de UPN 03 no dia 169 após a infusão de célula CART19 foram avaliadas pela citometria de fluxo para a expressão de superfície de citometria de fluxo para a expressão de superfície de CAR 19 (superior) ou presença de células B (inferior); as um controle, PBMC obtidas de um doador saudável ND365 foram tingidas. A estratégia de entrada para as populações de célula CD3⁺ e B é apresentada na Figura 9. Para avaliar a expressão de CAR19 em linfócitos CD3⁺, as amostras foram cotingidas com anticorpos a CD14-PE-Cy7 e CD16-PE-Cy7 (canal de depósito) e CD3-FITC, positivamente incluído em CD3⁺ e avaliado quanto à expressão de CAR19 nos compartimentos de linfócito CD8⁺ e CDS pelo cotingimento com CD8a-PE e o anticorpo de idiótipo antiCAR 19 conjugado a Alexa-647. Os dados nas plotagem são incluídos na população de célula negativa de canal de depósito/positiva de CD3. Para avaliar a presença de células B, as amostras foram cotingidas com os anticorpos para CD14-APC e CD3-FITC (canais de depósito) e avaliados quanto à presença de células B na

fração negativa do canal de depósito pelo cotingimento com anticorpos para CD20-PE e CD19-PE-Cy-7. Em todos os casos, os quadrantes de entrada negativos foram estabelecidos em controle sem tingimento como descrito nas Figuras 4B e 4C. A imunofenotipagem de célula T de CD4+ (Figura 4B) e subséries de célula T CD8+ (Figura 4C) foram mostrados. As amostras de sangue periférico congelado de UPN 03 obtida pela aférese no dia 56 e 169 após a infusão de célula T foram repousadas durante a noite em meio de cultura sem nenhum fator adicionado, lavado e submetido a imunofenotipagem multi-paramétrica para a expressão de marcadores de memória de célula T, ativação e exaustão. A estratégia de entrada, como descrito na Figura 8, envolveu uma entrada inicial no canal de depósito de células negativas (CD14, CD16, Live/Dead Aqua) e positivas CD3, seguido pelas entradas positivas em células CD4+ e CD8+, entradas e quadrantes foram estabelecidos usando-se para os controles de FMO (CAR, CD45RA, PD-1, CD25, CD127, CCR7) ou pela entrada de populações de célula positiva (CD3, CD4, CD8) e subséries claramente delineadas (CD27, CD28, CD57); os dados foram apresentados após a transformação biexponencial para a visualização e objetivos de eventos. A Figura 4D descreve a competência funcional de células de CAR persistentes. As amostras de sangue periférico congeladas de UPN 03 obtidas pela aférese no dia 56 e 169 após a infusão de célula T foram repousadas durante a noite no meio de cultura sem fatores adicionados, lavados e avaliados diretamente ex-vivo quanto à capacidade de reconhecer células alvo que expressam CD19 usando-se os ensaios de desgranulação de CD107. Seguindo uma incubação de duas horas na presença de antiCD28, antiCD49d e CD107-FITC, misturas celulares foram coletadas, lavadas e submetidas à análise citométrica de fluxo de parâmetros múltiplos para avaliar a capacidade das células CART 19 para a desgranulação em resposta aos alvos que expressam CD19. A estratégia de entrada envolveu uma entrada inicial nos canais de depósito de células negativas (CD14-PE-

Cy7, CD16-PE-Cy7, Live/Dead Aqua) e células positivas CD3-PE, seguido pela entrada em células positivas CD8-PE-Texas Red; os dados apresentados são para a população incluída em CD8+. Em todos os casos, os quadrantes de entrada negativos foram estabelecidos em controles sem tingimento.

[0042] Figura 5, que compreende as Figuras 5A até 5C, é a série de imagem que descrevem os resultados de experimentos que avaliam as respostas clínicas após a infusão de células CART19. A Figura 5A descreve que o UPN 02 foi tratado com dois ciclos de rituximab e de bendamustina com resposta mínima (RIB, seta). As células CART19 T foram submetidas a infusão começando 4 dias após bendamustina apenas (B, seta). A leucemia resistente a rituximab e bendamustina foi rapidamente limpa do sangue, como indicado pela diminuição na contagem de linfócito absoluta (ALC) de 60.600/ μ l a 200/ μ l dentro dos 18 dias da infusão. O tratamento de corticoesteróide foi iniciado no dia 18 após a infusão devido ao mal-estar e síndrome febril não infecciosa. A linha de referência (pontilhada) indica o limite superior normal para ALC. A Figura 5B descreve os resultados de experimentos do exemplo tingindo a biópsia da medula óssea sequencial ou espécimes de coágulo do indivíduo UPN 01 e 03 para CD20. A infiltração de pré-tratamento com leucemia presente em ambos os indivíduos esteve ausente nos espécimes de pós-tratamento acompanhados pela normalização da celularidade e hematopoiese de trilinear. UPN 01 não teve apenas células CLL detectadas como estimado pela citometria de fluxo, citogenética e fluorescência e hidridização in situ ou células B normais detectadas pela citometria de fluxo em medula óssea ou sangue. UPN 03 teve 5 % de células B negativas de CD5 normal residual confirmado pela citometria de fluxo no dia +23, que também os mostraram ser policlonais; nenhuma célula B normal foi detectada no dia +176. A Figura 5C descreve os resultados dos experimentos que usam a formação de imagem de sequencial para estimar a resolução rápida da linfadenopatia generalizada resistente a quimioterapia.

Massas anxilares bilaterais resolvidas por 83 (UPN 01) e 31 (UPN 03) dias após a infusão, como indicado por setas e círculo.

[0043] A Figura 6, que compreende as Figuras 6A até 6C, é uma série de imagens que descrevem as contagens de linfócitos absolutas e células CART19+ totais em circulação para UPN 01, 02, 03. O número total de linfócitos (Total normal e células CLL) vs. Células CART19+ totais na circulação é plotada para todos os 3 indivíduos usando-se a contagem de linfócito absoluta a partir dos valores CBC e assumindo um volume de 5,0 litros de sangue. O número total de células CART19 na circulação foi calculada pelo uso de valores CBC tandem com contagens de linfócito absoluto e os valores de marcação de Q-PCR como descrito na Figura 2, que converte cópias/ μ g de DNA para alvejar a marcação de % média como descrito em qualquer lugar aqui. A marcação da % de Q-PCR foi observado correlacionar intimamente (variação de <2 vezes) com a caracterização citométrica de fluxo dos produtos de infusão e com os dados das amostras quando a os dados de citometria de fluxo concomitante esteve disponível para enumerar as células CART19 pelo tingimento.

[0044] Figura 7, que compreende as Figuras 7A até 7D é uma série de imagens que descrevem os experimentos que envolvem a detecção ex vivo direta de células positivas de CART19 em UPN-01 PBMC 71 dias após a infusão de célula T. UPN-01 PBMC coletou pós-aférese fresca no dia 71 pós-infusão ou congelado no tempo de aférese para a fabricação do produto de célula T (linha de base) e viavelmente descongelado antes do tingimento, foram submetidos à análise citométrica de fluxo para detectar a presença de células CART19 que expressam a porção CAR19 na superfície. Para avaliar a expressão de CAR19 em linfócitos, as amostras foram cotingidas com CD3-PE e o anticorpo de idiótipo antiCAR19 conjugado a Alexa-647 ou cotingido com CD3-PE sozinho (FMO para CAR19), a Figura 7A descreve que a entrada de linfócito inicial foi estabelecida com base na dispersão avançada e

secundária (FSC vs SSC), seguido pela entrada nas células CD3+. A Figura 7B descreve a entrada de linfócito de CD3+; a Figura 7C descreve o tingimento idiótipo de CAR; A Figura 7D descreve o CAR idiótipo FMO. A entrada positiva de CAR19 foi estabelecida nas amostras de CAR19 FMO.

[0045] A Figura 8, que compreende as Figuras 8A até 8C, é uma série de imagens que descrevem a estratégia de entrada para identificar a expressão de CART19 usando-se a citometria de fluxo policromático em espécimes de sangue UPN 03. A estratégia de entrada para a Figura 8C é mostrada para a amostra UPN 03 Dia 56 e é representativo da estratégia usada na amostra UPN 03 Dia 169. A Figura 8A descreve a entrada primária: Dump (CD14, CD16, LIVE/Dead Aqua) negativo, CD3-positivo. A Figura 8B descreve entradas secundárias: CD4-positivo, CD8-positivo. A Figura 8C descreve entradas terciárias: CAR19-positivo e CAR19-negativo, estabelecido em amostras CAR FMO (painéis mais a direita).

[0046] A Figura 9 descreve a estratégia de entrada para identificar diretamente a expressão de CART19 e as células B em espécimes de sangue e medula. A estratégia de entrada para a Figura 4A, que mostra a detecção de linfócitos de CD3+ que expressa CAR e ausência de células B na periferia e medula óssea: plotagem esquerda: entrada de célula; painel superior: entrada positiva para células CD3+, painel inferior: entrada negativa (CD 14-negativo, CD3-negativo) para células B. NC365, células de controle de sangue periférico de um doador saudável.

[0047] A Figura 10 é uma sumarização da imagem de demografia e resposta do indivíduo.

[0048] A Figura 11 descreve o processo de fabricação das células CART-19

[0049] A Figura 12, que compreende as Figuras 12A até 12D, é uma série de imagens que descrevem a resposta clínica em um indivíduo. A Figura 12A mostra o vetor lentiviral usado para infectar as células T a partir de um

indivíduo. Um vetor lentiviral de grau clínico pseudotipado de proteína G do vírus da estomatite vesicular (pELPs 19-BB-z) que direciona a expressão de antiCD19 scFv derivada de anticorpo monoclonal de murino FMC63, domínio de junta e transmembrana CD8a humano e domínios de sinalização de 4-1BB e CD3 humanos foram produzidos.

[0050] Os Detalhes do transgene CAR19, na parte inferior da Figura 12A, mostra os elementos funcionais maiores. A Figura não está em escala. 3'LTR diz respeito a repetição de terminal longo 3'; 5'LTR, 5' repetição de terminal longo; Amp R, gene de resistência à ampicilina; GH Poli A bovino, hormônio de desenvolvimento bovino com a cauda de poliadenilação; cPPT/CTS, trato de polipurino central com sequência de terminação central; EF-1 α , fator de alongamento 1-alfa; env, envelope; gag, antígeno específico por grupo; pol, polimerase que codifica o gene HIV e transcriptase reversa; R, repetição; RRE, elemento de resposta rev; scFv, fragmento variável de cadeia simples; TM, transmembrana; e WPRE, elemento regulador pós-transcricional do vírus de hepatite de Marmota. A Figura 12B mostra os níveis de creatinina de soro, ácido úrico e desidrogenase de lactato (LDH) a partir do dia 1 ao dia 28 após a primeira infusão da célula CART19. Os níveis de pico coincidem com a hospitalização para a síndrome da lise tumoral. A Figura 12C mostra as espécimes da biopsia de medula óssea obtidas 3 dias após a quimioterapia (dia -1, antes da infusão da célula CART19) e 23 dias e 6 meses após a infusão da célula CART19 (hematoxilina e eosina). A espécime da linha de base mostra a medula óssea hiper celular (60 %) com hematopoiese de trilinear, infiltrada pelos agregados predominantemente intersticiais de linfócitos maduros, menores que levam em conta por 40 % da celularidade total. A espécime obtida no dia 23 mostra os agregados linfóides residuais (10 %) que foram negativos pela leucemia linfóide crônica (CLL), com uma mistura das células T e células B CD5-negativo. A espécime obtida 6 meses após infusão mostra a hematopoiese de trilinear sem os agregados

linfóides e ausência contínua de CLL. A Figura 12D mostra as varreduras CT intensificadas por contraste obtidas antes do indivíduo ser enrolado no estudo e 31 dias e 104 dias após a primeira infusão. A varredura CT de pré-infusão revela as massas bilaterais 1-a-3-cm. A regressão da linfadenopatia auxiliar ocorrida dentro de 1 mês após a infusão e foi sustentada. As setas iluminadas de vários linfonodos estendidos antes da terapia e respostas de linfonodos em varreduras CT comparáveis após a terapia.

[0051] A Figura 13, que compreende as Figuras 13A até 13E, é uma série de imagens descreve as citocinas de soro e medula óssea antes e depois da infusão da célula T do receptor antígeno quimérico. As medições seriais da citocina interferon- γ (Figura 13A), o interferon- γ -estimulado por quimiocinas C-X-C quimiocina motivo 10 (CXCL10) (Figura 13B) e C-X-C ligante motivo 9 (CXCL9) (Figura 13C) e interleucina-6 (Figura 13D) foram medidos nos pontos de tempo indicados. Os aumentos nestas citocinas inflamatórias e quimiocinas coincidem com o início da síndrome de lise tumoral. Os níveis baixos de interleucina-6 foram detectados na linha de base, considerando interferon- γ , CXCL9 e CXCL10 estavam abaixo dos limites da detecção na linha de base. As faixas da curva padrão para os analitos e linha de base no indivíduo, dado nos parênteses, foram como seguem: interferon- 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 de tumor (TNF- α), 1,9 a 4005 pg por mililitro (não detectável); e receptor de interleucina-2 solúvel, 13,4 a 34,210 pg por mililitro (644 pg por mililitro). A Figura 13E mostra a indução de uma resposta imune na medula óssea. As citocinas TNF- α , interleucina-6, interferon- γ , quimiocina CXCL9 e receptor de interleucina-2 solúvel foram medidos nos fluidos de sobrenadantes obtidos a partir dos aspirados de medula óssea nos dias indicados antes e depois da infusão da célula CART19. O aumento nos níveis

de interleucina-6, interferon- γ , CXCL9 e receptor de interleucina-2 solúvel coincide com a síndrome de lise tumoral, infiltração da célula T do receptor antígeno quimérico de pico e erradicação do infiltrado leucêmico.

[0052] A Figura 14, que compreende as Figuras 14A até 14C, é uma série de imagens que descreve a expansão e persistência das células T do receptor antígeno quimérico in vivo. O DNA genômico (gDNA) foi isolado a partir das amostras de sangue total dos indivíduos (Figura 14A) e aspirados de medula óssea (Figura 14B) coletados nos pontos de tempo seriais coletados antes e depois da infusão da célula T do receptor antígeno quimérico e usado para a análise da cadeia de polimerase em tempo real quantitativo (PCR). Como avaliado na base do DNA transgênico e a porcentagem dos linfócitos que expressam CAR 19, as células T do receptor antígeno quimérico expandidas aos níveis que foram mais do que 1000 vezes tão alto quanto níveis de enxerto inicial no sangue periférico e medula óssea. Os níveis de pico das células T do receptor antígeno quimérico foram temporariamente correlacionados com a síndrome de lise tumoral. Uma amostra sanguínea obtida no dia 0 e uma amostra de medula óssea obtida no dia 1 não tem sinal PCR na linha de base. A análise citométrica de fluxo da medula óssea aspira na linha de base (Figura 14C) mostra a infiltração predominante com as células CD19+CD5+ que foram clonais, como avaliados por meios do tingimento de cadeia leve de capa de imunoglobulina, com uma falta de células T. No dia 31 após a infusão, as células T CD5+ estavam presentes e nenhuma das células B normais ou malignas foram detectadas. Os números indicam que a frequência relativa das células em cada quadrante. Tanto o eixo x quanto o eixo y mostram uma escala de log10. A estratégia de entrada envolvida na abertura inicial nas células CD19+ e CD5+ nas caixas da esquerda e a identificação subsequente da expressão de capa e lambda de imunoglobulina na subsérie CD 19+CD5+ (caixas na direita)

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0053] A invenção diz respeito às composições e métodos para o tratamento contra o câncer incluindo mas não limitado a malignidades hematológicas e tumores sólidos. A presente invenção diz respeito à estratégia da transferência da célula adotiva das células T transduzidas para expressar um receptor antígeno quimérico (CAR). CARs são moléculas que combinam com a especificidade com base em anticorpo por um antígeno desejado (por exemplo, antígeno de tumor) com um domínio intracelular de ativação do receptor da célula T para gerar uma proteína quimérica que exibe uma atividade imune celular antitumor específico.

[0054] A presente invenção diz respeito geralmente ao uso das células T geneticamente modificadas para estavelmente expressar um CAR desejado. As células T que expressam um CAR são referidas neste como as células T CAR ou células T CAR modificadas. Preferivelmente, a célula pode ser geneticamente modificada para expressar estavelmente um domínio de ligação de anticorpo em sua superfície, conferindo a especificidade de antígeno novo que é independente de MHC. Em alguns exemplos, a célula T é geneticamente modificada para expressar estavelmente um CAR que combina um domínio de reconhecimento de antígeno de um anticorpo específico com um domínio intracelular da cadeia CD3-zeta ou proteína FcγRI em uma proteína quimérica simples.

[0055] Em uma forma de realização, o CAR da invenção compreende um domínio extracelular tendo um domínio de reconhecimento de antígeno, um domínio de transmembrana e um domínio citoplásmico. Em uma forma de realização, o domínio de transmembrana que naturalmente é associado com um dos domínios no CAR é usado. Em uma outra forma de realização, o domínio de transmembrana pode ser selecionado ou modificado pela substituição de aminoácido para evitar a ligação de tais domínios ao domínio de transmembranas das mesmas ou diferentes proteínas de membrana de superfície para minimizar as interações com outros membros do complexo receptor.

Preferivelmente, o domínio de transmembrana é o domínio de junta CD8 α .

[0056] Com relação ao domínio citoplásmico, o CAR da invenção pode ser projetada para compreender o CD28 e/ou domínio sinalização 4-1BB por si só ou ser combinado com qualquer outros domínios citoplásmicos desejados úteis no contexto de CAR da invenção. Em uma forma de realização, o domínio citoplásmico de CAR pode ser projetada ainda para compreender o domínio de sinalização de CD3-zeta. Por exemplo, o domínio citoplásmico de CAR pode incluir mas não é limitado a módulos de sinalização CD3-zeta, 4-1BB e CD28 e combinações destes. Consequentemente, a invenção fornece as células T CAR e métodos para seu uso para a terapia adotiva.

[0057] Em uma forma de realização, as células T CAR da invenção podem ser geradas pela introdução de um vetor lentiviral que compreende um CAR desejado, por exemplo um CAR que compreende domínio de transmembrana antiCD19 e junta CD8a e domínios de sinalização 4-1BB humano e CD3zeta, nas células. As células T CAR da invenção são capazes de replicar *in vivo* resultando na persistência de termo longo que pode levar ao controle de tumor adequado.

[0058] Em uma forma de realização a invenção diz respeito à administrar uma célula T geneticamente modificada que expressa um CAR para o tratamento de um indivíduo tendo câncer ou em risco de ter câncer usando a infusão de linfócito. Preferivelmente, a infusão de linfócito autólogo é usado no tratamento. Os PBMCs autólogos são coletados a partir do indivíduo em necessidade do tratamento e células T são ativados e expandidos usando os métodos descritos neste e conhecidos na técnica e então infundidos novamente no indivíduo.

[0059] Ainda, em uma outra forma de realização, a invenção diz respeito geralmente ao tratamento de um indivíduo em risco do desenvolvimento de CLL. A invenção também inclui o tratamento de uma

malignidade ou uma doença autoimune em que a quimioterapia e/ou imunoterapia em um indivíduo que resulta na imunossupressão significativa no indivíduo, portanto aumentando o risco do indivíduo de desenvolvimento CLL.

[0060] A invenção inclui o uso das células T que expressam um antiCD19 CAR incluindo o domínio tanto coestimulador CD3-zeta quanto 4-1BB (também referido como as células T CART19). As células T CART 19 da invenção pode sofrer expansão da célula T robusta *in vivo* e pode estabelecer as células memoriais específicas para CD19 que persistem nos níveis altos por uma quantidade estendida de tempo no sangue e medula óssea. Em alguns exemplos, as células T CART19 da invenção infundidas em um indivíduo podem eliminar as células de leucemia *in vivo* nos indivíduos com CLL resistentes à quimioterapia avançada. Entretanto, a invenção não é limitada as células T CART19. Antes, a invenção inclui qualquer porção de ligação de antígeno fundido com um ou mais domínios intracelulares selecionados a partir do grupo de um domínio de sinalização CD137 (4-1BB), um domínio de sinalização CD28, um domínio de sinal CD3zeta e qualquer combinação dos mesmos.

Definições

[0061] A não ser de outra maneira definida, todos os termos técnicos e científicos usados neste tem o mesmo significado como comumente entendido por uma pessoa habilitada na técnica em que a invenção pertence. Embora quaisquer um dos métodos e materiais similares ou equivalentes aqueles descritos nestes podem ser usados na prática pelo teste da presente invenção, os materiais e métodos preferidos são descritos neste. Na descrição e reivindicação da presente invenção, a terminologia seguinte será usada.

[0062] Também é entendido que a terminologia usada neste é para o propósito de descrever as formas de realização particulares apenas não é pretendido ser limitante.

[0063] Os artigos “um” e “uma” são usados neste por referir a um ou mais do que um (isto é, em pelo menos um) do objetivo gramatical do artigo. Por meio do exemplo, “um elemento” significa um elemento ou mais do que um elemento, “cerca de” como usado neste quando referindo a um valor medido tal como uma quantidade, uma duração temporal e outros, é significado para abranger as variações de 120 % ou 110 %, mais preferivelmente 15 %, ainda mais preferivelmente 11 % e ainda mais preferivelmente 10,1 % a partir do valor especificado, tais como variações são apropriadas para realizar os métodos divulgados.

[0064] A “ativação”, como usado neste se refere ao estado de uma célula T que foi suficientemente estimulada para induzir a proliferação celular detectável. A ativação também pode ser associada com a produção de citocina e funções eficazes detectáveis. O termo “células T ativadas” se refere a, entre outras coisas, células T que sofrem a divisão celular.

[0065] O termo “anticorpo,” como usado neste se refere a uma molécula imunoglobulina que especificamente se liga com um antígeno. Os anticorpos podem ser imunoglobulinas intactas derivadas de fontes naturais ou fontes recombinantes e podem ser porções imunorreativas de imunoglobulinas intactas. Os anticorpos são tipicamente tetrâmeros de moléculas de imunoglobulina. Os anticorpos na presente invenção podem existir em uma variedade de formas incluindo, por exemplo, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, Fv, Fab e F(ab)₂, bem como anticorpos de cadeia simples e anticorpos humanizados (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nova Iorque; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

[0066] O termo “fragmento de anticorpo” se refere a uma proporção de um anticorpo intacto e se refere às regiões variáveis de determinação

antigênica de um anticorpo intacto.

[0067] Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas não são limitados a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv, anticorpos lineares, anticorpos scFv e anticorpos multiespecíficos formados a partir dos fragmentos de anticorpo.

[0068] Uma “cadeia pesada de anticorpo,” como usado neste, se refere ao maior de dois tipos de cadeias de polipeptídeos presentes em todas as moléculas de anticorpo em suas conformações de ocorrência natural.

[0069] Uma “cadeia leve de anticorpo,” como usada neste, se refere ao menor de dois tipos de cadeias de polipeptídeos presentes em todas as moléculas de anticorpo em sua conformação de ocorrência natural, K e X. As cadeias leves se referem ao dois maiores isotipos de cadeia leve de anticorpo.

[0070] Pelo termo “anticorpo sintético” como usado neste, é significado um anticorpo que é gerado usando a tecnologia de DNA recombinante, tal como, por exemplo, um anticorpo expressado por um bacteriófago como descrito neste. O termo também deve ser construído significa que foi gerado pela síntese de uma molécula de DNA que codifica o anticorpo e que a molécula de DNA expressa uma proteína de anticorpo, ou uma sequência do aminoácido especificando o anticorpo, em que o DNA ou sequência de aminoácido foi obtida usando o DNA sintético ou tecnologia da sequência de aminoácido que é disponível e bem conhecida na técnica.

[0071] O termo “antígeno” ou “Ag” como usado neste é definido como uma molécula que provoca uma resposta imune. Esta resposta imune pode envolver a produção de anticorpo, ou a ativação das células competentes imunologicamente específicas, ou ambos. A pessoa habilitada entenderá que qualquer macromolécula, incluindo as proteínas ou peptídeos virtualmente, podem servir como um antígeno. Além disso, os antígenos podem ser derivados a partir do DNA recombinante ou genômico. Uma pessoa habilitada na técnica entenderá que qualquer DNA, que compreende as sequências de nucleotídeos ou uma sequência de nucleotídeo parcial que codifica uma

proteína que elicia uma resposta imune portanto codificando um “antígeno” como aquele termo é usado neste. Além disso, uma pessoa habilitada na técnica entenderá que um antígeno necessita ser codificado unicamente por uma sequência de nucleotídeo de comprimento total de um gene. É prontamente aparente que a presente invenção inclui, mas não é limitado ao uso das sequências de nucleotídeos parciais maiores do que um gene e que estas sequências de nucleotídeos são dispostas em várias combinações para eliciar a resposta imune desejada. Além disso, uma pessoa habilitada entenderá que um antígeno necessita ser codificado por um “gene” sob qualquer condição. É prontamente aparente que um antígeno pode ser gerado ou sintetizado ou pode ser derivado de uma amostra biológica. Uma tal amostra biológica pode incluir, mas não limitado a uma amostra de tecido, uma amostra de tumor, uma célula ou um fluido biológico.

[0072] O termo “efeito antitumor” como usado neste, se refere a um efeito biológico que pode ser manifestado por uma diminuição no volume do tumor, uma diminuição no número das células tumorais, uma diminuição no número de metastase, um aumento na expectativa de vida, ou melhoramento de vários sintomas fisiológicos associados com a condição cancerosa. Um “efeito antitumor” também pode ser manifestado pela capacidade dos peptídeos, polinucleotídeos, células e anticorpos da invenção na prevenção da ocorrência do tumor no primeiro lugar.

[0073] O termo “autoantígeno” significa, de acordo com a presente invenção, qualquer antígeno próprio que é por engano reconhecido pelo sistema imune como sendo estranho. Os autoantígenos compreendem, mas não são limitados a, proteínas celulares, fosfoproteínas, proteínas da superfície celular, lipídeos celulares, ácidos nucleicos, glicoproteínas, incluindo receptores da superfície celular.

[0074] O termo “doença autoimune” como usado neste é definido como um distúrbio tem os resultados a partir da resposta autoimune. Uma

doença autoimune é o resultado de uma resposta inapropriada e excessiva em um antígeno próprio. Exemplos das doenças autoimunes incluem mas não são limitados a, doença de Addison, alopecia areata, espondilite anquilosante, hepatite autoimune, parotite autoimune, doença de Crohn, diabetes (Tipo 1), epidermólise bolhosa distrófica, epididimite, glomerulonefrite, doença de Graves, síndrome de Guillain-Barré, doença de Hashimoto, anemia hemolítica, eritematoso de lúpus sistêmico, esclerose múltipla, miastenia grave, pênfigo vulgaris, psoríase, febre reumática, artrite reumatóide, sarcoidose, escleroderma, síndrome de Sjögren, espondiloartropatia, tiroidite, vasculite, vitiligo, mixedema, anemia nociva, colite ulcerativa, entre outros.

[0075] Como usado neste, o termo “autólogo” é significado referir em qualquer material derivado do mesmo indivíduo em que este é por último a ser reintroduzido no indivíduo.

[0076] “Alogeneico” se refere a um enxerto derivado a partir do animal diferente das mesmas espécies.

[0077] “Xenogeneico” se refere a um enxerto derivado a partir de um animal das espécies diferentes.

[0078] O termo “câncer” como usado neste é definido como doença caracterizada pelo desenvolvimento pelo desenvolvimento é definida como a doença caracterizada pelo desenvolvimento rápido e não controlado das células aberrantes. As células de câncer podem expandir localmente ou através da corrente sanguínea ou sistema linfático em outras partes do corpo. Exemplos de vários cânceres incluem mas não são limitados a, câncer de mama, câncer de próstata, câncer ovariano, câncer cervical, câncer de pele, câncer pancreático, câncer colorretal, câncer renal, câncer de fígado, câncer cerebral, linfoma, leucemia, câncer pulmonar e outros.

[0079] O “ligante coestimulador,” como o termo é usado neste, inclui uma molécula em uma célula que apresente o antígeno (por exemplo, um aAPC, célula dendrítica, célula B e outros) que especificamente se ligam a

uma molécula coestimuladora de cognato em uma célula T, portanto fornecendo um sinal que, além disso ao sinal primário fornecido por, por exemplo, ligação de um complexo TCR/CD3 com uma molécula MHC carregada com peptídeo, media uma resposta de célula T, incluindo, mas não limitado a, proliferação, ativação, diferenciação e outros. Um ligante coestimulador pode incluir, mas não limitado a, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligante coestimulador indutível (ICOS-L), molécula de adesão intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, linfotóxina beta receptor, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, um agonista ou anticorpo que se liga ao receptor de ligante Toll e um ligante que se liga especificamente com B7-H3. Um ligante coestimulador também abrange, *inter alia*, um anticorpo que especificamente se liga com uma molécula coestimuladora presente em uma célula T, tal como, mas não limitado a, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 associado com a função de linfócito (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 e um ligante que se liga especificamente com CD83.

[0080] A “molécula coestimuladora” se refere ao associado de ligação de cognato na célula T que se liga especificamente com um ligante coestimulador, portanto mediando uma resposta coestimuladora pela célula T, tal como, mas não limitado a, proliferação. A molécula coestimuladora inclui, mas não são limitados a uma molécula de classe I MHC, BTLA e um Receptor de ligante Toll.

[0081] Um “sinal coestimulador”, como usado neste, se refere a um sinal, no qual em combinação com um sinal primário, tal como ligação TCR/CD3, leva a uma proliferação de célula T e/ou superregulação ou sub-regulação das moléculas chaves.

[0082] Uma “doença” é um estado da saúde de um animal em que o animal não pode manter a homeostase e em que se a doença não é melhorada então a saúde dos animais continua deteriorar. Em contraste, um “distúrbio” em

um animal é um estado de saúde em que o animal é capaz de manter a homeostase, mas em que o estado de saúde dos animais é menos favorável do que este deve ser na ausência do distúrbio. Deixado não tratado, um distúrbio não necessariamente causa uma diminuição adicional no estado de saúde dos animais.

[0083] Uma “quantidade eficaz” como usado neste, significa uma quantidade que fornece um benefício terapêutico ou profilático.

[0084] “Codificando” se refere à propriedade inerente das sequências específicas de nucleotídeos em um polinucleotídeo, tal como um gene, um cDNA, ou um mRNA, para servir como modelo para a síntese de outros polímeros e macromoléculas nos processos biológicos tendo uma sequência definida dos nucleotídeos (isto é, rRNA, tRNA e mRNA) ou uma sequência definida de aminoácidos e as propriedades biológicas resultando destes. Deste modo, um gene que codifica uma proteína se a transcrição e tradução de mRNA corresponde aquele gene produz a proteína em uma célula ou outro sistema biológico. Tanto o filamento codificado, a sequência de nucleotídeo de que é idêntica à sequência de mRNA e é usualmente fornecida na listagem das sequências e o filamento não codificado, usado como o modelo para a transcrição de um gene ou cDNA, pode ser referido como codificado pela proteína ou outro produto daquele gene ou cDNA.

[0085] Como usado neste “endógeno” se refere a qualquer material ou produzido dentro de um organismo, célula, tecido ou sistema.

[0086] Como usado neste, o termo “exógeno” se refere a qualquer material introduzido de ou produzido fora de um organismo, célula, tecido ou sistema.

[0087] O termo “expressão” como usado neste é definido como a transcrição e/ou tradução de uma sequência de nucleotídeo particular conduzida por seu promotor.

[0088] O “vetor de expressão” se refere a um vetor que compreende um polinucleotídeo recombinante que compreende sequências de controle de

expressão operativamente ligado em uma sequência de nucleotídeo a ser expressada. Um vetor de expressão compreende elementos de atuação cis suficientes para a expressão; outros elementos para a expressão podem ser fornecidos pela célula hospedeira ou em um sistema de expressão in vitro. Os vetores de expressão incluem todos aqueles conhecidos na técnica, tal como cosmídeos, plasmídeos (por exemplo, nu ou contido nos lipossomos) e vírus (por exemplo, lentivírus, retrovírus, adenovírus e vírus associado ao adeno) que incorpora o polinucleotídeo recombinante.

[0089] O “homólogo” se refere à similaridade da sequência ou identidade de sequência entre os dois polipeptídeos ou entre as duas moléculas de ácido nucleico. Quando uma posição em ambos de duas sequências comparadas é ocupada pela mesma base ou subunidade de monômero de aminoácido, por exemplo, se uma posição em cada de duas moléculas de DNA é ocupada por adenina, então as moléculas são homólogas naquela posição. O percentual da homologia entre duas sequências é uma função do número de pontuação ou posição homóloga formada por duas sequências divididas pelo número de posições comparadas X 100. Por exemplo, se 6 de 10 das posições em duas sequências são pontuadas ou homólogas então as duas sequências são 60 % de homólogos. Por meio do exemplo, as sequências de DNA ATTGCC e TATGGC formam 50 % de homologia. Geralmente, uma comparação é feita quando as duas sequências são alinhadas para dar a homologia máxima.

[0090] O termo “imunoglobulina” ou “Ig,” como usado neste é definido como uma classe de proteínas, que funciona como anticorpos. Os anticorpos expressados pelas células B são algumas vezes referidas como a BCR (célula B receptora) ou receptor de antígeno. Os cinco membros incluídos nesta classe de proteínas são IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. IgA é o anticorpo primário que está presente em secreções corporais, tal como saliva, lágrimas, leite materno, secreções gastrointestinais e secreções mucosais dos

tratos respiratório e genitourinários. IgG é o anticorpo de circulação mais comum. IgM é a principal imunoglobulina produzida na resposta imune primária em mais indivíduos. Este é a imunoglobulina mais eficiente em aglutinação, fixação de complemento e outras respostas de anticorpo e é importante na defesa contra a bactéria e vírus. IgD é a imunoglobulina que não tem a função de anticorpo conhecido, mas pode servir como um receptor de antígeno. IgE é a imunoglobulina que media a hipersensibilidade imediata por causa a liberação de mediadores a partir de mastócitos e basófilos na exposição ao alérgeno.

[0091] Como usado neste, um “material instrucional” inclui uma publicação, um registro, um diagrama, ou qualquer outro meio de expressão que pode ser usado para comunicar a utilidade das composições e métodos da invenção. O material instrucional do kit da invenção pode, por exemplo, ser afixado em um recipiente que contém o ácido nucleico, peptídeo e/ou composição da invenção ou ser enviado junto com um recipiente que contém o ácido nucleico, peptídeo e/ou composição. Alternativamente, o material instrucional pode ser enviado separadamente a partir do recipiente com a intenção que o material instrucional e o composto a ser usado cooperativamente pelo recipiente.

[0092] “Isolado” significa alterado ou removido a partir do estado natural. Por exemplo, um ácido nucleico ou um peptídeo naturalmente presente em um animal vivo não é “isolado,” mas o mesmo ácido nucleico ou peptídeo parcialmente ou completamente separado a partir dos materiais coexistentes deste estado natural é “isolado”. Um ácido nucleico ou proteína isolados podem existir na forma substancialmente purificada, ou pode existir em um ambiente não natural tal como, por exemplo, uma célula hospedeira.

[0093] No contexto da presente invenção, as seguintes abreviações para as bases de ácido nucleico de ocorrência comum são usadas. “A” se refere a adenosina, “C” se refere a citosina, “G” se refere a guanosina, “T” se refere a

timidina e “U” se refere a uridina.

[0094] A não ser de outra maneira específica, a “sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de aminoácido” inclui todas as sequências de nucleotídeo que são degenerados as versões de cada outro e que codifica a mesma sequência de aminoácido. A sequência de nucleotídeo de frase que codifica uma proteína ou um RNA também pode incluir os íntrons à extensão que a sequência de nucleotídeo que codifica a proteína pode em algumas versões conter um íntron.

[0095] Um “lentivírus” como usado neste se refere a um gênero da família Retroviridae. Lentivírus são únicos entre os retrovírus sendo capazes de infectar as células de não divisão; estes podem liberar uma quantidade significativa da informação genética no DNA da célula hospedeira, de modo que estes são um dos método mais eficientes de um vetor de liberação do gene. HIV, SIV e FIV são todos os exemplos de lentivírus. Os vetores derivados do lentivírus oferecem significar os níveis significantes da transferência do gene in vivo.

[0096] Pelo termo “modulação,” como usado neste, é significado mediar um aumento ou diminuição detectável no nível de uma resposta em um indivíduo comparado com o nível de uma resposta no indivíduo na ausência de um tratamento ou composto e/ou comparado com o nível de uma resposta de outra maneira idêntica mas o indivíduo não tratado. O termo abrange a perturbação e/ou afeta uma resposta ou sinal natural portanto mediando uma resposta terapêutica benéfica em um indivíduo, preferivelmente, um humano.

[0097] A não ser de outra maneira especificada, a “sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de aminoácido” inclui todas as sequências de nucleotídeo que são degeneradas nas versões de cada outro e que codifica a mesma sequência de aminoácido. As sequências de nucleotídeo que codificam as proteínas e RNA podem incluir íntrons.

[0098] O termo “operavelmente ligado” se refere a ligação funcional entre uma sequência reguladora e a sequência de ácido nucleico heteróloga resultando na expressão do último. Por exemplo, uma primeira sequência de ácido nucleico é operavelmente ligada com uma segunda sequência de ácido nucleico quando a primeira sequência de ácido nucleico é colocada em uma conexão funcional com a segunda sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor é operavelmente ligado em uma sequência codificadora se o promotor afeta a transcrição ou expressão da sequência codificadora. Geralmente, as sequência de DNA operavelmente ligadas são contínuas e, onde necessário para unir as duas regiões codificadoras de proteína, na mesma estrutura de leitura.

[0099] O termo antígeno de tumor “superexpressado” ou “superexpressão” do antígeno de tumor é pretendido indicar um nível anormal da expressão do antígeno de tumor em uma célula a partir da área da doença semelhante a um tumor sólido dentro de um tecido específico ou órgão do indivíduo relativo ao nível da expressão em uma célula normal daquele tecido ou órgão. Os indivíduos tendo os tumores sólidos ou malignidade hematológica caracterizada pela superexpressão do antígeno de tumor pode ser determinado pelos ensaios padrões conhecidos na técnica.

[00100] A administração “parenteral” de uma composição imunogênica inclui, por exemplo, injeção subcutânea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), ou intrasternal, ou técnicas de infusão.

[00101] Os termos “paciente,” “indivíduo,” “cobaia,” e outros são usados permutavelmente neste e se refere em qualquer animal, ou células destes se in vitro ou in situ, responsável aos métodos descritos neste. Em certas formas de realização não limitantes, “paciente,” “indivíduo ou ” “cobaia,” é um humano.

[00102] O termo “polinucleotídeo” como usado neste é definido como uma cadeia dos nucleotídeos. Além disso, os ácidos nucleicos são polímeros de nucleotídeos. Deste modo, os ácidos nucleicos e polinucleotídeos como

usado neste são permutavelmente. Uma pessoa habilitada na técnica tem o conhecimento geral que os ácidos nucleicos são polinucleotídeos, que podem ser hidrolisados nos “nucleotídeos” monoméricos. Os nucleotídeos monoméricos podem ser hidrolisados nos nucleosídeos. Como usado neste polinucleotídeos incluem, mas não são limitados a, todas as sequências de ácido nucleico que são obtidas por qualquer meio disponível na técnica, incluindo, sem limitação, meios recombinantes, isto é, a clonagem das sequências de ácido nucleico a partir da biblioteca recombinante ou um genoma celular, usando a tecnologia de clonagem comum e PCRTM e outros e por meios sintéticos.

[00103] Como usado neste, os termos “peptídeo,” “polipeptídeo” e “proteína” são usados permutavelmente e se referem em um composto que compreende um dos resíduos de aminoácidos covalentemente ligados pelas ligações de peptídeo. A proteína ou peptídeo deve conter pelo menos dois aminoácidos e nenhuma limitação é colocada no número máximo de aminoácidos que podem compreender a sequência de proteína ou peptídeo. Os polipeptídeos incluem qualquer peptídeo ou proteína que compreendem dois ou mais aminoácidos unidos em cada outro pelas ligações de peptídeo.

[00104] Como usado neste, o termo se refere ambas cadeias curtas, que também comumente são referidas na técnica como peptídeos oligopeptídeos e oligômeros, por exemplo e as cadeias mais longas, que geralmente são referidos na técnica como proteínas, de que estes são muitos tipos. “Polipeptídeos” incluem, por exemplo, fragmentos biologicamente ativos, polipeptídeos substancialmente homólogos, oligopeptídeos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipeptídeos, polipeptídeos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusão, entre outros. Os polipeptídeos incluem peptídeos naturais, peptídeos recombinantes, peptídeos sintéticos, ou uma combinação dos mesmos.

[00105] O termo “promotor” como usado neste é definido como uma

sequência de DNA reconhecida pelo maquinário sintético da célula, ou maquinário sintético introduzido, requerida para iniciar a transcrição específica de uma polissequência de nucleotídeo.

[00106] Como usado neste, o termo “sequência promotora/reguladora” significa uma sequência de ácido nucleico que é requerida pela expressão de um produto do gene operavelmente ligado à sequência promotora/reguladora. Em alguns exemplos, esta sequência pode ser a sequência promotora de núcleo e em outros exemplos, esta sequência também pode incluir uma sequência intensificadora e outros elementos reguladores que são requeridos pela expressão do produto do gene. A sequência promotora/reguladora pode, por exemplo, ser um que expressão o produto do gene em uma maneira específica por tecido.

[00107] Um promotor “constitutivo” é uma sequência de nucleotídeo que, quando operavelmente ligado com um polinucleotídeo que codifica ou especifica um produto do gene, que causa o produto do gene a ser produzido em uma célula sob as condições mais ou todas fisiológicas da célula.

[00108] Um promotor “indutível” é uma sequência de nucleotídeo que, quando operavelmente ligada com um polinucleotídeo que codifica ou especifica um produto do gene, que causa o produto do gene a ser produzido em uma célula substancialmente apenas quando um indutor que corresponde ao promotor está presente na célula.

[00109] Um promotor “específico para tecido” é uma sequência de nucleotídeo que, quando operavelmente ligado com um polinucleotídeo que codifica ou especificado pelo gene, causa o produto do gene a ser produzido em uma célula substancialmente apenas se uma célula é uma célula do tipo de tecido correspondente ao promotor.

[00110] Pelo termo “especificamente se liga,” como usado neste com relação a um anticorpo, é significado um anticorpo que reconhece um antígeno específico, mas não reconhece substancialmente ou se liga a outras

moléculas em uma amostra. Por exemplo, um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno de uma espécie ou também pode se ligar aquele antígeno de uma ou mais espécies. Mas, tal reatividade de espécies cruzadas não altera por si só a classificação de um anticorpo como específico. Em outro exemplo, um anticorpo que se liga especificamente em um antígeno também pode se ligar às formas alélicas diferentes do antígeno. Entretanto, tal reatividade cruzada não altera por si só a classificação de um anticorpo como específico. Em alguns exemplos, os termos “ligação específica” ou “especificamente a ligação,” pode ser usado em referência à interação de um anticorpo, a proteína, ou um peptídeo com uma segunda espécie química, significa que a interação é dependente da presença de uma estrutura particular (por exemplo, um determinante ou epítopo antigênico) nas espécies químicas; por exemplo, um anticorpo reconhece e se liga em uma estrutura de proteína específica antes do que geralmente as proteínas. Se um anticorpo é específico para epítopo “A”, a presença de uma molécula contendo o epítopo A (ou livre, A não rotulado), em uma reação contendo “A” rotulado e o anticorpo, reduzirá a quantidade de ligação A rotulada ao anticorpo.

[00111] Pelo termo “estimulação,” é significado que uma resposta primária induzida pela ligação de uma molécula estimuladora (por exemplo, um complexo TCR/CD3) com seu ligante cognato portanto mediando um evento de transdução de sinal, tal como, mas não limitado a, transdução de sinal por intermédio do complexo TCR/CD3. A estimulação pode mediar a expressão alterada de certas moléculas, tal como sub-regulação de TGF- β e/ou reorganização das estruturas citoesqueléticas e outros.

[00112] A “molécula estimuladora,” como o termo é usada neste, significa uma molécula em uma célula T que se liga especificamente com um ligante estimulador cognato presente em uma célula que apresenta o antígeno.

[00113] Um “ligante estimulador,” como usado neste, significa um ligante que quando presente em uma célula que apresenta o antígeno (por

exemplo, um aAPC, uma célula dendrítica, uma célula B e outros) pode especificamente se ligar com um associado de ligação de cognato (referido neste como uma “molécula estimuladora”) em uma célula T, portanto mediando a uma resposta primária pela célula T, incluindo, mas não limitado a, ativação, iniciação de uma resposta imune, proliferação e outros. Os ligantes estimuladores são bem conhecidos na técnica e abrangem, *inter alia*, uma molécula de classe I MHC carregada com um peptídeo, um anticorpo antiCD3, um anticorpo antiCD28 superagonista e um anticorpo antiCD2 superagonista.

[00114] O termo “indivíduo” é pretendido incluir os organismos vivos em que uma resposta imune pode ser eliciado (por exemplo, mamíferos). Exemplos de indivíduos incluem humanos, cães, gatos, camundongos, ratos e espécies transgênicas destes.

[00115] Como usado neste, uma célula “substancialmente purificada” é uma célula que é essencialmente livre de outros tipos celulares. A célula substancialmente purificada também se refere a uma célula que foi separada de outros tipos celulares com o qual é normalmente associado em seu estado de ocorrência natural. Em alguns exemplos, uma população das células substancialmente purificadas se refere a uma população homogênea das células. Em outros exemplos, este termo se refere simplesmente à célula que foi separada a partir das célula com o qual estes são naturalmente associados em seu estado natural. Em algumas formas de realização, as células são cultivadas *in vitro*. Em outras formas de realização, as células não são cultivadas *in vitro*.

[00116] O termo “terapêutico” como usado neste significa um tratamento e/ou profilaxia. Um efeito terapêutico é obtido pela supressão, remissão, ou erradicação de um estado da doença.

[00117] O termo “quantidade terapeuticamente eficaz” se refere à quantidade do composto de objetivo que eliciará a resposta biológica ou

médica de um tecido, sistema, ou indivíduo que está sendo procurado pelo pesquisador, veterinário, médico ou outros clínicos. O termo “quantidade terapeuticamente eficaz” inclui que a quantidade de um composto que, quando administrado, se suficiente para evitar o desenvolvimento de, ou aliviar em alguma extensão, um ou mais dos sinais ou sintomas do distúrbio ou doença sendo tratada. A quantidade terapeuticamente eficaz variará dependendo do composto, a doença e sua gravidade e a idade, peso, etc., do indivíduo a ser tratado.

[00118] Para “tratar” uma doença como o termo é usado neste, significa reduzir a frequência ou gravidade de pelo menos um sinal ou sintoma da doença ou distúrbio experimentado pelo indivíduo.

[00119] O termo “transfectado” ou “transformado” ou “transduzido” como usado neste se refere a um processo pelo qual o ácido nucleico exógeno é transferido ou introduzido na célula hospedeira. Uma célula “transfectada” ou “transformada” ou “transduzida” é uma que foi transfectada, transformada ou transduzida com ácido nucleico exógeno. A célula inclui a célula primária e sua progênie.

[00120] A frase “sob o controle transcripcional” ou “operavelmente ligado” como usado neste significa que o promotor é na localização correta e orientação em relação ao um polinucleotídeo para controlar a iniciação de transcrição pela polimerase RNA e expressão do polinucleotídeo.

[00121] Um “vetor” é uma composição da substância que compreende um ácido nucleico isolado e que pode ser usado para liberar o ácido nucleico isolado ao interior de uma célula. Os vetores numerosos são conhecidos na técnica incluindo, mas não limitado a, polinucleotídeos lineares, polinucleotídeos associados com compostos iônicos ou anfifílicos, plasmídeos e vírus. Deste modo, o termo “vetor” inclui um plasmídeo de replicação autônomo ou um vírus. O termo também deve ser construído incluir os compostos não plasmídeos e não virais que facilitam a transferência do ácido

nucleico nas células, tal como, por exemplo, compostos de polilisina, lipossomos e outros. Exemplos de vetores virais incluem, mas não são limitados a, vetores adenovirais, vetores de vírus associados ao adeno, vetores retrovirais e outros.

[00122] Faixas: embora esta descoberta, vários aspectos da invenção podem ser apresentados em um formato de faixa. Deve ser entendido que a descrição no formato de faixa é meramente por conveniência e brevidade e não deve ser construído como uma limitação inflexível no escopo da invenção. Consequentemente, a descrição de uma faixa deve ser considerada ter especificamente divulgada todas as subfaixas possíveis bem como valor numéricos individuais dentro daquela faixa. Por exemplo, descrição de uma faixa tal como de 1 a 6 deve ser considerado ter especificamente divulgada nas subfaixas tal como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., bem como números individuais dentro daquela faixa, por exemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 e 6. Este aplica-se com relação da largura da faixa.

Descrição

[00123] A presente invenção fornece composições e métodos para o tratamento contra câncer entre as doenças. O câncer pode ser uma malignância hematológica, um tumor sólido, um tumor primário ou metástase. Preferivelmente, o câncer é uma malignidade hematológica e mais preferivelmente, o câncer é leucemia linfocítica crônica (CLL). Outras doenças tratáveis usando as composições e métodos da invenção incluem doenças autoimunes virais, bacterianas e infecções parasíticas, como as doenças autoimunes.

[00124] Em uma forma de realização, a invenção fornece uma célula (por exemplo, célula T) projetada para expressar um CAR em que a célula T CAR exibe uma propriedade antitumor. O CAR da invenção pode ser projetado para compreender um domínio extracelular tendo um domínio de ligação de antígeno fundido em um domínio de sinalização intracelular da

cadeia zeta do complexo receptor do antígeno da célula T (por exemplo, CD3 zeta). O CAR da invenção quando expressado em uma célula T é capaz de redirecionar o reconhecimento do antígeno com base na especificidade de ligação de antígeno. Um antígeno exemplar é CD19 por causa deste antígeno é expressado nas células B malignas. Entretanto, a invenção não é limitada ao alvejamento CD19. Antes, a invenção inclui qualquer porção de ligação de antígeno que quando ligado a seu antígeno de cognato, afeta uma célula tumoral de modo que a célula tumoral falha ao desenvolver, induzido à morte ou de outra maneira é afetada de modo que a carga tumoral em um indivíduo é diminuída ou eliminada. A porção de ligação de antígeno é preferivelmente fundida com um domínio intracelular de um ou mais de uma molécula coestimulador e uma cadeia zeta. Preferivelmente, a porção de ligação de antígeno é fundida com um ou mais domínios intracelulares selecionados do grupo de um domínio de sinalização CD137 (4-1 BB), um domínio de sinalização CD28, um domínio de sinal CD3zeta e qualquer combinação dos mesmos.

[00125] Em uma forma de realização, o CAR da invenção compreende um domínio de sinalização CD 137 (4-1BB). Este é porque a presente invenção é parcialmente com base na recuperação que as respostas de célula T medida por CAR ainda podem ser intensificadas com a adição dos domínios coestimuladores. Por exemplo, inclusão do domínio de sinalização CD137 (4-1BB) significativamente atividade antitumor aumentada e a persistência *in vivo* das células T CAR comparadas de outra maneira a célula T CAR idêntica não projetada para expressar CD137 (4-1BB).

Composição

[00126] A presente invenção fornece receptor antígeno quimérico (CAR) que compreende um domínio extracelular e intracelular. O domínio extracelular compreende um elemento de ligação específica para alvo de outra maneira referida como uma porção de ligação de antígeno. O domínio intracelular ou de outra maneira o domínio citoplásmico compreende, uma

região sinalizadora coestimuladora e uma porção de cadeia zeta. Uma região sinalizadora coestimuladora se refere a uma porção de CAR que compreende o domínio intracelular de uma molécula coestimuladora. As moléculas coestimuladoras são as moléculas de superfície outras do que os receptores de antígenos ou seus ligantes que são requeridos por uma resposta eficiente de linfócitos ao antígeno.

[00127] Entre o domínio extracelular e o domínio de transmembrana de CAR, ou entre o domínio citoplásmico e o domínio de transmembrana de CAR, pode ser incorporado em um domínio espaçador. Como usado neste, o termo “domínio espaçador” geralmente significa qualquer ago- ou polipeptídeo que funciona para ligar o domínio de transmembrana a, o domínio extracelular ou, o domínio citoplásmico na cadeia de polipeptídeo. Um domínio espaçador pode compreender até 300 aminoácidos, preferivelmente 10 a 100 aminoácidos e mais preferivelmente 25 a 50 aminoácidos.

Porção de ligação de antígeno

[00128] Em uma forma de realização, o CAR da invenção compreende um elemento de ligação específico também de outra maneira referido como uma porção de ligação de antígeno. A escolha da porção depende do tipo e do número de ligantes que definem a superfície de uma célula alvo. Por exemplo, o domínio de ligação de antígeno pode ser escolhido para reconhecer um ligante que atua como um marcador de superfície celular em células alvo associadas com um estado de doença particular. Desta maneira, os exemplos de marcadores de superfície celular que podem atuar como ligantes para o domínio de porção de antígeno no CAR da invenção incluem aqueles associados com infecções virais, bacterianas e parasíticas, doenças autoimune e células cancerígenas.

[00129] Em uma forma de realização, o CAR da invenção pode ser projetado para alvejar um antígeno tumoral de interesse por meio de projeto

de uma porção de ligação de antígeno desejada que se liga especificamente a um antígeno em uma célula tumoral. No contexto da presente invenção, “antígeno tumoral” ou “antígeno de distúrbio hiperproliferativo” ou “antígeno associado com um distúrbio”, se refere a antígenos que são comuns a distúrbios hiperproliferativos específicos, tais como câncer. Os antígenos debatidos aqui são meramente incluídos por meio de exemplo. A lista não é pretendida ser exclusiva e ainda os exemplos estarão facilmente evidentes para aqueles de habilidade na técnica.

[00130] Os antígenos tumorais são proteínas que são produzidas pelas células tumorais que eliciam uma resposta imune, particularmente respostas imunes mediadas por célula T. A seleção da porção de ligação de antígeno da invenção dependerá do tipo particular de câncer a ser tratado. Os antígenos tumorais são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, um antígeno associado com glioma, antígeno carcinoembriônico (CEA), gonadotropina coriônica P-humana, alfafetoproteína (AFP), AFP reativo de lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, transcriptase reversa de telomerase humana, RU1, RU2 (AS), carboxil esterase intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostase, antígeno específico para próstata (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prostateína, PSMA, Her2/neu, survivina e telomerase, antígeno-1 do tumor de carcinoma de próstata (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastase de neutrófilo, efrinB2, CD22, fator o desenvolvimento de insulina (IGF)-I, IGF-II, IGF-I receptor e mesotelina.

[00131] Em uma forma de realização, o antígeno tumoral compreende um ou mais epítomos cancerígenos antigênicos associados com um tumor maligno. Os tumores malignos expressam uma série de proteínas que podem servir como antígenos-alvo para um ataque do sistema imunológico. Estas moléculas incluem, mas não estão limitadas a antígenos específicos para tecidos, tais como MART-1, tirosinase e GP 100 no melanoma e fosfatase ácida prostática (PAP) e antígeno específico para próstata (PSA) no câncer de

próstata. Outras moléculas alvo pertencem ao grupo de moléculas relacionadas com a transformação, tais como o oncogene HER-2/Neu/ErbB-2. Ainda um outro grupo de antígenos alvo são antígenos oncofetais, tais como o antígeno carcinoembrionário (CEA). No linfoma de célula B, o idiótipo de imunoglobulina específica para tumor constitui um antígeno de imunoglobulina verdadeiramente específicos para antígeno que é única ao tumor individual. Antígenos de diferenciação de células B, tais como CD19, CD20 e CD37 são outros candidatos para antígenos alvo em linfoma de célula B. Alguns destes antígenos (CEA, HER-2, CD19, CD20, idiótipo) têm sido utilizados como alvos para a imunoterapia passiva com anticorpos monoclonais com sucesso limitado.

[00132] O tipo de antígeno tumoral que se refere à invenção também pode ser um antígeno específico para tumores (TSA), ou um antígeno associado ao tumor (TAA). Um TSA é único para as células tumorais e não ocorre em outras células no corpo. Um antígeno associado AT não é único para uma célula tumoral e em vez disso é também expressa numa célula normal em condições que não conseguem induzir um estado de tolerância imunológica ao antígeno. A expressão do antígeno sobre o tumor pode ocorrer sob condições que permitem que o sistema imune responda ao antígeno. TAAs podem ser antígenos que são expressados em células normais durante o desenvolvimento do sistema imunitário quando o feto é imaturo e incapaz de responder ou podem ser os antígenos que estão normalmente presentes em níveis extremamente baixos em células normais, mas que são expressadas em níveis muito elevados em células tumorais.

[00133] Os exemplos não limitantes de antígenos de TSA ou TAA incluem os seguintes: antígenos de diferenciação, tais como MART-1/MelanA (MART-1), gp100 (Pmel 17), tirosinase, TRP-1, TRP-2 e antígenos de linhagem múltipla específico para tumor tais como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embriônicos superexpressados,

tais como CEA; oncogenes superexpressados e genes supressores tumorais mutados, tais como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos tumorais únicos que resultam de translocações cromossômicas; tais como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR e antígenos virais, tais como os antígenos virais de Epstein Barr EBVA e os antígenos de papilomavírus humano (HPV) E6 e E7. Outros antígenos com base em proteína grandes incluem TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, pl80erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-Catenin, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-31CA 27.291BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD681P 1, CO029, FGF-5, G250, Ga7331EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-COI, RCASI, SDCCAG16, proteína associada com proteína/ciclofilina C de ligação de TA-901Mac-2, TAAL6, TAG72, TLP e TPS.

[00134] Em uma forma de realização preferida, a parte da porção de ligação de antígeno do CAR alveja um antígeno que inclui mas não se limita a CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, MYESO-1 TCR, MAGE A3 TCR e outros.

[00135] Dependendo do antígeno desejado a ser alvejado, o CAR da invenção pode ser manipulado para incluir a porção de ligação de antígeno adequado que é específica para o antígeno alvo desejado. Por exemplo, se o antígeno CD19 for desejado ser alvo, um anticorpo para CD19 pode ser utilizado como a porção de ligação do antígeno para incorporação do CAR da Invenção.

[00136] Em uma forma de realização, a parte da porção de ligação de antígeno do CAR da invenção alveja CD19. Preferivelmente, a parte da porção de ligação de antígeno no CAR da invenção é antiCD19 soFV, em que a sequência de ácido nucleico do scFV antiCD19 compreende a sequência apresentada na SEQ ID: 14. Em uma forma de realização, o antiCD19 scFV

compreende a sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 20. Em uma outra forma de realização, a porção antiCD19 scFV do CAR da invenção compreende a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 20.

Domínio de transmembrana

[00137] Com respeito ao domínio de transmembrana, o CAR pode ser projetado para compreender um domínio de transmembrana que está fundido ao domínio extracelular do CAR. Em uma forma de realização, o domínio de transmembrana que está naturalmente associado com um dos domínios no CAR é usado. Em alguns exemplos, o domínio de transmembrana pode ser selecionado ou modificado pela substituição de aminoácido para evitar a ligação de tais domínios aos domínios de transmembrana das mesmas proteínas ou diferentes para minimizar as interações com outros membros do complexo receptor.

[00138] O domínio de transmembrana pode ser derivado de uma fonte natural ou sintética. Quando a fonte é natural, o domínio pode ser derivado de qualquer proteína ligada por membrana ou ligada por membrana. As regiões transmembrana de uso particular nesta invenção podem ser derivados (isto é, compreendem pelo menos as regiões de transmembrana de) do receptor de cadeia alfa, beta ou zeta do receptor de célula T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CDS, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CDI34, CD137, CD154. Alternativamente, o domínio de transmembrana pode ser sintético, caso no qual este compreenderá resíduos predominantemente hidrofóbicos, tais como leucina e valina. Preferivelmente, um triplete de fenilalanina, triptofano e valina serão observados em cada extremidade de um domínio de membrana sintética. opcionalmente, um ligante de oligo ou polipeptídeo curto, preferivelmente entre 2 e 10 aminoácidos de comprimento podem formar a ligação entre o domínio de transmembrana e o domínio de sinalização citoplásmico do CAR. Um duplete de glicina-serina fornece um ligante particularmente adequado.

[00139] Preferivelmente, o domínio de transmembrana no CAR da invenção é o domínio de transmembrana de CD8. Em uma forma de realização, o domínio de transmembrana de CD8 compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 16. Em uma forma de realização, o domínio de transmembrana de CD8 compreende a sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 22. Em uma outra forma de realização, o domínio de transmembrana de CD8 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 22.

[00140] Em alguns exemplos, o domínio de transmembrana do CAR da invenção compreende o domínio de junta CD8a. Em uma forma de realização, o domínio de junta de CD8 compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 15. Em uma forma de realização, o domínio de junta de CD8 compreende a sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 21. Em uma outra forma de realização, o domínio de junta de CD8 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21.

Domínio citoplásmico

[00141] O domínio citoplásmico ou, de outra maneira, o domínio de sinalização intracelular do CAR da invenção é responsável pela ativação de, pelo menos, uma das funções atuadoras normais da célula imune na qual o CAR foi colocado dentro do termo “função atuadora” se refere a uma função especializada de uma célula. A função atuadora de uma célula T, por exemplo, pode ser a atividade citolítica ou atividade auxiliar, incluindo a secreção de citocinas. Desta maneira, o termo “domínio de sinalização intracelular” se refere à porção de uma proteína, que transduz o sinal da função atuadora e conduz uma célula para desempenhar uma função especializada. Entretanto, em geral, a totalidade do domínio de sinalização intracelular pode ser utilizado, em muitos casos, não é necessária a utilização de toda a cadeia. Na medida em que uma parte truncada do domínio de

sinalização intracelular é utilizado, tal porção truncada pode ser usada no lugar da cadeia intacta enquanto transduz o sinal de função atuadora. O domínio de sinalização intracelular termo é, esta maneira, pretendido incluir qualquer parte truncada do domínio de sinalização intracelular suficiente para a transdução do sinal de função atuadora.

[00142] Os exemplos preferidos de domínios de sinalização intracelulares para o uso no CAR da invenção incluem as sequências citoplásmicas do receptor de célula T (TCR) e co-receptores que atuam em comum acordo para iniciar a transdução de sinal seguindo o entrosamento de receptor de antígeno, bem como qualquer derivado ou variante destas sequências e qualquer sequência sintética que tem a mesma capacidade funcional.

[00143] É conhecido que aqueles sinais gerados através do TCR apenas são suficientes para a ativação total da célula T e que um sinal secundário ou coestimulador também é requerido. Desta maneira, a ativação de célula T pode ser o dito para ser ativado por duas classes distintas de sequência sinalizadora citoplásmica: aqueles que inicial a ativação primária dependente de antígeno através do TCR (sequências sinalizadoras citoplásmicas primárias) e aqueles que atuam de uma maneira independente de antígeno para fornecer um sinal secundário ou coestimulador (sequências sinalizadoras citoplásmicas secundárias).

[00144] As sequências sinalizadoras citoplásmicas primárias regulam a ativação primária do complexo de TCR de uma maneira estimuladora ou de uma maneira inibidora. As sequência sinalizadoras citoplásmicas primárias que atuam de uma maneira estimuladora pode conter de motivos sinalizadores que são conhecidos como motivos de ativação com base em tirosina imunoreceptora ou ITAMs.

[00145] Os exemplos de ITAM contendo sequências sinalizadoras citoplásmicas primárias que são de uso particular na invenção incluem aqueles derivados de TCR zeta, FcR gama, FcR beta, CD3 gama, CD3 delta,

CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b e CD66d. É particularmente preferido que a molécula sinalizadora citoplásmica no CAR da invenção compreende uma sequência sinalizadora citoplásmica derivada de CD3 zeta.

[00146] Em uma forma de realização preferida, o domínio citoplásmico do CAR pode ser projetado para compreender o domínio de sinalização de CD3-zeta por si só ou combinado com quaisquer outros domínios citoplásmicos desejados úteis no contexto do CAR da invenção. Por exemplo, o domínio citoplásmico do CAR pode compreender uma porção de cadeia CD3 zeta e uma região sinalizadora coestimuladora. A região sinalizadora coestimuladora se refere a uma porção do CAR que compreende o domínio intracelular de uma molécula coestimuladora. Uma molécula coestimuladora é uma outra molécula de superfície celular que não um receptor de antígeno ou seus ligantes que são requeridos para uma resposta eficiente de linfócitos a um antígeno. Os exemplos de tais moléculas incluem CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 associado com a função de linfócito (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 e um ligante que se liga especificamente com CD83 e outros. Desta maneira, enquanto a invenção primariamente exemplificada com 4-1BB como o elemento sinalizador coestimulador, outros elementos coestimuladores estão dentro do escopo da invenção.

[00147] As sequências sinalizadoras citoplásmicas dentro da porção de sinalização citoplásmica do CAR da invenção podem ser ligado um ao outro em uma ordem aleatória ou especificada. Opcionalmente, um ligante de oligo- ou polipeptídeo curto, preferivelmente, entre 2 e 10 aminoácidos de comprimento pode formar a ligação. Um duplete de glicina-serina fornece um ligante particularmente adequado.

[00148] Em uma forma de realização, o domínio citoplásmico é projetado para compreender o domínio de sinalização de CD3-zeta e o domínio de sinalização de CD28. Em uma outra forma de realização, o

domínio citoplásmico é projetado para compreender o domínio de sinalização de CD3-zeta e o domínio de sinalização de 4-1BB. Ainda, em uma outra forma de realização, o domínio citoplásmico é projetado para compreender o domínio de sinalização de CD3-zeta e o domínio de sinalização de CD28 e 4-1BB.

[00149] Em uma forma de realização, o domínio citoplásmico no CAR da invenção é projetado para compreender o domínio de sinalização de 4-1BB e o domínio de sinalização de CD3-zeta, em que o domínio de sinalização de 4-1BB compreende a sequência de ácido nucleico apresentado na SEQ ID NO: 17 e o domínio de sinalização de CD3-zeta compreende a sequência de ácido nucleico apresentado na SEQ ID NO: 18.

[00150] Em uma forma de realização, o domínio citoplásmico no CAR da invenção é projetado para compreender o domínio de sinalização de 4-1BB e o domínio de sinalização de CD3-zeta, em que o domínio de sinalização de 4-1BB compreende a sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 23 e o domínio de sinalização de CD3-zeta compreende a sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 24.

[00151] Em uma forma de realização, o domínio citoplásmico no CAR da invenção é projetado para compreender o domínio de sinalização de 4-1BB e o domínio de sinalização de CD3-zeta, em que o domínio de sinalização de 4-1BB compreende a sequência de aminoácido apresentado na SEQ ID NO: 23 e o domínio de sinalização de CD3-zeta compreende a sequência de aminoácido apresentado na SEQ ID NO: 24.

Vetores

[00152] A presente invenção abrange uma construção de DNA que compreende as sequências de um CAR, em que a sequência compreende a sequência de ácido nucleico de uma porção de ligação de antígeno operacionalmente ligado à sequência de ácido nucleico de um domínio

intracelular. Um domínio intracelular exemplar que pode ser usado no CAR da invenção inclui, mas não se limita ao, domínio intracelular de CD3-zeta, CD28, 4-1BB e outros. Em alguns exemplos, o CAR pode compreender qualquer combinação de CD3-zeta, CD28, 4-1BB e outros.

[00153] Em uma forma de realização, o CAR da invenção compreende domínio antiCD 19 scFv, junta CD8 humana de transmembrana e domínios de sinalização 4-1BB e CD3zeta humanos. Em uma forma de realização, o CAR da invenção compreende a sequência de ácido nucleico apresentado na SEQ ID NO: 8. Em uma outra forma de realização, o CAR da invenção compreende a sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 12. Em uma outra forma de realização, o CAR da invenção compreende a sequência de aminoácido apresentado na SEQ ID NO: 12.

[00154] A sequência de ácido nucleicos que codifica quanto às moléculas desejadas pode ser obtida utilizando-se métodos recombinantes, conhecidos na técnica, tais como, por exemplo, bibliotecas de triagem de células que expressam o gene, derivando o gene de um vetor conhecido para incluir o mesmo, ou isolando diretamente a partir de células e tecidos contendo os mesmos, usando técnicas padrão. Alternativamente, o gene de interesse pode ser produzido sinteticamente, em vez de clonado.

[00155] A presente invenção também fornece vetores em que um DNA da presente invenção é inserido. Os vetores derivados de retrovírus tais como o lentivírus são ferramentas adequadas para atingir a transferência genética de longo prazo visto que estes permitem a integração estável de longo prazo de um transgene e sua propagação em células filhas. Os vetores lentivirais têm a vantagem adicionada sobre os vetores derivados de oncoretrovírus, tais como vírus da leucemia marinha em que estes podem transduzir células não proliferadoras, tais como hepatócitos. Estes também têm a vantagem de imunogenicidade baixa.

[00156] Em breve resumo, a expressão de ácidos nucleicos naturais ou sintéticos que codificam CARs é tipicamente atingida pela ligação operacional de um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo CAR ou porções destes a um promotor e que incorpora a construção em um vetor de expressão. Os vetores podem ser adequados para a replicação e integração de eucariotas. Os vetores de clonagem típicos contêm terminadores de transcrição e de tradução, sequências iniciadoras e promotores úteis para a regulação da expressão da sequência de ácido nucleico desejada.

[00157] As construções de expressão da presente invenção também podem ser usadas para a imunização de ácido nucleico e terapia genética para a imunização de ácido nucleico e terapia genética, usando-se protocolos de liberação de gene padrão. Os métodos para a liberação genética são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Patente U. S. N° 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466, incorporado aqui por referência em suas totalidades. Em uma outra forma de realização, a invenção fornece um vetor de terapia genética.

[00158] O ácido nucleico pode ser clonado em diversos tipos de vetores. Por exemplo, o ácido nucleico pode ser clonado em um vetor que inclui, mas não se limita a um plasmídeo, um fagomida, um derivado de fago, um vírus animal e um cosmídeo. Os vetores de interesse particular incluem vetores de expressão, vetores de replicação, vetores de geração de sonda e vetores de sequenciamento.

[00159] Além disso, o vetor de expressão pode ser fornecido a uma célula na forma de um vetor viral. A tecnologia de vetor viral é bem conhecido na técnica e é descrito, por exemplo, em Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque) e em outros manuais de virologia e biologia molecular. Os vírus, que são vetores úteis, incluem, mas não são limitados a, retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados, herpes vírus e lentivírus. Em geral, um

vetor adequado contém uma origem de replicação em pelo menos um organismo, uma sequência promotora, locais de endonuclease de restrição conveniente e um ou mais marcadores selecionáveis, (por exemplo, WO 01/96584; WO 01/29058 e Patente U. S. N° 6.326.193).

[00160] Diversos sistemas com base viral foram desenvolvidos para a transferência de gene em células de mamífero. Por exemplo, os retrovírus fornecem uma plataforma conveniente para sistemas de liberação de gene. Um gene selecionado pode ser inserido em um vetor e embalado em partículas retrovirais usando-se técnicas conhecidas na técnica. O vírus recombinante pode ser então isolado e liberado às células do indivíduo *in vivo* ou *ex vivo*. Diversos sistemas retrovirais são conhecidos na técnica. Em algumas formas de realização, os vetores adenovirais são usados. Diversos vetores de adenovírus são conhecidos na técnica. Em uma forma de realização, os vetores lentivirais são usados.

[00161] Os elementos promotores adicionais, por exemplo, intensificadores, regulam a frequência de iniciação de transcrição. Tipicamente, estes estão localizados na região a montante de 30 a 110 bp no local de início, embora diversos promotores sejam recentemente mostrados conter elementos funcionais a jusante do local de início também. O espaçamento entre os elementos promotores é frequentemente flexível, de modo que a função promotora é preservada quando os elementos são invertidos ou movidos com relação a um outro, no promotor de timidina cinase (tk), o espaçamento entre os elementos promotores pode ser aumentado a 50 bp a parte antes da atividade começar a diminuir. Dependendo do promotor, parece que os elementos individuais podem funcionar de maneira comparativa ou independente para a ativação da transcrição.

[00162] Um exemplo de um promotor adequado é a sequência promotora de citomegalovírus precoce intermediária (CMV). Esta sequência promotora é uma sequência promotora constitutiva forte capaz de conduzir

níveis altos de expressão de qualquer sequência de polinucleotídeo operacionalmente ligada a este. Um outro exemplo de um promotor adequado é o Fator de Crescimento de Alongamento-1 α (EF-1 α). Entretanto, outras sequências promotoras constitutivas também podem ser usadas, que inclui, , mas não se limita ao, promotor precoce de vírus símio 40 (SV40), vírus tumoral mamário de camundongo (MMTV), promotor de repetição de terminal longo (LTR) de vírus da imunodeficiência humana (HIV), promotor MoMuLV, um promotor de vírus da leucemia aviária, um promotor precoce imediato do vírus de Epstein-Barr, um promotor do vírus do sarcoma de Rous, bem como promotores genéticos humanos, tais como, mas não limitado ao promotor de actina, o promotor de miosina, o promotor de hemoglobina e o promotor de creatina cinase. Além disso, a invenção não deve ser limitada ao uso de promotores constitutivos. Os promotores indutíveis também são considerados como parte da invenção. O uso de um promotor indutível fornece uma mudança molecular capaz de ligar a expressão da sequência de polinucleotídeo que está operacionalmente ligada quanto tal expressão é desejada ou desligamento da expressão quando a expressão não é desejada. Os exemplos de promotores indutíveis incluem, mas não se limitam a um promotor de metalotionina, um promotor de glicocorticóide, um promotor de progesterona e um promotor de tetraciclina.

[00163] A fim de estimar a expressão de um polipeptídeo de CAR ou porções destes, o vetor de expressão a ser introduzido em uma célula também pode conter um gene marcador selecionável ou um gene repórter ou ambos para facilitar a identificação de células de expressão a partir de uma população de células pensadas serem transfectadas ou infectadas através de vetores virais. Em outros aspectos, o marcador selecionável pode ser carregado em uma parte separada do DNA e usado em um procedimento de cotransfecção. Tanto marcadores selecionáveis quanto genes repórteres podem ser flanqueados com sequências reguladoras para permitir a expressão

nas células hospedeiras. Os marcadores selecionáveis úteis incluem, por exemplo, genes de resistência a antibiótico, tais como neo e outros.

[00164] Os genes repórteres são usados para identificar células potencialmente transfectadas e para a avaliação da funcionalidade de sequências reguladoras. Em geral, um gene repórter é um gene que não está presente em ou expressado pelo organismo ou tecido receptor e que codifica um polipeptídeo cuja expressão é manifestada por alguma propriedade facilmente detectável, por exemplo, atividade enzimática. A expressão do gene repórter é estimada em um período adequado após o DNA ser introduzido nas células receptoras. Os genes repórteres adequados podem incluir genes que codificam luciferase, beta-galactosidase, cloranfenicol acetil transferase, fosfatase alcalina secretada ou o gene da proteína de fluorescente verde (por exemplo, Ui-Tel et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Os sistemas de expressão adequados são bem conhecidos e podem ser preparados usando-se técnicas conhecidas ou obtidos comercialmente. Em geral, a construção com a região flanqueadora 5' mínima que apresenta o nível mais alto da expressão do gene repórter é identificado como o promotor. Tais regiões de promotor Tais regiões promotoras podem ser ligadas a um gene repórter e usado para avaliar agentes quanto à estabilidade para modular a transcrição conduzida por promotor.

[00165] Os métodos de introduzir e expressar os genes em uma célula são conhecidos na técnica. No contexto de um vetor de expressão, o vetor pode ser facilmente introduzido em uma célula hospedeira, por exemplo, célula de mamífero, bacteriana, levedura ou inseto por qualquer método na técnica. Por exemplo, o vetor de expressão pode ser transferido em uma célula hospedeira por meio físicos, químicos ou biológicos.

[00166] Os métodos físicos para introduzir um polinucleotídeo em uma célula hospedeira incluem a precipitação de fosfato de cálcio, lipofecção, bombardeio de partícula, microinjeção, eletroporação e outros. Os métodos

para a produção de células que compreendem vetores e/ou ácidos nucleicos exógenos são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque). Um método preferido para a introdução de um polinucleotídeo em uma célula hospedeira é a transfecção de fosfato de cálcio.

[00167] Os métodos biológicos para introduzir um polinucleotídeo de interesse em uma célula hospedeira incluem o uso de vetores de DNA e RNA. Os vetores virais e, especialmente, vetores retrovirais, tornaram-se o método mais amplamente usado para a inserção de genes em mamíferos, por exemplo, células humanas. Outros vetores virais podem ser derivados de lentivírus, poxvírus, vírus do herpes simples I, adenovírus e vírus adeno-associados e outros. Ver, por exemplo, Patente U. S. N° 5.350.674 e 5.585.362.

[00168] Os meios químicos para introduzir um polinucleotídeo em uma célula hospedeira incluem sistemas de dispersão coloidal, tais como complexos de macromolécula, nanocápsulas, microesferas, pérolas e sistemas com base em lipídeo incluindo emulsões de óleo em água, micelas, micelas mistas e lipossomas. Um sistema coloidal exemplar para o uso como um veículo de liberação *in vitro* e *in vivo* é uma lipossoma (por exemplo, uma vesícula de membrana artificial).

[00169] No caso onde um sistema de liberação não viral é utilizado, um veículo de liberação exemplar é uma lipossoma. O uso de formulações de lipídeo é considerado para a introdução dos ácidos nucleicos em uma célula hospedeira (*in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*). Em um outro aspecto, o ácido nucleico pode estar associado com um lipídeo. O ácido nucleico associado com um lipídeo pode estar encapsulado no interior aquoso de uma lipossoma, intercalado dentro da bicamada de lipídeo de uma lipossoma, ligado a uma lipossoma por intermédio de uma molécula de ligação que está associado tanto com a lipossoma quanto com o oligonucleotídeo, peso em uma lipossoma, complexado com uma lipossoma, dispersado em uma solução

contendo um lipídeo, misto com um lipídeo, combinado com um lipídeo, contido como uma suspensão em um lipídeo, contido ou complexado com uma micela ou, de outra maneira, associado com um lipídeo. Composições associadas com lipídeo, lipídeo/DNA ou lipídeo/expressão não estão limitadas a qualquer estrutura particular na solução. Por exemplo, estes podem estar presentes em uma estrutura de bicamada, como micelas ou com uma estrutura, “colapsada”. Estas também podem ser simplesmente intercalados em uma solução, possivelmente formando agregados que não são uniformes em tamanho ou forma. Os lipídeos são substâncias graxas que podem ser de ocorrência natural ou lipídeos sintéticos. Por exemplo, os lipídeos incluem as gotículas graxas que ocorrem naturalmente no citoplasma, bem como a classe de compostos que contenham hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa e seus derivados, tais como ácidos graxos, álcoois, aminas, amino álcoois e aldeídos.

[00170] Os lipídeos adequados para o uso podem ser obtidos a partir de fontes comerciais. Por exemplo, dimiristil fosfatidilcolina (“DMPC”) podem ser obtidos da Sigma, St. Louis, MO; dicetil fosfato (“DCP”) podem ser obtidos da K & K Laboratories (Plainview, NY); colesterol (“Choi”) pode ser obtido da Calbiochem-Behring; dimiristil fosfatidilglicerol (“DMPG”) e outros lipídeos podem ser obtidos da Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). As soluções de carga de lipídeos em clorofórmio ou clorofórmio/metanol podem ser armazenados m torno de -20°C. O clorofórmio é usado apenas como o solvente visto que este é mais facilmente evaporado do que o metanol. “Lipossoma” é um termo genérico que abrange uma variedade de veículos de lipídeo simples e multilamelares formados pela geração de bicamadas de lipídeo incluídas ou agregados. As lipossomas podem ser caracterizadas como tendo estruturas vesiculares com uma membrana de bicamada de fosfolipídeo e um meio aquoso interno. As lipossomas multilamelares têm camadas de lipídeo múltiplas separadas pelo meio aquoso. Estes se formam de maneira espontânea quando os fosfolipídeos

são colocados em suspensão em um excesso de solução aquosa. Os componentes de lipídeo sofrem a autorredistribuição antes da formação de estruturas fechadas e prende a água e dissolve os solutos entre as bicamadas de lipídeo (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). Entretanto, as composições que podem ter estruturas diferentes na solução que não a estrutura vesicular normal também é abrangidas. Por exemplo, os lipídeos podem assumir uma estrutura micelar ou meramente existir como agregados não uniformes de moléculas de lipídeo. Também são considerados complexos de ácido lipofectaminonucleico.

[00171] De maneira indiferente do método usado para a introdução de ácidos nucleicos exógenos em uma célula hospedeira ou, de outra maneira, expor uma célula ao inibidor da presente invenção, a fim de conformar a presença da sequência de DNA recombinante na célula hospedeira, uma variedade de ensaios pode ser realizada. Tais ensaios incluem, por exemplo, ensaios “biológicos moleculares” conhecidos por aqueles habilitados na técnica, tal como Southern and Northern, RT-PCR e PCR; ensaios “bioquímicos”, tais como detectando a presença ou ausência de um peptídeo particular, por exemplo, por meios imunológicos (ELISAs e Western blots) ou por ensaios descritos aqui para a identificação dos agentes que estão dentro do escopo da invenção.

Fontes de células T

[00172] Antes da expansão e modificação genética das células T da invenção, uma fonte de células T é obtida a partir de um indivíduo. As células T podem ser obtidas a partir de diversas fontes, incluindo células mononucleares de sangue periférico, medula óssea, tecido de linfonodo, sangue do cordão, tecido do timo, tecido de um local de infecção, ascite, efusão pleural, tecido de baço e tumores. Em certas formas de realização da presente invenção, qualquer número de linhas celulares T disponíveis na técnica, podem ser usados. Em certas formas de realização da presente

invenção, as células T podem ser obtidas a partir de uma unidade de sangue coletado de um indivíduo que usa qualquer número de técnicas conhecidas ao técnico habilitado, tal como separação Ficoll™. Em uma forma de realização preferida, as células do sangue circulante de um indivíduo são obtidas por aférese. O produto de aférese contém tipicamente linfócitos incluindo células T, monócitos, granulócitos, células B, outras células sanguíneas brancas nucleadas, células sanguíneas vermelhas e plaquetas. Em uma forma de realização, as células coletadas por aférese podem ser lavadas para remover a fração de plasma e para colocar as células em um tampão ou meio apropriado para as etapas de processamento subsequentes. Em uma forma de realização da invenção, as células são lavadas com solução salina de tampão de fosfato (PBS). Em uma forma de realização alternativa, a solução de lavagem precisa de cálcio e pode precisar de magnésio ou pode precisar de muitos, senão de todos os cátions divalentes. Novamente, surpreendentemente, as etapas de ativação inicial na ausência de cálcio levaram à ativação magnificada. Como aqueles de habilidade comum na técnica devem estimar facilmente, a etapa de lavagem pode ser realizada pelos métodos conhecidos por aqueles habilitados na técnica, tal como pelo uso de uma centrífuga de “fluxo total” semi-automatizado (por exemplo, the Cobe 2991 cell processor, the Baxter CytoMate, or the Haemonetics Cell Saver 5) de acordo com as instruções do fabricante. Após a lavagem, as células podem ser recolocadas em suspensão em uma variedade de tampões biocompatíveis, tais como, por exemplo, PBS isento de Ca^{2+} , isento de Mg^{2+} , PlasmaLyte A ou outra solução salina com ou sem tampão. Alternativamente, os componentes indesejados da amostra de aférese podem ser removidos e as células diretamente recolocadas em suspensão em meio de cultura.

[00173] Em uma outra forma de realização, as células T são isoladas de linfócitos sanguíneos pela lise das células sanguíneas vermelhas e esgotando-se os monócitos, por exemplo, por centrifugação através de um gradiente

PERCOLL™ ou pela elutriação de centrífuga por contrafluxo. Uma subpopulação específica para células T, tais como células T CD3⁺, CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ e CD45RO⁺, ainda podem ser isolados por técnicas de seleção positivas ou negativas. Por exemplo, em uma forma de realização, as células T são isoladas pela incubação com pérolas conjugadas com antiCD3/antiCD28 (isto é, 3x28), tais como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, por um período de tempo suficiente para a seleção positiva das células T desejadas. Em uma forma de realização, o período de tempo está em torno de 30 minutos. Em uma forma de realização adicional, o período de tempo varia de 30 minutos a 36 horas ou mais longo e todos os valores inteiros entre estes. Em uma forma de realização adicional, o período de tempo é de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 horas. Ainda em uma outra forma de realização, o período de tempo é de 10 a 24 horas. Em uma forma de realização preferida, o período de tempo de incubação é de 24 horas. Para o isolamento de células T de indivíduos com leucemia, o uso de tempos de incubação mais longos, tais como 24 horas, pode aumentar o rendimento celular. Períodos de incubação mais longos podem ser usados para isolar s células T em qualquer situação onde existem poucas células T em comparação com outros tipos celulares, tal como em linfócitos de infiltração de tumor isolante (TILL) a partir do tecido tumoral ou de indivíduos imunocomprometidos. Além disso, o uso de tempos de incubação mais longos podem aumentar a eficiência de captura de células T CD8⁺. Desta maneira, diminuindo ou ampliando simplesmente o tempo, as células T são deixadas ligar às pérolas de CD3/CD28 e/ou pelo aumento ou diminuição da razão de pérolas para células T (como ainda descrito aqui), as subpopulações de células T podem ser preferivelmente selecionadas para ou contra o início de cultura ou, em outros pontos de tempo durante o processo. Adicionalmente, aumentando-se ou diminuindo-se a razão de anticorpos antiCD3 e/ou antiCD28 nas pérolas ou outra superfície, as subpopulações de células T podem ser

preferivelmente selecionadas para ou contra o início de cultura ou em outros pontos de tempo desejados. O técnico habilitado deve reconhecer que as séries múltiplas de seleção também podem ser usadas no contexto deste invenção. Em certas formas de realização, pode ser desejável realizar o procedimento de seleção e usar as células “não selecionadas” no processo de ativação e expansão. As células “não selecionadas” também podem ser submetidas para séries adicionais de seleção.

[00174] O enriquecimento de uma população de célula T pela seleção negativa pode ser realizado com uma combinação de anticorpos direcionados a marcadores de superfície únicos para as células negativamente selecionadas. Um método é classificação e/ou seleção celular por intermédio da imunoaderência magnética negativa ou citometria de fluxo que usa um coquetel de anticorpos monoclonais direcionados aos marcadores de superfície celular presentes nas células negativamente selecionadas. Por exemplo, para enriquecer as células CD4⁺ pela seleção negativa, um coquetel de anticorpo monoclonal inclui anticorpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR e CDB. Em certas formas de realização, pode ser desejável enriquecer ou selecionar positivamente quanto às células T reguladoras que tipicamente expressam CD4⁺, CD25⁺, CD62L⁺, GITR⁺ e FoxP3⁺, alternativamente, em certas formas de realização, as células reguladoras T são esgotadas quanto às pérolas conjugadas antiCD25 ou outros métodos similares de seleção.

[00175] Para o isolamento de uma população desejada de células pela seleção positiva ou negativa, a concentração de células e superfície (por exemplo, partículas, tais como pérolas) pode ser variada. Em certas formas de realização, pode ser desejável diminuir significativamente o volume em que as pérolas e as células são misturadas juntas (isto é, aumento da concentração de células), para garantir o contato máximo de células e pérolas. Por exemplo, em uma forma de realização, a concentração de 2 bilhões de células/ml é

usada. Em uma forma de realização, uma concentração de 1 bilhão de células/ml é usada. Em uma forma de realização adicional, mais do que 100 milhões de células/ml é usado. Em uma forma de realização adicional, uma concentração de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 milhões de células/ml é usada. Ainda, em uma outra forma de realização, uma concentração de células de 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 milhões de células/ml é usada. Em formas de realização adicionais, as concentrações de 125 ou 150 milhões de células/ml podem ser usadas. O uso de concentrações altas pode resultar em rendimento celular aumentado, ativação celular e expansão celular. Além disso, o uso de concentrações celulares altas permitem a captura mais eficiente de células que podem expressar fracamente os antígenos alvo de interesse, tais como células T negativas de CD28 ou de amostras onde existam muitas células tumorais presentes (isto é, sangue leucêmico, tecido tumoral, *etc.*). Tais populações celulares podem ter valor terapêutico e devem ser desejáveis para a obtenção. Por exemplo, usando-se a concentração de células permite-se a seleção mais eficiente de células T de CD8⁺ T que, normalmente, tem expressão de CD25 mais fraca.

[00176] Em uma forma de realização relacionada, pode ser desejável usar concentrações baixas de células. Diluindo-se significativamente a mistura de células T e de superfície (por exemplo, partículas, tais como pérolas), as interações entre as partículas e as células são minimizadas. Isto seleciona células que expressam quantidades altas de antígenos desejados estarem ligados às partículas. Por exemplo, as células T CD4⁺ expressam níveis mais altos de CD28 e são mais eficientemente capturadas do que as células T CD8⁺ em concentrações diluídas. Em uma forma de realização, a concentração de células usadas é de 5×10^6 /ml. Em outras formas de realização, a concentração suada pode ser de cerca de 1×10^5 /ml a 1×10^6 /ml e qualquer valor inteiro entre estes.

[00177] Em outras formas de realização, as células podem ser

incubadas em um rotador por vários comprimentos de tempo em velocidades variantes em 2 a 10°C ou em temperatura ambiente.

[00178] As células T para estímulo também podem ser congeladas após uma etapa de lavagem. Não desejando-se estar ligado por teoria, a etapa de congelamento e de descongelamento subsequentes fornecem um produto mais uniforme pela remoção de granulócitos e até certo ponto monócitos na população celular. Após a etapa de lavagem que remove plasma e plaquetas, as células podem ser colocadas em suspensão em uma solução congelante. Enquanto muitas soluções e parâmetros de congelamento são conhecidos na técnica e são úteis neste contexto, um método envolve usar PBS contendo 20 % de DMSO e 8 % de albumina de soro bovino ou meio de cultura contendo 10 % de Dextrano 40 e 5 % de Dextrose, 20 % de Albumina de soro bovino 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 bovino, e 7,5 % de DMSO ou outros meios de congelamento de célula contendo, por exemplo, Hespan e PlasmaLyte A, as células são então congeladas a -80°C em uma taxa de 1° por minuto e armazenado na fase de vapor de um tanque de armazenagem de nitrogênio líquido. Outros métodos de congelamento controlado podem ser usados, bem como congelamento não controlado imediatamente a -20°C ou em nitrogênio líquido.

[00179] Em certas formas de realização, as células criopreservadas são descongeladas e lavadas como descrito aqui deixadas repousar por uma hora em temperatura ambiente antes da ativação usando-se os métodos da presente invenção.

[00180] Também estão considerados dentro do contexto da invenção, a coleta de amostras de sangue ou produto de aférese de um indivíduo em um período de tempo anterior a quando as células expandidas como descrito como descrito aqui devem ser necessárias. Tais como, a fonte das células a serem expandidas podem ser coletadas em qualquer ponto de tempo

necessário e as células desejadas, tais como células T, isoladas e congeladas para o uso posterior na terapia de célula T para qualquer número de doenças ou condições que devem ser de benefício a partir da terapia de célula T, tais como aquelas descritas aqui.

[00181] Em uma forma de realização, uma amostra de sangue ou uma aférese é retirada de um indivíduo geralmente saudável. Em certas formas de realização, uma amostra de sangue ou uma aférese é retirada de um indivíduo geralmente saudável que está em risco de desenvolver uma doença, mas que ainda não desenvolveu uma doença e as células de interesse são isoladas e congeladas para o uso posterior. Em certas formas de realização, as células T podem ser expandidas, congeladas e usadas em um período posterior.

[00182] Em certas formas de realização, as amostras são coletadas a partir de um indivíduo logo após o diagnóstico de uma doença particular, como descrito aqui mas antes de quaisquer tratamento. Em uma forma de realização adicional, as células são isoladas de uma amostra de sangue ou aférese de um indivíduo antes de qualquer número de modalidades de tratamento relevantes, que incluem mas não se limitam ao tratamento com os agentes, tais como natalizumab, efalizumab, agentes antivirais, agentes de quimioterapia, radiação e imunossuppressores, tais como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato e FK506, anticorpos ou outros agentes imunoablativos, tais como CAMPATH, anticorpos antiCD3, citoxan, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteróides, FR901228 e irradiação. Estes medicamentos inibem a fosfatase calcineurina dependente de cálcio (ciclosporina e FK506) ou inibem a p70S6 que é importante para a sinalização induzida pelo fator de desenvolvimento (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). Em uma forma de realização adicional, as células são isoladas de um indivíduo e congeladas para o uso posterior em conjunção com (por exemplo, antes, de

maneira simultânea ou seguinte) transplante de medula óssea ou de célula tronco, terapia ablativa de célula T usando-se agentes de quimioterapia tais como, fludarabina, terapia de radiação de feixe externo (XRT), ciclofosfamida ou anticorpos, tais como OKT3 ou CAMPATH. Em uma outra forma de realização, as células são isoladas antes e podem ser congeladas para o uso posterior para o tratamento seguindo a terapia ablativa de célula B, tais como agentes que reagem com CD20, por exemplo, Rituxan.

[00183] Em uma forma de realização adicional da presente invenção, as células T são obtidas a partir de um indivíduo seguindo diretamente o tratamento. Sob este aspecto, foi observado que seguindo certos tratamentos contra o câncer, em particular tratamentos com medicamentos que danificam o sistema imune, logo após o tratamento durante o período quando os indivíduos normalmente devem estar se recuperando do tratamento, a qualidade de células T obtidas pode ser ótima ou melhorada quanto à sua capacidade de expandir *ex vivo*. Da mesma maneira, seguindo a manipulação *ex vivo* usando-se os métodos descritos aqui, estas células podem estar em um estado preferido para o enxerto intensificado e expansão *in vivo*. Desta maneira, está considerado dentro do contexto da presente invenção para a coleta das células sanguíneas, incluindo as células T, células dendríticas ou outras células da linhagem hematopoiética, durante esta fase de recuperação. Além disso, em certas formas de realização, a mobilização (por exemplo, mobilização com GM-CSF) e regimes de condicionamento podem ser usados para a criação de uma condição em um indivíduo em que a repopulação, recirculação, regeneração e/ou a expansão de tipos celulares particulares é favorecida, especialmente durante uma janela definida de tempo seguindo a terapia. Os tipos celulares ilustrativos incluem células T, células B, células dendríticas e outras células do sistema imune.

Ativação e expansão de células T

[00184] Se antes ou após a modificação genética das células T para

expressar um CAR desejável, as células T podem ser ativadas e expandidas geralmente usando os métodos como descrito, 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 do Pedido de Patente U.S. N°. 20060121005.

[00185] Geralmente, as células T da invenção são expandidas por contanto com uma superfície tendo ligado a este um agente que estimula um complexo CD3/TCR associado ao sinal e um ligante que estimula uma molécula coestimuladora na superfície das células T. Em particular, as populações de célula T podem ser estimuladas como descrito neste, tal como por contato com um anticorpo antiCD3, ou fragmento de ligação de antígeno deste, ou um anticorpo antiCD2 imobilizado em uma superfície, ou por contato com um ativador C de proteína cinase (por exemplo, briostatona) em conjunção com um inoforo de cálcio. Para a coestimulação de uma molécula complementar na superfície das células T, um ligante que se liga a molécula complementar é usado. Por exemplo, uma população das células T pode ser contactada com um anticorpo antiCD3 e um anticorpo antiCD28, sob condições apropriadas pela estimulação da proliferação das células T, para estimular a proliferação das células T CD4⁺ ou células T CDB⁺, um anticorpo antiCD3 e um anticorpo antiCD28. Exemplos de um anticorpo antiCD28 inclui 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacclone, Besancon, France) podem ser usados como podem outros métodos comumente conhecidos na técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30(8)3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

[00186] Em certas formas de realização, o sinal estimulador primário e o sinal coestimulador para a célula T pode ser fornecido pelos protocolos diferentes. Por exemplo, os agentes fornecem cada um dos sinais que podem ser na solução ou ligado a uma superfície. Quando ligado à superfície, os agentes podem ser ligados a mesma superfície (isto é, na formação de “cis”)

ou para separar as superfícies (isto é, na formação de “trans”). Alternativamente, um agente pode ser ligado a uma superfície e o outro agente na solução. Em uma forma de realização, o agente fornecendo o sinal coestimulador é ligado a uma superfície celular e o agente fornecendo o sinal de ativação primário está na solução ou ligado a uma superfície. Em certas formas de realização, ambos agentes podem estar na solução. Em outra forma de realização, os agentes podem ser na forma solúvel e então reticulado a uma superfície, tal como uma célula que expressa receptores Fc ou um anticorpo ou outro agente de ligação que ligará aos agentes. Sob este aspecto, ver, por exemplo, Publicação do Pedido de Patente U.S. N°. 20040101519 e 20060034810 para as células de apresentação de antígeno artificial (aAPCs) que são considerados para o uso na ativação e expansão das células T na presente invenção.

[00187] Em uma forma de realização, os dois agentes são imobilizados em pérolas, na mesma pérola, isto é, “cis,” ou para separar as pérolas, isto é, “trans”. Por meio do exemplo, o agente fornecendo o sinal de ativação primário é um anticorpo antiCD3 ou um fragmento de ligação de antígeno deste e o agente fornecendo o sinal coestimulador é um anticorpo antiCD28 ou fragmento de ligação de antígeno deste; e ambos os agentes são coimobilizados à mesma pérolas nas quantidades moleculares equivalentes. Em uma forma de realização, uma razão 1:1 de cada anticorpo ligado às pérolas para a expansão de célula CD4+ T e o desenvolvimento da célula T é usado. Em certos aspectos da presente invenção, uma razão de anticorpos anti CD3:CD28 ligados às pérolas é usado tal que um aumento na expansão da célula T é observada como comparado à expansão observada usando uma razão de 1:1. Em uma forma de realização particular um aumento de cerca de 1 a cerca de 3 vezes é observado como comparado à expansão observada usando uma razão de 1:1. Em uma forma de realização, a razão de anticorpo CD3:CD28 ligado às faixas das pérolas de 100:1 a 1:100 e todos os valores

inteiros aqui entre. Em um aspecto da presente invenção, mais anticorpo antiCD28 é ligado às partículas do que anticorpo antiCD3, isto é, a razão de CD3:CD28 é menos do que um. Em certas formas de realização da invenção, a razão de anticorpo anti CD28 ao anticorpo anti CD3 ligado às pérolas é maior do que 2:1. Em uma forma de realização particular, uma razão 1:100 CD3:CD28 de anticorpo ligado as pérolas é usado. Em outra forma de realização, a razão 1:75 CD3:CD28 de anticorpo ligado as pérolas é usado. Ainda em uma forma de realização, a razão 1:50 CD3:CD28 de anticorpo ligado as pérolas é usado. Em outra forma de realização, a razão 1:30 CD3:CD28 de anticorpo ligado as pérolas é usado. Em uma forma de realização preferida, a razão 1:10 CD3:CD28 de anticorpo ligado as pérolas é usado. Em outra forma de realização, a razão 1:3 CD3:CD28 de anticorpo ligado as pérolas é usado. Já em outra forma de realização, a razão 3:1 CD3:CD28 de anticorpo ligado as pérolas é usado.

[00188] As razões das partículas as células de 1:500 a 500:1 e qualquer valores inteiros entre podem ser usados para estimular as células T ou outras células alvos. Aquela pessoa com habilidade comum habilitada na técnica pode prontamente apreciar, a razão das partículas as células podem dependendo do tamanho de partícula relativo à célula alvo. Por exemplo, as pérolas de tamanhos menores devem apenas poucas células, enquanto as perólas maiores devem ligar muitas. Em certas formas de realização a razão das células as faixas de partículas de 1:100 a 100:1 e quaisquer valores inteiros entre e ainda as formas de realização a razão compreende 1:9 a 9:1 e quaisquer valores inteiros no meio, também pode ser usado para estimular as células T. A razão de antiCD3- e partículas ligadas ao antiCD28- as células T que resultam na estimulação da célula T pode variar como notado acima, entretanto certos 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 com uma razão preferida sendo pelo menos partículas 1:1 por

célula T. Em uma forma de realização, uma razão das partículas as células de 1:1 u menos é usado. Em uma forma de realização particular, uma partícula preferida: razão celular é 1:5. Ainda em formas de realização, a razão das partículas as células podem ser variadas dependendo do dia da estimulação. Por exemplo, em uma forma de realização, a razão das partículas as células é de 1:1 a 10:1 no primeiro dia e as partículas adicionais são adicionadas às células a cada dia ou ainda outro dia portanto por até 10 dias, nas razões finais de 1:1 a 1:10 (com base nas contagens celulares do dia da adição). Em uma forma de realização particular, a razão das partículas as células é 1:1 no primeiro dia da estimulação e ajustado a 1:5 na terceira e cinco dias da estimulação. Em outra forma de realização, as partículas são adicionadas em uma base diária ou outro dia em uma razão de 1:1 no primeiro dia e 1:5 na terceira e cinco dias da estimulação. Em outra forma de realização, a razão das partículas as células é 2:1 no primeiro dia da estimulação e ajustada a 1:10 no terceiro e cinco dias da estimulação. Em outra forma de realização, as partículas são adicionadas diariamente ou cada outra base diária em uma razão final de 1:1 no primeiro dia e 1:10 no terceiro e quinto dias da estimulação. Uma pessoa habilitada na técnica apreciará que uma variedade de outras razões pode ser adequada para o uso na presente invenção. Em particular, as razões variarão dependendo do tamanho de partícula e no tamanho celular e tipo.

[00189] Ainda em formas de realização da presente invenção, as células, tal como células T, são combinados com pérolas revestidas pelo agente, as pérolas e as células são subsequentemente separadas e então as células são cultivadas. Em uma forma de realização alternativa, antes da cultura, as pérolas revestidas pelo agente e as células não são separadas mas são cultivadas juntas. Ainda em uma forma de realização, as pérolas e células são primeiro concentradas pela aplicação e células são primeiro concentradas pela aplicação de uma força, tal como uma força magnética, resultando na

ligação aumentada dos marcadores celulares de superfície, portanto induzindo as estimulações celulares. Por meio do exemplo, as proteínas da superfície celular podem ser ligadas pelas pérolas paramagnéticas permitindo em que antiCD3 e antiCD28 são ligados (3 x 28 pérolas) para contactar as células T. Em uma forma de realização as células (por exemplo, 10^4 a 10^9 células T) e perólas paramagnéticas (por exemplo, DYNABEADSOO M-450 CD3/CD28 T em uma razão de 1:1) são combinadas em um tampão, preferivelmente PBS (sem os cátions bivalentes tal como, cálcio e magnésio). Novamente, aquela pessoa habilitada na técnica pode prontamente apreciar qualquer concentração celular pode ser usada. Por exemplo, a célula alvo pode ser muito raro na amostra e compreende apenas 0,01 % da amostra ou a amostra inteira (isto é, 100 %) pode compreender a célula alvo de interesse. Consequentemente, qualquer número celular está dentro do contexto da presente invenção. Em certas formas de realização, pode ser desejável diminuir significativamente o volume em que as partículas e células são misturadas juntos (isto é, aumenta a concentração das células), para garantir o contato máximo das células e partículas. Por exemplo, em uma forma de realização, uma concentração de cerca de 2 bilhões de células/ml é usado. Em outra forma de realização, maior do que 100 milhões de células/ml é usado. Ainda em uma forma de realização, a concentração das células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 milhões de células/ml é usado. Já em outra forma de realização, a concentração das células de 75, 80, 85, 90, 95, ou 100 milhões de células/ml é usado. Ainda em formas de realização, concentrações de 125 ou 150 milhões de células/ml podem ser usados. Usando as concentrações altas podem resultar no rendimento da célula aumentada, ativação celular e expansão celular. Ainda, uso das concentrações de célula altas permitem mais captura eficaz das células que podem fracamente expressar os antígenos alvos de interesse, tal como células T negativas CD28. Tais populações das células podem ter o valor terapêutico e deve ser desejado obter em certas formas de

realização. Por exemplo, usando a concentração alta das células permitem a seleção mais eficiente das células T CDS+ que normalmente tem a expressão CD28 mais fraca.

[00190] Em uma forma de realização da presente invenção, a mistura pode ser cultivada por diversas horas (cerca de 3 horas) a cerca de 14 dias ou qualquer valor inteiro a cada hora no meio. Em outra forma de realização, a mistura pode ser cultivada por 21 dias. Em uma forma de realização da invenção as pérolas e as células T são cultivadas juntas por cerca de oito dias. Em outra forma de realização, as pérolas e células T são cultivadas juntos por 2-3 dias. Diversos ciclos da estimulação também podem ser desejados tal que o tempo de cultura de células T podem ser 60 dias ou mais. as condições apropriadas para a cultura da célula T inclui um meio apropriado (por exemplo, meio essencial mínimo ou meio RPMI 1640 ou, X-vivo 5, (Lonza)) que pode conter os fatores necessários para a proliferação e viabilidade, incluindo soro (por exemplo, soro bovino fetal 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 desenvolvimento das células conhecidas á técnica habilitada. Outros aditivos para o desenvolvimento das células incluem, mas não limitado a, tensoativo, plasmanato e agentes de redução tal como N-acetil-cisteína e 2-mercaptoetanol. O meio pode incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 e X-Vivo 20, o otimizador, com os aminoácidos adicionais, piruvato de sódio e vitaminas, livre de soro ou suplementado com uma quantidade apropriada do soro (ou plasma) ou uma série definida de hormônios e/ou uma quantidade de citocinas suficientes para o desenvolvimento e expansão das células T. Os antibióticos, por exemplo, penicilina e estreptomicina, são incluídos apenas nas culturas experimentais, não em culturas das células que são infundidas em um indivíduo. As células alvos são mantidas sob condições necessárias para suportar o desenvolvimento, por exemplo, uma temperatura apropriada (por

exemplo, 37°C) e atmosfera (por exemplo, ar mais 5 % de CO₂).

[00191] As células T que foram expostas aos tempos de estimulação variados podem exibir as características diferentes. Por exemplo, sangue típico ou produtos celulares sanguíneos periféricos submetidos à aférese tem uma população de célula T auxiliar (T_H, CD4⁺) que é maior do que a população de célula T citotóxica ou supressora (T_c, CDS). A expansão *ex vivo* das células T pela estimulação dos receptores CD3 e CD28 produz uma população das células T que antes de cerca de dias 8-9 consiste predominantemente das células T_H, enquanto após cerca de dias 8-9, a população das células T compreendem uma população de aumento maior das células T_c. Consequentemente, dependendo do propósito do tratamento, a infusão de um indivíduo com a população da célula T que compreende as células T_H predominantemente pode ser vantajosa. Similarmente, se uma subsérie específica para antígeno das células T_c foram isolados este pode ser benéfico para expandir sua subsérie em um grau maior.

[00192] Ainda, em adição aos marcadores CD4 e CD8, outros marcadores fenotípicos variam significativamente, mas na parte ampla, reprodutibilidade durante o curso do processo de expansão celular. Deste modo, uma tal reprodutibilidade permite a capacidade de adaptar um produto de célula T ativado pelos propósitos específicos.

Aplicação terapêutica

[00193] A presente invenção abrange uma célula (por exemplo, célula T) submetida à transdução com um vetor lentiviral (LV). Por exemplo, o LV codifica um CAR que combina um domínio de reconhecimento de antígeno de um anticorpo específico com um domínio intracelular de CD3-zeta, CD28, 4-1BB, ou quaisquer combinações destes. Portanto, em alguns exemplos, a célula T submetida a transdução pode extrair uma respostas de células T mediada por CAR.

[00194] A invenção fornece o uso de um CAR para redirecionar a

especificidade de uma célula T primária em um antígeno de tumor. Deste modo, a presente invenção também fornece um método para estimular a resposta imune mediada pela célula T em uma população de célula alvo ou tecido e um mamífero que compreende a etapa de administração à célula T de mamífero que expressa um CAR, em que o CAR compreende uma porção de ligação que especificamente interage com um alvo pré-determinado, uma porção de cadeia zeta que compreende, por exemplo, o domínio intracelular de CD3zeta humano e uma região sinalizadora coestimuladora.

[00195] Em uma forma de realização, a presente invenção inclui um tipo de terapia celular onde as células T são geneticamente modificadas para expressar um CAR e a célula T CAR é infundida em um recipiente em necessidade deste. A célula infundida é capaz de matar as células tumorais no recipiente. As terapias de anticorpo diferentes, Células T CAR são capazes de replicar *in vivo* resultando na persistência de termo longo que pode levar ao controle de tumor sustentado.

[00196] Em uma forma de realização, as células T CAR da invenção podem sofrer na expansão da célula T *in vivo* robusta e pode persistir pela quantidade estendida de tempo. Em outra forma de realização, as células T CAR da invenção evoluem nas células T de memória específicas que podem ser reativadas para inibir qualquer formação ou desenvolvimento de tumor adicional. Por exemplo, foi inesperado que as células CART19 da invenção pode sofrer expansão na célula T *in vivo* robusta e persiste nos níveis altos para uma quantidade estendida de tempo no sangue e medula óssea e formam as células T de memória específica. Sem desejar ser a ligação por qualquer teoria particular, as células T CAR podem diferenciar *in vivo* em um estado de memória central na eliminação encontrada e subsequente das células alvos que expressam o antígeno substituto.

[00197] Sem desejar estar ligado por qualquer teoria particular, a resposta de imunidade antitumor eliciada pelas células T modificadas por

CAR podem ser uma resposta imune passiva ou ativa. Além disso, a resposta imune mediada por CAR pode ser parte de um método de imunoterapia adotado em que as células T modificadas por CAR induzem a resposta imune específica à porção de ligação de antígeno no CAR. Por exemplo, as células CART19 eliciam uma resposta imune específica contra as células que expressam CD19.

[00198] Enquanto os dados divulgados neste especificamente divulgam o vetor lentiviral que compreende antiCD19 scFv derivado de anticorpo monoclonal marina FMC63, domínio de transmembrana e junta CD8 α humana e domínios de sinalização 4-1BB e CD3zeta humanos, a invenção deve ser construída para incluir qualquer número de variações destes para cada um dos componentes da construção como descrito em outras partes destes. Isto é, a invenção inclui o uso de qualquer porção de ligação de antígeno no CAR para gerar uma resposta de célula T mediada por CAR específica para a porção de ligação de antígeno. Por exemplo, a porção de ligação do antígeno no CAR da invenção pode alvejar um antígeno de tumor para os propósitos de tratar o câncer.

[00199] Os cânceres que podem ser tratados incluem os tumores que não são vascularizados, ou já não substancialmente vascularizados, bem como tumores vascularizados. Os cânceres podem compreender os tumores não sólidos (tal como tumores hematológicos, por exemplo, leucemias e linfomas) ou podem compreender os tumores sólidos. Os tipos de cânceres a serem tratados com os CARs da invenção incluem, mas não limitado a, carcinoma, blastoma e sarcoma e certa leucemia ou malignidades linfóide, tumores benignos e malignos e malignidades por exemplo, sarcomas, carcinomas e melanomas. Os tumores adultos/cânceres e tumores pediátricos/cânceres também são incluídos.

[00200] Os cânceres hematológicos são cânceres do sangue ou medula óssea. Exemplos de cânceres hematológico (ou hematogenoso) inclui

leucemias, incluindo leucemias agudas (tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielogenosa aguda e mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica e eritroleucemia), leucemias crônicas (tal como leucemia mielocítica crônica (granulocítica), leucemia mielogenosa crônica e leucemia linfocítica crônica), policitemia vera, linfoma, Doença de Hodgkin, não linfoma de Hodgkin (formas de grau alto e indolente), mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, doença de cadeia pesada, síndrome mielodisplástica, leucemia celular capilar e mielodisplasia.

[00201] Os tumores sólidos são massas anormais do tecido que usualmente não contém os cistos ou áreas líquidas. Os tumores sólidos podem ser benignos ou malignos. Os tipos diferentes dos tumores sólidos são nomeados para o tipo das células que formam estes (tal como sarcomas, carcinomas e linfomas). Exemplos de tumores sólidos, tal como sarcomas e carcinomas, inclui fibrosarcoma, mixosarcoma, lipossarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma e outros sarcomas, sinovionia, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de cólon, malignidade linfóide, câncer pancreático, câncer de mama, cânceres de pulmão, câncer ovariano, câncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula basal, adenocarcinoma, carcinoma de glândula sudorípara, carcinoma de tireóide medular, carcinoma de tireóide papilar, carcinoma de glândula sebácea feocromocitomas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de célula renal, hepatoma, carcinoma do duto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, câncer cervical, tumor testicular, seminoma, carcinoma de bexiga, melanoma e tumores CNS (tal como a glioma (tal como glioma do tronco cerebral e gliomas misturados), glioblastoma (também conhecido como glioblastoma multiforme) astrocitoma, linfoma CNS, germinoma, meduloblastoma, craniofariogionia

Schwannoma,ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, neuroblastoma, retinoblastoma e metastases cerebral).

[00202] Em uma forma de realização, a porção de metade de ligação de antígeno de CAR da invenção é indicado tratar um câncer particular. Por exemplo, o CAR indicado ao CD19 alvo pode ser usado para tratar cânceres e distúrbios incluindo mas não limitado a pre-B ALL (indicação pediátrica), ALL adulto, linfoma da célula de manta, linfoma de célula B amplamente difuso, transplante de medula óssea pós-alogênica de recuperação e outros.

[00203] Em outra forma de realização, o CAR pode ser indicado CD22 alvo para tratar o linfoma de célula B amplamente difuso.

[00204] Em uma forma de realização, os cânceres e distúrbios incluem mas não limitado a pre-B ALL (indicação pediátrica), ALL adulto, linfoma celular de manta, linfoma de célula B amplamente difusa, transplante de medula óssea pós alogênico de recuperação e outros podem ser tratados usando uma combinação de CARs que alveja CD19, CD20, CD22 e ROR1.

[00205] Em uma forma de realização, o CAR pode ser indicado a mesotelina alvo para tratar mesotelioma, câncer pancreático, câncer ovariano e outros.

[00206] Em uma forma de realização, o CAR pode ser indicado ao CD33/IL3Ra alvo para tratar leucemia mielogenosa aguda e outros.

[00207] Em uma forma de realização, o CAR pode ser indicado ao c-Met alvo para tratar câncer de mama negativo triplo, câncer de pulmão de célula não pequena e outros.

[00208] Em uma forma de realização, o CAR pode ser indicado ao PSMA alvo para tratar câncer de próstata e outros.

[00209] Em uma forma de realização, o CAR pode ser indicado ao Glicolípídeo F77 alvo para tratar câncer de próstata e outros.

[00210] Em uma forma de realização, o CAR pode ser indicado ao

EGFRvIII alvo para tratar glioblastoma e outros.

[00211] Em uma forma de realização, o CAR pode ser indicado ao GD-2 alvo para tratar neuroblastoma, melanoma e outros.

[00212] Em uma forma de realização, o CAR pode ser indicado ao NY-ESO-1 TCR alvo para tratar mieloma, sarcoma, melanoma e outros.

[00213] Em uma forma de realização, o CAR pode ser indicado ao MACE A3 TCR alto para tratar mieloma, sarcoma, melanoma e outros.

[00214] Entretanto, a invenção não deve ser construída a ser limitada unicamente aos alvos de antígenos e doenças divulgadas neste. Preferivelmente, a invenção deve ser construída para incluir qualquer alvo antigênico que é associado com uma doença onde um CAR pode ser usado para tratar a doença.

[00215] As células T modificadas por CAR da invenção também podem servir como um tipo de vacina para a imunização *ex vivo* e/ou terapia *in vivo* em um mamífero. Preferivelmente, o mamífero é um humano.

[00216] Com relação à imunização *ex vivo*, de pelo menos um dos seguintes ocorre *in vitro* antes da administrar a célula em um mamífero: i) expansão das células, ii) introduzir um ácido nucleico que codifica um CAR às células e/ou iii) criopreservação das células.

[00217] Os procedimentos *ex vivo* são bem conhecidos na técnica e são debatidos mais totalmente abaixo. Brevemente, as células são isoladas a partir do mamífero (preferivelmente um humano) e geneticamente modificado (isto é, submetido a transdução ou transfectado *in vitro*) com um vetor que expressa um CAR divulgado neste. A célula modificada por CAR pode ser administrada a um mamífero receptor para fornecer um benefício terapêutico. O mamífero receptor pode ser um humano e a célula modificada por CAR pode ser autóloga com relação ao receptor. Alternativamente, as células podem ser alogênicas, singênicas ou xenogênicas com relação ao receptor.

[00218] O procedimento para a expansão *ex vivo* do tronco

hematopoiético e células progenitoras é descrito na Patente U.S. N°. 5.199.942, incorporado neste por referência, podem ser aplicadas às células da presente invenção. Outros métodos adequados são conhecidos na técnica, portanto a presente invenção não é limitado a qualquer método particular da expansão *ex vivo* das células. Brevemente, cultura *ex vivo* e expansão das células T compreende: (1) coletar tronco hematopoiético CD34+ e células progenitoras a partir do mamífero da coleta de sangue periférico ou explantes de medula óssea; e (2) expandir tais células *ex vivo*. Além disso aos fatores de desenvolvimento celular descritos na Patente U.S. N°. 5.199.942, outros fatores tal como flt3-L, IL-1, IL-3 e ligante c-kit, podem ser usados pela cultura e expansão das células.

[00219] Além do uso de uma vacina com base celular em termos da imunização *ex vivo*, a presente invenção também fornece composições e métodos para a imunização *in vivo* para eliciar uma resposta imune direcionada contra um antígeno em um indivíduo.

[00220] Geralmente, as células ativadas e expandidas como descritas aqui podem ser utilizadas no tratamento e prevenção das doenças que originam os indivíduos que são imunocomprometidos. Em particular, as células T modificadas por CAR da invenção são usadas no tratamento de CCL. Em certas formas de realização, as células da invenção são usadas no tratamento dos indivíduos em risco para o desenvolvimento CCL. Deste modo, a presente invenção fornece os métodos para o tratamento ou prevenção de CCL que compreende administrar em um indivíduo em necessidade deste, uma quantidade terapeuticamente eficaz das células T modificadas por CAR da invenção.

[00221] As células T modificadas por CAR da presente invenção podem ser administradas sozinha ou como uma composição farmacêutica em combinação com diluentes e/ou com outros componentes tais como IL-2 ou outras citocinas ou populações celulares. Brevemente, composição

farmacêutica da presente invenção pode compreender uma população de célula alvo como descrito neste, em combinação com um ou mais carregadores, diluentes ou excipientes farmacêuticamente ou fisiologicamente aceitável. Tais composições podem compreender tampões tal como solução salina tamponada neutra, solução salina tamponada por fosfato e outros; carboidratos tal como glicose, manose, sacarose ou dextranos, manitol; proteínas; polipeptídeos ou aminoácidos tal como glicina; antioxidantes; agentes de quelação tal como EDTA ou glutatona; adjuvantes (por exemplo, hidróxido de alumínio); e preservantes. As composições da presente invenção são preferivelmente formulados pela administração intravenosa.

[00222] As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas em uma maneira apropriada em uma doença a ser tratada (ou evitada). A quantidade e frequência da administração será determinada por tais fatores como a condição do indivíduo e o tipo e gravidade da doença dos indivíduos, embora as dosagens apropriadas podem ser determinadas pelos ensaios clínicos.

[00223] Quando “uma quantidade imunologicamente eficaz”, “uma quantidade eficaz antitumor”, “uma quantidade eficaz de inibição de tumor”, ou “quantidade terapêutica” é indicada, a quantidade precisa das composições da presente invenção a serem administradas podem ser determinadas por um médico com a consideração das diferenças individuais em idade, peso, tamanho do tumor, extensão da infecção ou metástase e condição do indivíduo (indivíduo). Pode ser geralmente estabelecido que a composição farmacêutica que compreende as células T descritas neste podem ser administradas em uma dosagem de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, preferivelmente 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluindo todos os valores inteiros dentro daquelas faixas. As composições da célula T também podem ser administradas de tempos múltiplos nestas dosagens. As células podem ser administradas pelo uso das técnicas de infusão que são comumente

conhecidas na imunoterapia (ver, por exemplo, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). A ótima dosagem e regime de tratamento para um indivíduo particular pode ser prontamente determinado por uma pessoa habilitada na técnica da medicina pelo monitoramento do indivíduo para os sinais da doença e ajuste do tratamento consequentemente.

[00224] Em certas formas de realização, este pode ser desejado administrar as células T ativadas em um indivíduo e então subsequentemente o sangue retirado novamente (ou tem uma aférese realizada), células T ativadas destes de acordo com a presente invenção e reintroduz o indivíduo com estas células T ativadas e expandidas. Este processo pode ser realizado em tempos múltiplos a cada poucas semanas. Em certas formas de realização, células T podem ser ativadas a partir do sangue retirado de 10 cc a 400 cc. Em certas formas de realização, células T são ativados do sangue retirado de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc, ou 100 cc. Não será ligado pela teoria, usando este protocolo de reintrodução do sangue retirado múltiplo/múltiplo pode servir para selecionar certas populações das células T.

[00225] A administração das composições do indivíduo pode ser realizada de qualquer maneira conveniente, incluindo pela inalação aerossol, injeção, ingestão, transfusão, implantação ou transplante. As composições descritas neste podem ser administradas a um indivíduo subcutaneamente, intradermicamente, intratumoralmente, intranodalmente, intramedular, intramuscularmente, pela injeção intravenosa (i.v.), ou intraperitoneamente. Em uma forma de realização, as composições da célula T da presente invenção são administradas a um indivíduo pela injeção intradérmica ou subcutânea. Em outra forma de realização, as composições da célula T da presente invenção são preferivelmente administradas pela injeção *i.v.*. As composições das células T podem ser injetadas diretamente em um tumor, linfonodo, ou local da infecção.

[00226] Em certas formas de realização da presente invenção, as

células ativadas e expandidas usando os métodos descritos neste, ou outros métodos conhecidos na técnica onde as células T são expandidas aos níveis terapêuticos, são administradas a um indivíduo em conjunção com (por exemplo, antes, simultaneamente ou seguindo) qualquer número das modalidades de tratamento relevantes, incluindo mas não limitado ao tratamento com os agentes tal como terapia antiviral, cidofovir e interleucina-2, Citarabina (também conhecida como ARA-C) ou tratamento natal izumab pelos indivíduos com MS ou tratamento de efalizumab para os indivíduos de psoríase ou outros tratamentos para os indivíduos de PML. Ainda em formas de realização, as células T da invenção podem ser usadas em combinação com quimioterapia, radiação, agentes imunossupressores, tal como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato e FK506, anticorpos, ou outros agentes imunoablativos tal como CAM PATH, anticorpos antiCD3 ou outras terapias de anticorpo, citoxina, fludaribina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteróides, FR901228, citocinas e irradiação. Estes medicamentos inibem o fosfatase de calcineurina dependente do cálcio (ciclosporina e FK506) ou inibir a cinase p70S6 que é importante para o fator de desenvolvimento induzido pela sinalização (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). Ainda em uma forma de realização, as composições celulares da presente invenção são administradas a um indivíduo em conjunção com (por exemplo, antes, simultaneamente ou seguindo) medula óssea transplante, terapia ablativa de célula T usando os agentes de quimioterapia tal como, fludarabina, terapia de radiação de suporte externo (XRT), ciclofosfamida, ou anticorpos tal como OKT3 ou CAMPATH. Em outra forma de realização, as composições celulares da presente invenção são administradas seguindo a Terapia ablativa de célula B tal como agentes que reagem com CD20, por exemplo, Rituxan. Por exemplo, em uma forma de realização, os indivíduos que sofrem o tratamento padrão com a quimioterapia

de dosagem alta seguida pelo transplante de célula tronco de sangue periférico. Em certas formas de realização, seguindo o transplante, indivíduos que recebem uma infusão das células imune expandidas da presente invenção. Em uma forma de realização adicional, as células expandidas são administradas antes ou seguindo a cirurgia.

[00227] A dosagem dos tratamentos acima a ser administrada a um indivíduo variará com a natureza precisa da condição sendo tratada e o recipiente do tratamento. A escala das dosagens para a administração humana pode ser realizada de acordo com as partículas aceitáveis na técnica. A dosagem por CAMPATH, por exemplo, será geralmente na faixa 1 a cerca de 100 mg por um indivíduo adulto, usualmente administrado diariamente por um período entre 1 e 30 dias. A dosagem diária preferida é 1 a 10 mg por dia embora em alguns exemplos as dosagens amplas de até 40 mg por dia podem ser usadas (descrito na Patente U.S. N°. 6.120.766).

EXEMPLOS EXPERIMENTAIS

[00228] A invenção ainda é descrita em detalhes por referência aos seguintes exemplos experimentais. Estes exemplos são fornecidos pelos propósitos da ilustração apenas e não são pretendidos ser limitantes a não ser de outra maneira especificada. Deste modo, a invenção, de maneira alguma, deve ser construída como limitante aos seguintes exemplos, mas em vez disso, deve ser construída para abranger qualquer e todas as variações que se tornam evidentes como um resultado da explicação fornecida neste.

[00229] Sem descrição adicional, é acreditado que um pessoa com habilidade comum na técnica pode, usando a descrição precedente e os seguintes exemplos ilustrativos, fazer e utilizar os compostos da presente invenção e praticam os métodos reivindicados. O seguinte trabalho dos exemplos, portanto, especificamente apontam as formas de realização preferidas da presente invenção e não serão construídos como limitantes em qualquer maneira do remanescente da descoberta.

Exemplo 1: As células T que expressam os receptores quiméricos estabelecem os efeitos antitumores potentes e memória em indivíduos com a leucemia avançada

[00230] Os linfócitos projetados para expressar os receptores de antígeno quimérico (CARs) tem a expansão *in vivo* mínima demonstrada e efeitos antitumores em ensaios clínicos prévios. Os resultados apresentados neste demonstram que as células T CAR contendo CD137 tem atividade clínica resistente não cruzada potente seguindo a infusão em três dos três indivíduos tratados com leucemia linfocítica crônica avançada (CLL). As células T projetadas expandidas mais do que mil vezes *in vivo*, traficado na medula óssea e continuado para expressar CARs funcionais nos níveis altos por pelo menos 6 meses. Na média, cada célula T CAR infundida erradicada pelo menos células 1000 CLL. A resposta imune específica CD19 foi demonstrada no sangue e medula óssea, acompanhado pela remissão completa em dois dos três indivíduos. Uma porção das células persiste como células T CAR+ de memória, indicando o potencial deste método não restrito WIC para o tratamento eficaz das malignidades de célula B.

[00231] Os materiais e métodos utilizados nestes experimentos não são descritos.

Materiais e métodos

Declaração de laboratório geral

[00232] A busca do processamento de amostra, congelamento e análises de laboratório foram realizadas em Translational and Correlative Studies Laboratory at the University of Pensilvânia que opera sob princípios de Good Laboratory Practice com SOP estabelecido e/ou protocolos pelo recibo de amostra, processamento, congelamento e análise. O desempenho do ensaio e dados diz respeito Assay performance a se adaptar com as diretrizes de MIATA (Janetzki et al., 2009, Immunity 31:527-528),

Projeto de protocolo

[00233] O ensaio clínico (NCT01029366) foi conduzido como diagramado na Figura 1. Os indivíduos com malignidade hematológica positiva CD19 com a doença persistente seguindo pelo menos dois regimes do tratamento anterior e como não foram desejável para o transplante de célula tronco alogeneico foram elegíveis pelo ensaio. Seguindo o restagiamento de tumor, células T sanguíneas periféricas pela fabricação CART19 foram coletadas pela aférese e os indivíduos dados em um curso simples de quimioterapia como especificado na Figura 10 durante a semana antes da infusão. As células CART19 foram administradas pela infusão intravenosa usando um regime de dosagem de divisão 3 dias (10 %, 30 % e 60 %) na dosagem indicada na Figura 10 e se disponível, uma segunda dosagem foi administrada no dia 10; apenas o indivíduo UPN 02 tem as células suficientes para uma segunda infusão. Os indivíduos foram avaliados pela toxicidade e resposta nos intervalos frequentes por pelo menos 6 meses. O protocolo foi aprovado por US Food and Drug Administration, the Recombinant DNA Advisory Committee and the Institutional Review Board of the University of Pensilvânia. No primeiro dia, a infusão foi apresentada no estudo do dia 0.

Indivíduos: resumo clínico

[00234] Os resumos clínicos são resumidos na Figura 10 e as histórias detalhadas são fornecidas em outras partes neste. O indivíduo UPN 01 foi primeiro diagnosticado com o estágio II da célula B CLL na idade 55. O indivíduo foi assintomático e observado por aproximadamente 1-1/2 anos até requerir a terapia pela linfocitose progressiva, trombocitopenia, adenopatia e esplenomegalia. No curso de tempo, o indivíduo recebem as linhas anteriores da terapia. A terapia mais recente foi 2 ciclos de pentostatina, ciclofosfamida e rituximab 2 meses antes da infusão da célula CART19 com uma resposta mínima. O indivíduo então recebeu um ciclo de bendamustina como quimioterapia de linfoanulação antes da infusão da célula CART-19.

[00235] O indivíduo UPN 02 foi primeiro diagnosticado com CLL na

idade 68 quando o indivíduo foi apresentado com a fadiga e leucocitose. O indivíduo foi relativamente estável por 4 anos quando o indivíduo desenvolve a leucocitose progressiva (195.000/141), anemia e trombocitopenia requerindo a terapia. A análise cariotípica mostrou que as células CLL tem anulação do cromossomo 17p. Por causa da doença progressiva, o indivíduo foi tratado com alemtuzumab com uma resposta parcial mas dentro de um e metade do indivíduo tem a doença progressiva. O indivíduo foi tratado novamente com alemtuzumab por 8 semanas com uma resposta parcial e um 1 ano de intervalo livre de progressão. O indivíduo então recebeu os 2 ciclos de bendamustina com rituximab sem uma resposta significativa (Figura 5A). O indivíduo recebeu a bendamustina de agente simples como quimioterapia de linfoanulação antes da infusão de célula CART-19.

[00236] O indivíduo com UPN 03 apresentado na idade 50 com o estágio assintomático I CLL e foi seguido com a observação por anos. O indivíduo tem a leucocitose progressiva (contagem de células sanguíneas brancas 92.0041) e adenopatia progressiva requerindo a terapia. O indivíduo recebeu 2 ciclos de rituximab com fludarabina que resultou na normalização de contagens sanguíneas e melhoramento significativo embora não a resolução completa na adenopatia. O indivíduo tem aproximadamente 3 anos de intervalo livre de progressão. O teste Cariotípico mostrou as células que contém a anulação do cromossomo 17p com FISH demonstrando uma anulação TP53 nas células 170 de 200. Nos próximos anos o indivíduo requerido 3 linhas diferentes da terapia (Figura 10) pela leucocitose progressiva e adenopatia, recebendo o último alemtuzumab com uma resposta parcial 6 meses antes da infusão da célula CART19. O indivíduo recebeu a pentostatina e ciclofosfamida como quimioterapia de linfoanulação antes da infusão da célula CART-19.

Produção do vetor

[00237] O transgene CD19-BB-z (GeMCRIS 0607-793) foi projetado e

construído como descrito (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17:1453-1464). O vetor lentiviral foi produzido de acordo com as práticas de fabricação boas correntes usando um método de produção de três plasmídeos em Lentigen Corporation como descrito (Zufferey et al., 1997, Nature biotechnol 15:871-875).

Preparação do produto da célula CART19

[00238] Os métodos da preparação da célula T usando as pérolas de poliestireno paramagnéticas revestidas com anticorpos monoclonais antiCD3 e antiCD28 foram descritas (Laport et al., 2003, Blood 102: 2004-2013). A transdução lentiviral foi realizada como descrito (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci U S A 103:17372-17377),

Métodos para o cálculo de carga tumoral

[00239] A carga CLL na linha de base foi estimada como mostrado na Figura 10. A quantidade das células CLL foram calculadas na medula óssea, sangue e tecidos linfóides secundários como descrito abaixo.

[00240] Medula óssea: nos adultos saudáveis, a medula óssea representa aproximadamente 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 nas amostras de crista ilíaca tem um aumento na porcentagem da medula (gordurosa) inativa com idade, aumentando de 20 % da medula total na idade 5 a cerca de 50 % por idade 35, quando este permanece estável até a idade 65 e então eleva-se a cerca de 67 % de medula inativa por idade 75 (Hartsock et al., 1965, Am J Clin Path 43:326-331). O valor de referência internacional pelo peso esquelético total da medula ativa (vermelha) e inativa (gordura) por machos na idade 35 é correntemente apresentada 1170 g e 2480 g, 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 (A report of a Task Group of Committee 2 of the International Commission on Radiological Protection, Oxford, 1995)). Os machos adultos entre as idades 35 a 65 tem a medula que representa 5,0 % de

total do peso corporal, compreende de 1,6 % como medula (vermelho) ativa e 3,4 % como medula (gordurosa) inativa (Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: The Skeleton in Annals of the TCRP, Vol. 25 (ed. Smith, H.) 58-68 (A report of a Task Group of Committee 2 of the International Commission on Radiological Protection, Oxford, 1995)). Com base na biopsia de medula óssea e espécimes aspirados, o peso das células CLL para os três indivíduos na linha de base foi calculado como mostrado na tabela 1. Estas estimativas da massa da medula CLL total foram então convertidos ao número de célula CLL total na medula usando 1 Kg de células 10^{12} e os números resultantes são mostrados na Figura 10. Estes cálculos são baseados em assumir que o CLL tem uma distribuição uniforme na medula óssea. Para o indivíduo UPN 01, os cálculos são mostrados por uma biopsia da medula que foi obtido antes da quimioterapia de bendamustina e por um aspirado obtido após a bendamustina e infusão de pre-CART19. Os números são menos precisos para o aspirado do dia 1 comparado à espécime da biopsia do dia 14 devido às limitações técnicas do aspirado do dia 1. O indivíduo UPN 02 tem uma espécime de biopsia do pré-tratamento simples que mostra a recuperação completa da medula por CLL. Este indivíduo tem um espécime não mudado no dia 30 pós CART19. A carga da medula para o indivíduo UPN 03 foi calculada com base em uma pós-quimioterapia e biopsia pre-CART19.

Tabela 1: Massa da medula

	peso da medula ativa (kg)	peso da medula inativa (kg)	medula total (kg)
machos 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 dias - 47 (95 % celular)	3,45	0,18	3,65
UPN 03 dias - 47 (60 % celular)	2,19	1,46	3,65
	peso de CLL (kg)		
UPN 01 dia - 14 (70% de CLL)	2,47		
UPN 01 dia - 1 (50% de CLL por coágulo)	1,73		
UPN 02 dias - 47	3,29		

	peso da medula ativa (kg)	peso da medula inativa (kg)	medula total (kg)
(>95% de CLL) UPN 03 dias - 1 (40% de CLL)			

[00241] Sangue: apenas o indivíduo UPN 02 tem a carga de tumor CLL substancial na infusão sanguínea pre-CART19. A citometria de fluxo que as células tem um fenótipo típico como uma população clonal com uma população de célula CD5+ CD10-CD19+ CD20 (dim)+ CD23 (variável)+ IgM-B, restrito por capa superfície dim. Aproximadamente 35 % das células CLL coexpressadas CD38. A carga CLL não clara com 3 ciclos de quimioterapia de bendamustina e estava presente no tempo das infusões CART19. No tempo da infusão CART19, a contagem CLL no sangue foi 55.000 células/ μ L. Assumindo o volume sanguíneo de 5,0 L, indivíduo UPN 02 tem células $2,75 \times 10^{11}$ CLL no sangue no dia 0. Dado o WBC total normal em indivíduos com UPN 01 e 03, a circulação da carga da doença nestes indivíduos não foi calculado, que deve levar em uma estimativa leve da carga corporal total.

[00242] Tecidos linfóides secundários: o volume de linfadenopatia e esplenomegalia foi quantificada nas varreduras CT axial usando o software aprovado por FDA. Os volumes são para o peito, abdômen e pélvis apenas. As massas do corpo vertebral T1 ao nível da bifurcação da artéria femoral comum foram medidas em todos os indivíduos e em alguns, os nódulos na área inguinal também foram incluídas. Os nódulos na cabeça/pescoço e extremidades foram excluídas a partir da análise e excluídas a partir da linha de base do número de célula CLL alvo, que também levou a uma estimativa leve da carga corporal total. Os indivíduos com UPN 01 e 03 tem as remissões completas adequadas além de 6 meses e deste modo a fórmula (linha de base no volume – 3 meses de volume) foi usado para determinar a redução na carga de tumor a partir da linha de base; indivíduo com UPN 02 tem a doença estável em adenopatia e deste modo a massa de tumor de linha de base é estimada pela subtração do volume esplênico de referência a partir

dos machos saudáveis pontuados (Harris et al., 2010, Eur J Radiol 75:e97-e 101). A massa de tumor da linha de base foi convertida às células CLL usando um método de densidade (1 Kg/L de densidade e células 1 Kg = 1012) células ou um método de volume (células CLL são 10 μ M diâmetro ou 600 fL, assumindo a forma esférica) e ambos os valores apresentados na Figura 10. Os volumes de tumor nos tecidos linfóides secundários nos três indivíduos são mostrados abaixo na Tabela 2 como calculado a partir das varreduras CT disponíveis.

Tabela 2: Volume de Tumor

paciente	dia de estudo	volume LN (mm3)	volume do baço (mm3)	volume total (mm3)
UPN 01	-37	239655	1619180	1858835
	1 mês	105005	1258575	1363580
	3 meses	65060	1176625	1241685
UPN 02	-24	115990	1166800	1282790
	1 mês	111755	940960	1052715
UPN 03	-10	239160	435825	674985
	1 mês	111525	371200	482725
	3 meses	47245	299860	347105

[00243] A varredura da linha de base CT para indivíduo UPN 01 foi realizada 8 dias após 2 ciclos de pentostatina/ciclofosfamida/rituaimab e não mostrado a resposta a este regime de quimioterapia comparado à varredura CT prévia. O indivíduo tem um ciclo de bendamustina antes de CART 19 e deste modo, a mudança no valor do tumor do dia - 37 ao dia +31 por UPN 01 não pode excluir a contribuição potencial de bendamustina bem como CART19. Similarmente, a mudança no volume de tumor por UPN 03 reflete o efeito combinado de 1 ciclo de pentastatina/ciclofosfamida e CART 19.

Método para estimar eficaz na razão in vivo E:T em pacientes

[00244] A razão E;T das células T CAR infundidas ao número das

células tumorais mortas foi calculada usando o número de células tumorais presentes no tempo da injeção da célula T CAR e o número das células T CAR injetadas (Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:3360-3365). Para a presente invenção, o número das células T CART 19+ injetadas como mostrado na Figura 10 foi usado por causa deste não ser possível para determinar o número absoluto das células T CART19+ presentes *in vivo* com exatidão suficiente ou precisão. Os dados disponíveis na expansão CART19 em sangue e medula é robusta como descrito na Figura 2 e Figura 6. Entretanto não foi possível determinar o tráfico de CART19 a outros locais tal como tecidos linfóides secundários, criando incerteza substancial quanto ao número total das células CARTI 9 atingidas *in vivo* no tempo da redução de tumor máximo. Os valores calculados a partir da tabela 3 foram usados para derivar as razões ET eficazes.

Tabela 3: razões CART19 E: T calculadas atingidas pelas células CART19+ *in vivo*.

paciente	carga tumoral (linha de base e delta)				células CART19+ infundidas	E:T <i>in vivo</i>
	linha de base de medula óssea	linha de base sanguínea	linha de base de nódulos/baço ¹	mudança total na carga CLL		
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+11	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	1:93,000
					faixa	1000 - 93,000

1 = média da densidade e método de volume

2 = indivíduo UPNO2 não responde na medula óssea e tem uma redução parcial em adenopatia (células 3,1E+11) nas massas tumorais medidas por CT em baço e linfonodo. Ver Figura 5A para a resposta no sangue.

Processamento de amostra e congelamento

[00245] As amostras (sangue periférico, medula) foram coletados em tubos vacutainer de topo lavanda (K2EDTA,) ou topo vermelho (nenhum aditivo) (Becton Dickinson) e liberado ao TCSL dentro de 2 horas de retirada.

As amostras foram processadas dentro de 30 minutos do recipiente de acordo com o laboratório SOP estabelecido. O sangue periférico e células de medula mononuclear foram purificadas por intermédio da centrifugação gradiente de densidade Ficoll usando Ficoll-Paque (GE Health care, 17-1440-03) e congelado 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 % DMSO (Sigma, D2650) usando 5100 Cryo 1° recipientes de congelamento; após 24-72 horas a -80°C, as células foram transfectadas ao nitrogênio líquido para a armazenagem de termo longo. As amostras de aférese foram obtidas através do Hospital of the University of Pennsylvania Blood Bank e processado no CVPF pela purificação do gradiente Ficoll e congelado como acima. A viabilidade imediatamente pós-descongelamento foi maior do que 85 % quando avaliado. Pelo isolamento de soro, as amostras foram deixadas coagular por 1,5-2 horas em temperatura ambiente; soro isolado pela centrifugação e uso simples 100 µl de alíquotas congeladas a -80°C.

Linhas celulares

[00246] K562 (CML, CD19-negativo) foi obtido de AT CC (CCL-243). K562/CD19, um presente generoso de Carmine Carpenito e é K562 lentiviralmente submetido a transdução a 100 % de frequência para expressar a molécula CD19, NALM-6, um CD19-positivo não T, linha da célula B precursora ALL não B (Hurwitz et al., 1979, Int 7 Cancer 23:174-180) e confirmado para expressar o antígeno CD19 foi um presente generoso de Laurence Cooper. As linhas celulares acima foram mantidas no meio R10 (RPM 1640 (Gibco, 11875) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (Hyclone) e 1 % de Pen-Strep (Gibco, 15140-122). As células mononucleares periféricas (ND365) a partir do doador saudável foram obtidos pela aférese de Human Immunology Core at the University of Pennsylvania, processado e congelado como acima.

Isolamento de DNA e análise Q-PCR

[00247] As amostras do sangue total ou medula foram coletadas nos tubos vacutainer de topo de lavanda (K3EDTA) BD (Becton Dickinson). O DNA genômico foi isolado diretamente do sangue total usando os kits midi do sangue QIAamp DNA (Qiagen) e laboratório SOP estabelecido, quantificado pelo espectrofotômetro e armazenado a -80°C . A análise QPCR nas amostras DNA genômicas foi realizada em volume usando 123-200 ng de DNA genômico/ponto de tempo, tecnologia ABI Tagman e um ensaio validado para detectar a sequência de transgene CD19 CAR integrado. As faixas de parâmetro de passagem/falha, incluindo inclinação de curva padrão e valores r^2 , capacidade em uma quantidade exata de uma amostra de referência (1000 cópias/ponto de plasmídeo) e nenhuma amplificação na amostra de DNA de doador saudável foram calculados a partir dos estudos de qualificação e faixas aceitáveis pré-estabelecidas. O iniciador/sondas para o transgene CD19 CAR foram como descrito (Milone et al., 2009, Mol Ther 17:1453-1464). Para determinar o número/unidade de cópias de DNA uma curva padrão de 8 pontos foi gerada consistente de 10^6 -5 cópias de plasmídeo de lentivírus com pontas em 100 ng não submetido a transdução de DNA genômico de controle. Cada ponto de dados (amostras, curva padrão, amostras de referência) foi avaliado em triplicato com os valores médios relatados. Para o indivíduo UPN 01, todos os valores relacionados foram derivados a partir do valor Ct positivo em 3/3 replicados com % de CV menos do que 0,46 %. Pelo indivíduo UPN 02, com a exceção do dia da amostra +177 (2/3 replica-se positivo, alto % de CV), todos os valores relacionados foram derivados de um valor Ct positivo em 3/3 replicados com % de CV menos do que 0,72 %. Para o indivíduo UPN 03, com a exceção do dia da amostra +1 (2/3 replica-se positivo, 0,8 % de CV) e o dia da amostra +3 (2/3 replica-se positivo, 0,67 % de CV), todos os valores relacionados foram derivados de um valor Ct positivo em 3/3 replicado com % de CV menos do que 1,56 %. O limite inferior da

quantificação (LLOQ) pelo ensaio foi determinado a partir da curva padrão em 2 cópias/DNA de micrograma (10 cópias/200 ng de DNA de entrada); valores médios abaixo de LLOQ (isto é relatado não quantificável) são considerados aproximados. Uma reação de amplificação paralela para controlar a qualidade de DNA interrogado foi realizado usando 12-20 ng da entrada de DNA genômico, uma combinação iniciadora/sonda específica para a sequência a montante genômica não transcrita do gene CDKN 1 A (GENEBANK: Z85996) (iniciador sentido: GAAAGCTGACTG CCTATTTG; SEQ ID N°. 25, iniciador antissentido: GAGAGGAAGTGCTGGGAACAAT; SEQ ID N°, 26, sonda: VIC- CTC CCC AGT CTC TTT; SEQ ID N°, 27) e 8 curvas padrão de ponto criados pela dissolução de DNA genômico de controle; estas reações de amplificação produzem um fator de correção (CF) (ng detectado/ng entrada). As cópias de transgene /DNA de micrograma foram calculados de acordo com a fórmula: cópias calculadas de curva padrão CD19/DNA de entrada (ng) x CF x 1000 ng. A exatidão deste ensaio foi determinada pela capacidade de quantificar a marcação do produto de célula infundida por Q-PCR de acordo com a fórmula: marcação média = cópias detectadas/DNA de entrada x 6,3 pg da célula somática de DNA/macho x CF versus positividade de transgene pela citometria de fluxo usando os reagentes de detecção específico de CAR. Estas determinações cegas geradas 22,68 % fabricando pelo produto de infusão UPN 01 (22,6 % pela citometria de fluxo), 32,33 % fabricado pelo produto de infusão UPN 02 (23 % pela citometria de fluxo) e 4,3 % de fabricação para o produto de infusão UPN 03 (4,7 % de fabricação pela citometria de fluxo).

Análises de citocina

[00248] A quantificação dos fatores de citocina solúveis foi realizado usando tecnologia de ensaio Luminex bead e kits adquiridos de Life technologies (Invitrogen). Os ensaios foram realizados como pelo protocolo do fabricante com uma curva padrão de 8 pontos gerados usando uma série de

dissolução de 3 vezes. Cada ponto padrão e amostra foram avaliados em duplicata na dissolução 1:3; % calculada de CV pelas medições de duplicata foram menores do que 15 %. Os dados foram adquiridos em um Bioplex 200 e analisado com software Bioplex Manager versão 5.0 usando a análise de regressão logística de 5 parâmetros. As faixas de quantificação da curva padrão foram determinadas pela faixa de 80 a 120 % (valor observado/esperado). As faixas de quantificação de analito individual são relacionados nas legendas da Figura.

Ensaio celular para detectar a função CAR

[00249] As células foram avaliadas pela funcionalidade após descongelar e durante a noite restante em TCM pela medição da desgranulação CD107 em resposta às células alvos. Os ensaios de desgranulação foram realizados usando 1×10^6 PBMC e $0,25 \times 10^6$ células alvos em um volume final de 500 µl nas placas de 48 reservatórios por 2 horas a 37°C na presença de CD49d (Becton Dickinson), antiCD28, monensina (e-Bioscience) e anticorpo CD107a-FITC (eBiosciences) essencialmente como descrito (Betts et al., 2003, J Immunol Methods 281:6578).

Reagentes de anticorpo

[00250] Os seguintes anticorpos foram usados nestes estudos: MDA-CAR, um anticorpo anti CD19 CAR de murino conjugado ao Alexa647 foi um presente generoso de Drs. Bipulendu Jena and Laurence Cooper (MD Anderson Cancer Center). Para os ensaios funcionais e imunofenotipagem multi-paramétrica: antiCD3-A700, antiCD8-PECy7, antiPD-1-FITC antiCD25-AF488, antiCD28-PercP-Cy5.5, antiCD57-eF450, antiCD27-APC-eF780, antiCD17-APC-eF780, antiCD45RA-eF605NC, CD107a-FITC (todos de e-Bioscience), antiCD4-PE-Texas Red e Live/Dead Aqua (de Life Technologies) e antiCD14-V500, antiCD16-V500 (de Becton Dickinson). Para a imunofenotipagem geral: CD3-PE, CD14-APC, CD14-PE-Cy7, CD16-FITC, CD 16PE-Cy7, CD19-PE-Cy7, CD20-PE, todos de from Becton Dickinson.

Citometria de fluxo de múltiplos parâmetros

[00251] As células foram avaliadas pela citometria de fluxo fresca após o processamento de Ficoll-Paque ou, se congelado, após durante a noite o restante em uma densidade de 2×10^6 células/ml no meio da célula T (TCM) (X-vivo 15 (Lanza, 04-418Q) suplementado com 5 % de soro AB humano (GemCall, 100-512), 1 % de Hepes (Gibco, 15630-080), 1 % de Pen-Strep (Gibco, 15140-122), 1 % de Glutamax (Gibco, 35050-061) e 0,2 % de N-Acetil Cisteína (American Regent, NDC0517-7610-03). A imunofenotipagem paramétrica múltipla foi realizada em 4×10^6 células/condição totais, usando as manchas FMO como descrito no texto. As células foram tingidas em uma densidade de 1×10^6 células/100 µl PBS por 30 minutos no gelo usando concentrações de anticorpo e reagente recomendados pelo fabricante, lavado, recolocado em suspensão em 0,5 % do paraformaldeído e adquirido usando um LSRII modificado (BD Immunocytometry systems) equipado com laser Blue (488 nm) Violet (405 nm), Green (532) e Red (633 nm) e ajustes de filtro apropriados para a detecção e separação das combinações de anticorpo acima. Um mínimo das células 100.000 CD3+ foram adquiridas) para cada mancha. Pelos ensaios funcionais, as células foram lavadas, tingidas pelos marcadores de superfície, recolocados em suspensão em 0,5 % de paraformaldeído e adquiridos como acima; um mínimo de eventos 50.000 CD3+ foram coletados para cada condição de tingimento. Os valores de compensação foram estabelecidos usando os pigmentos de anticorpo simples e pérolas de compensação BD (Becton Dickinson) e foram calculadas e aplicadas automaticamente pelo instrumento. Os dados foram analisados usando software FlowJo (Version 8.8.4, Treestar). Para as células de imunofenotipagem gerais foram adquiridas usando um citômetro Accuri C6 equipado com um laser Blue (488) e Red (633 nm). Os valores de compensação foram estabelecidos usando pigmentos de anticorpo simples e pérolas de compensação BD (Becton Dickinson) e foram calculados

manualmente. Os dados foram analisados usando a embalagem da análise de software de fluxo C (versão 1.0.264.9, citômetros A ccuri).

Histórico médico passado por indivíduo e resposta a terapia.

[00252] Os resumos do tratamento clínico são resumidos na Figura 10. O indivíduo UPN 01 primeiro foi diagnosticado com a célula B CLL do estágio II na idade 55. O indivíduo foi assintomático e observado por aproximadamente 1-112 anos até requerir a terapia para linfocitose progressiva, trombocitopenia, adenopatia e esplenomegalia. Após 4 ciclos de fludarabina o indivíduo tem a normalização completa das contagens sanguíneas e a resposta completa pelas varreduras CT. A progressão foi notada dentro de 5 meses com linfocitose assintomática, trombocitopenia e aumento de adenopatia. O indivíduo foi observado sem os sintomas por aproximadamente 3 anos e por último o tratamento requerido com Rituximab e fludarabina pela leucocitose progressiva, anemia e trombocitopenia. O indivíduo foi tratado com 4 ciclos de rituximab com fludarabina com o melhoramento parcial nas contagens sanguíneas. O indivíduo novamente tem a progressão dentro de um ano requerindo a terapia manifestada por leucocitose (WBC 150.000/ μ l) e trombocitopenia (grânulos 30.000/ μ l) e foi tratado com alemtuzumab com a normalização das contagens sanguíneas. A progressão foi notada dentro de 13 meses. O indivíduo então recebeu rituximab de agente simples sem uma resposta significativa e seguido por rituximab, ciclofosfamida, vincristina e prednisona (R-CVP) por 2 ciclos com resposta mínima e seguido por lenalidomida. Lenalidomida foi descontinuado por causa da toxicidade. O indivíduo recebeu 2 ciclos de pentostatina, ciclofosfamida e rituximab com uma resposta mínima.

[00253] Depois, o indivíduo recebeu bendamustina como quimioterapia de linfoanulação 4 dias antes da infusão de célula CART19. Antes da terapia, WBC foi 14.200/ μ l, hemoglobina 11,4 gm/ μ l, contagem granulada 78.000/ μ l e ALC foi 8000/ μ l. A varredura CT mostrou a

adenopatia difusa e medula óssea foi extensivamente infiltrada com CLL (67 % das células). O indivíduo recebeu $1,6 \times 10^7$ CART-19 células/kg ($1,13 \times 10^9$ células CART19 totais como avaliado por FACS). Não existem toxicidades infusionais. O indivíduo se torna neutropênico aproximadamente 10 dias após a bendamustina e 6 dias após as infusões da célula CART19 e iniciando 10 dias após a primeira infusão CART19, o indivíduo desenvolveu febre, rigidez e hipotensão aleatória. No mesmo tempo, um raio X de tórax e varredura de CT demonstrou uma pneumonia do lobo superior esquerdo tratado com antibióticos. As febres persistem por aproximadamente 2 semanas e determinado quando existe a recuperação de neutrófilo. O indivíduo não tem sintomas infecciosos ou constitucionais adicionais.

[00254] O indivíduo atingiu uma resposta rápida e completa como descrito na Figura 5. Entre 1 e 6 meses após a infusão nenhuma circulação das células CLL foi detectado no sangue pela citometria de fluxo. A medula óssea a 1, 3 e 6 meses após infusões da célula CART-19 mostram uma ausência adequada do infiltrado linfocítico e morfologia e teste de citometria de fluxo. As varreduras CT a 1 e 3 meses após infusão mostra a resolução completa de adenopatia anormal. O indivíduo tem um leucopenia persistente (WBC 1000-3900/ul) e trombocitopenia (grânulos $\sim 100.000/\mu\text{l}$) e hipogamaglobulinia branda (IgG 525 mg/dL, 650-2000 mg/dL normal) mas nenhuma complicação infecciosa.

[00255] O indivíduo UPN 02 foi tratado com as células CART19 na idade 77. O indivíduo tem um histórico relevante da doença de artéria coronária e foi primeiro diagnosticado com CLL em 2000 na idade 68 quando o indivíduo apresentou com fadiga e leucocitose. O indivíduo foi relativamente estável por 4 anos quando o indivíduo desenvolveu de leucocitose progressiva ($195.000/\mu\text{l}$), anemia e trombocitopenia requerindo a terapia. O teste genético naquele tempo mostrou que as células CLL tem a anulação do cromossomo 17p. Por causa da doença progressiva, o indivíduo

foi tratado com um curso de 12 semanas de alemtuzumab com uma resposta parcial e melhoramento nas contagens sanguíneas. Dentro de um e metade dos anos o indivíduo tem a leucocitose progressiva, anemia, trombocitopenia e esplenomegalia. A análise cariotípica confirmou a anulação do cromossomo 17p agora com uma anulação do cromossomo 13q. O indivíduo foi tratado novamente com alemtuzumab por 18 semanas com o melhoramento de leucocitose e estabilização de anemia e esplenomegalia. O indivíduo tem evidência da leucocitose progressiva, anemia e trombocitopenia dentro de um ano. O tratamento inclui 2 ciclos de bendamustina com rituximab resultando na doença estável mas nenhum melhoramento significativo como mostrado na Figura 5A.

[00256] O indivíduo recebeu bendamustina sozinho como quimioterapia de linfoanulação antes da infusão da célula CART-19. O indivíduo recebeu $4,3 \times 10^6$ CART 19 células/kg ($4,1 \times 10^8$ células totais) em 3 infusões de divisão complicadas pelas febres aleatórias tão alta quanto 102° graus por 24 horas. No dia 1 após a primeira infusão, o indivíduo recebeu uma intensificação de $4,1 \times 10^8$ células ($4,3 \times 10^6$ /kg) CART19 e sua infusão foi complicada por febres, rigidez e brevidade de respiração sem hipoxia requerendo uma hospitalização de 24 horas. Não existe evidência para isquemia cardíaca e os sintomas determinados. No dia 15 após a primeira infusão CART-19 e dia 4 após a intensificação da infusão da célula CART19 o indivíduo foi admitido ao hospital com as febres altas (até 104°F (40°C)), frio e rigidez. O teste extensivo com o sangue e culturas de urina e CXR falharam em identificar uma fonte da infecção. O indivíduo queixou-se de brevidade de respiração mas não teve hipoxia. Um ecocardiograma mostrou diversa hipocinese. A fração de ejeção foi 20 %. O indivíduo recebeu prednisona 1 mg por quilograma por um dia e 0,3 mg por quilograma por aproximadamente uma semana. Este resultou na resolução rápida das febres e disfunção cardíaca.

[00257] Coincidente com o início das febres altas, o indivíduo tem uma gota rápida em linfócitos a partir do sangue periférico como descrito na Figura 5A. Embora o indivíduo tem a normalização da contagem de células sanguíneas brancas, o indivíduo tem a circulação CLL persistente, a anemia moderada estável e trombocitopenia. A medula óssea mostrou a infiltração extensiva persistente de CLL um mês após terapia apesar da citoredução de sangue periférico dramático e varreduras CT mostraram uma redução parcial de adenopatia e esplenomegalia. Cinco meses após as infusões da célula CART19 o indivíduo desenvolveu a linfocitose progressiva. Nove meses após infusões o indivíduo teve linfocitose (16.500/ μ l) com anemia modesta estável e trombocitopenia com adenopatia estável. O indivíduo permanece assintomático e não tem a terapia adicional.

[00258] O indivíduo UPN 03 foi diagnosticado com o estágio I CLL assintomático na idade 50 e foi seguido com a observação por 6 anos. Depois, o indivíduo tem a leucocitose progressiva (contagem de célula sanguínea branca 92.000/ μ l) e adenopatia progressiva requerindo a terapia. O indivíduo recebeu 2 ciclos de rituximab com fludarabina que resultou na normalização das contagens sanguíneas e melhoramento significativo embora a resolução não completa em adenopatia. O indivíduo tem aproximadamente a 3 anos de progressão de intervalo livre seguido nos próximos 6 meses pela leucocitose progressiva rapidamente (WBC 165.000/ μ l) e adenopatia progressiva requerindo a terapia. O indivíduo recebeu um ciclo de fludarabina e 3 ciclos de rituximab com fludarabina com a normalização das contagens sanguíneas e resolução da adenopatia palpável. O indivíduo tem m intervalo livre de progressão de 20 meses aproximados até o indivíduo novamente desenvolver rapidamente a progressão de leucocitose e adenopatia. Neste período, medula óssea foi extensivamente infiltrada com CLL e análise cariotípica mostrou as células para conter a anulação do cromossomo 17p com FISH demonstrando uma anulação TP53 nas células 170/200. O indivíduo recebeu um ciclo de

rituximab com bendamustina seguido por 4 ciclos de bendamustina apenas (devido a várias reações alérgicas a rituximab). O indivíduo tem a normalização inicial das contagens sanguíneas mas insuficientemente após o interrompimento da terapia que teve leucocitose progressiva e adenopatia.

[00259] As células T autólogas foram coletadas pela aférese e criopreservadas a partir do indivíduo UPN3. O indivíduo então foi tratado com alemtuzumab por 1 semanas embora com uma resposta hematológica excelente. Existe o melhoramento embora a resolução não completa em adenopatia. O indivíduo tem ativo mas a doença estável nos próximos 6 meses. Depois, o indivíduo recebeu pentostatina e ciclofosfamida como quimioterapia de linfoanulação antes da infusão da célula CART19.

[00260] Três dias após a quimioterapia mas antes da infusão celular, a medula óssea foi hiper celular (60 %) com aproximadamente 40 % do envolvimento por CLL. Por causa das limitações do fabricante inerentes nas coleções de aférese a partir dos indivíduos com CLL como descrito na tabela 3 e (Bonyhadi et al., 2005, J Immunol 174:2366-2375), o indivíduo foi infundido com um total de células $1,46 \times 10^5$ CART19+ por kg ($1,42 \times 10^7$ das células CART19+ totais) em 3 dias. Não existe as toxicidades infuncionais. Quatorze dias após a primeira infusão, o indivíduo começa tendo frio, febre tão alta quanto 102°F (38,89°C), rigidez, náuseas e diarreia tratada sintomaticamente. O indivíduo não tem sintomas cardíacos ou respiratórios. Por dia 22 após a infusão, uma síndrome de lise de tumor foi diagnosticada manifestada por um LDH elevado, ácido úrico e complicado pela insuficiência renal. O indivíduo foi hospitalizado e tratado com ressuscitação de fluido e rasburicase com normalização de lipídeo e ácido úrico e função renal. Uma avaliação clínica detalhada com um CXR, sangue, urina e culturas de fezes foram realizadas e foram todos negativos ou normais.

[00261] Dentro de 1 mês de infusões de CART-19, o indivíduo teve liberação de CLL circulante do sangue e medula óssea por morfologia,

citometria de fluxo, análise citogenética e de FISH e varreduras CT apresentaram resolução de adenopatia anormal (Figura 5C). A remissão do indivíduo foi sustentada além de 8 meses a partir da infusão celular de CART19 inicial.

Os resultados dos experimentos são descritos agora.

Protocolo clínico

[00262] Três indivíduos com CLL resistente à quimioterapia avançada foram inscrito em um ensaio clínico piloto como descrito na Figura 1. Todos os indivíduos foram extensivamente pré-tratados com vários regimes de quimioterapia e biológicos como mostrado na Figura 10. Dois dos indivíduos tiveram CLL deficiente de p53, uma anulação que prognostica resposta deficiente à terapia convencional e progressão rápida (Dohner et al., 1995, Blood, 851580-1589). Cada um dos indivíduos teve cargas tumorais grandes seguindo a quimioterapia preparativa, incluindo infiltração de medula extensiva (40 a 95 %) e linfadenopatia; indivíduo UPN 02 também tem linfocitose periférica significativa. As células T CART19 foram preparadas como descrito na Figura 1B e detalhes da fabricação de célula e caracterização de produto para cada indivíduo são mostrados na Tabela 4. Todos os indivíduos foram pré-tratados de 1 a 4 dias antes das infusões de célula T CART 19 com quimioterapia de linfocitose. Uma lista de infusão de célula de dose de divisão foi usada por causa do teste de ensaio de um CAR que incorpora um domínio de sinalização coestimulador 4-1BB como descrito na Figura 1A.

Tabela 4: Produtos de aférese e critérios de liberação de produto CART19

	Ensaio	Especificação	UPN01	UPN02	UPN03
Produto de aférese					
	Citometria de fluxo para CD3+ de CD45+	N/A			
Produto de CART19					
	Número total de células infundidas	$\sim 2.5 \times 10^9$	5×10^9	$1,275 \times 10^9$ $1,275 \times 10^9$ [2,55 x 10 ⁹ total]	3×10^8

	Viabilidade celular	$\geq 70\%$	96,2%	95,3 (90,5) ¹	90,3
	% de células CD3+	$\geq 80\%$	88,9%	98,8	98,9
	Pérola residual #	≤ 100 pérolas/ 3×10^6 células	3,95	1	4
	Endotoxina	$\leq 3,5$ EU/mL	$<0,5$ EU/mL	$<0,5$ EU/mL	$<0,5$ EU/mL
	Micoplasma	negativo	negativo	negativo	negativo
	Esterilidade (Batec)	sem desenvolvimento	sem desenvolvimento	sem desenvolvimento	sem desenvolvimento
	Cultura fúngica	sem desenvolvimento	sem desenvolvimento	sem desenvolvimento	sem desenvolvimento
	BSA ELISA	$\leq 1\mu\text{g/mL}$	$<0,5$ ng/mL	$<0,5$ ng/mL	$<0,5$ ng/mL
	Lentivírus de replicação competente (RCL)	RCL não detectável	não detectável	Inconclusivo ²	Inconclusivo ²
	Eficiência de transdução (expressão scFV)	$\geq 20\%$	22,6%	23%	4,74% ⁴
	Sequência do DNA do vetor	0,2 – 3 cópias/célula	0,15 ³	0,275	0,101

1 = Dose #2.

2 = Valor de ensaio no Day 12 abaixo de LOQ e foi diminuindo do anterior em expansão consistente com o transporte de DNA de plasmídeo a partir da geração de vetor. Submetido ao FDA como uma melhora informacional.

3 = Liberação de produto com base no tingimento de superfície por FACS.

4 = Excesso de tratamento concedida quanto aos critérios de liberação por DSMC e 1RB externos.

Expansão e persistência de CART19 tráfego à medula óssea

[00263] As células T CAR+ expandidas usando-se pérolas de CD3/CD28 e que expressam um domínio de sinalização de 4-1BB é acreditado ser uma melhora nos CARs que precisam de 4-1BB. Um ensaio de Q-PCR foi desenvolvido para permitir o tráfego quantitativo de células CART 19 no sangue e medula óssea. Todos os indivíduos tiveram expansão e persistência das células of the CART19 no sangue por pelo menos 6 meses como descrito nas Figuras 2A e 2C. Notavelmente, os indivíduos pacientes UPN 01 e UPN 03 tiveram uma expansão de 1.000 a 10.000 vezes de células T CAR+ no sangue durante o primeiro mês pós infusão. Os níveis de expansão de pico coincidiram com o início dos sintomas clínicos pós-infusão no indivíduo UPN 01 (dia 15) e indivíduo UPN 03 (dia 23). Além disso,

seguindo uma queda inicial que pode ser modelada com a primeira ordem cinética, as níveis de célula T CART19 estabilizaram em todos os 3 indivíduos a partir do dia 90 a 180 pós-infusão. Significativamente, as células T CART19 também movido até a medula óssea em todos os indivíduos, embora níveis menores de 5 a 10 vezes do que aqueles observados no sangue como descrito nas Figuras 2D até 2F, Indivíduos UPN 01 e 03 tiveram uma queda linear de log na medula, com um desaparecimento de $T_{1/2}$ de ~35 dias.

Indução de resposta imunes específicas nos compartimentos de sangue e medula óssea seguindo a infusão de CART19

[00264] As amostras de soro de todos os indivíduos foram coletadas e as bateladas analisadas para determinar quantitativamente os níveis de citocina, estimando um painel de citocinas, quimioquinas e outros fatores solúveis para estimar a toxicidades potenciais e para fornecer evidência da função de célula CART19 como descrito na Figura 3. De trinta analitos testados, onze tiveram uma mudança de 3 vezes ou mais a partir da linha de base, incluindo 4 citocinas (IL-6, INF- γ , IL-8 e IL-10), 5 quimioquinas (MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, CXCL9, CXCL10) e receptores solúveis para 1L-1R α e IL-2R α . destes, o interferon- γ teve a mudança relativa maior da linha de base. Interessantemente, o tempo de pico de elevação de citocina em UPN 01 e UPN 03 correlacionado temporariamente com os sintomas clínicos previamente descritos e os níveis de pico de células CART19 no sangue em cada indivíduo. Apenas mudanças modestas fora observadas no indivíduo UPN 02, talvez, como um resultado do tratamento de corticoesteróide dado a este indivíduo. A elevação de IL-2 solúvel não foi detectado no soro dos indivíduos, embora um dos racionais pré-clínicos para o desenvolvimento de células T CAR+ com os domínios de sinalização de 4-1BB foi a propensão reduzida para disparar a secreção de TL-2 em comparação com os domínios de sinalização de CD28 (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17:1453-1464). Isto pode ser relevante para a atividade clínica sustentada como os estudo prévios

mostraram que as células T CAR⁺ são potencialmente suprimidas pelas células T reguladoras (Lee et al., 2011, Cancer Res 71:2871-2881), as células que podem ser eliciadas por CARs que secretam quantidades substanciais de TL-2 ou pelo fornecimento de IL-2 pós-infusão exógeno. Finalmente, uma indução robusta de secreção de citocina nos sobrenadantes de aspirados de medula óssea de UPN 03 foi observado como descrito na figura 3D que também coincidiram com o desenvolvimento da síndrome da lise tumoral e remissão completa.

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

[00265] Uma questão central na imunoterapia contra o câncer mediado por CAR é a fabricação de célula otimizada e domínios de coestimulação intensificam a persistência de células T geneticamente modificadas e permitem o estabelecimento de células T de memória CAR⁺ em indivíduos. Os estudos prévios não demonstraram expansão robusta, persistência prolongada e/ou expressão de CARs em células T após infusão (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115; Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24:e20-e22; Till et al., 2008, Blood, 112, 2261-2271; Savoldo et al., 2011, J Clin Invest doi:10. 1 172IJCI46110). A análise citométrica de fluxo de amostras tanto do sangue quanto a medula em 169 dias após a infusão revelou a presença de células que expressam CAR19 em UPN 03 (Figuras 4A e 4B) e uma ausência de células B como descrito na Figura 4A. Notavelmente, pelo ensaio Q-PCR, todos os três indivíduos persistiram células CAR⁺ em 4 meses e além como descrito nas Figuras 2 e Figuras 6. A frequência *in vivo* de células CAR⁺ pela citometria de fluxo compararam intimamente os valores obtidos do ensaio de PCR para o transgene CART19. De maneira importante, no indivíduo UPN 03, apenas as células CD3⁺ expressaram CAR19, as células CAR 19⁺ não foram detectáveis em subséries positivas de CD16 ou CD14 como descrito na Figura 4A. A expressão de CAR também foi

detectada na superfície de 4,2 % de células T no sangue do indivíduo UPN 01 no dia 71 após a infusão como descrito na Figura 7.

[00266] A seguir, a citometria de fluxo policromática foi usada para realizar estudos detalhados para ainda caracterizar a expressão, fenótipo de função de células CART19 em UPN 03 usando um anticorpo de idiótipo antiCAR (MDA-647) e uma estratégia de entrada mostrada na Figura 8. Diferenças notáveis na expressão de memória e ativação de marcadores nas células tanto CD8+ quanto CD4+ com base na expressão de CAR19 foi observado. No dia 56, as células CD8+ CART19 apresentaram primariamente um fenótipo de memória de atuador (CCR7-CD27-CD28-) consistente com exposição prolongada e robusta para o antígeno como descrito na Figura 4C. Em contraste, as células CD8+ negativos de CAR consistiram de misturas de atuador e células de memória central, com expressão CCR7 em uma subsérie de células e números substanciais nas frações de CD27+/CD28 e CD27+/CD28+. Enquanto populações celulares negativos tanto de CART19 quanto de CAR expressou substancialmente CD57, esta molécula foi uniformemente coexpressada com PD-1 nas células CART19, uma reflexão possível da história replicativa extensiva destas células. Em contraste com a população de célula negativa CAR, a totalidade da população de CART19 CD8+ precisou da expressão tanto de CD25 quanto de CD127. Pelo dia 169, enquanto o fenótipo da população celular negativa de CAR permaneceu similar à amostra do dia 56, a população de CART19 evoluiu para conter uma população minoritária com características de células de memória central, expressão notável de CCR7, níveis mais altos de CD27 e CD28, bem como células CAR+ que foram PD-1-negativo, CD57-negativo e CD127-positivo.

[00267] No compartimento de CD4+, no dia 56, as células CART19 foram caracterizadas pela perda uniforme de CCR7 em uma predominância de células CD27+1CD28+/PD-1+ distribuída dentro tanto de CD57+ quanto dos compartimentos e uma ausência essencial de expressão de CD25 e CD127

como descrito na Figura 4B. Em contraste, as células negativas CAR neste ponto de tempo foram heterogêneas na expressão de CCR7, CD27 e PD-1, CD127 expressado e também continham uma população de CD25+/CD127- (célula T reguladora potencial) substancial. Pelo dia 169, enquanto a expressão de CD28 permaneceu uniformemente positiva em todas as células CAR+CD4+, uma fração das células CD4+ de CART19 CD4+ evoluíram na direção de um fenótipo de memória central com a expressão de CCR7, uma porcentagem mais alta de células CD27, o aparecimento de uma subpopulação PD-1-negativa e aquisição da expressão de CD127. As células CAR-negativas permaneceram razoavelmente consistentes com suas contrapartes do dia 56, com a exceção de uma redução na expressão de CD27, uma diminuição na porcentagem de células CD25+/CD127.

Células CART19 podem reter a função atuadora após 6 meses no sangue

[00268] Além da persistência curta e proliferação *in vivo* inadequada *in vivo*, uma limitação de ensaios prévios com células T CAR+ foi a perda rápida de atividade funcional das células T infundidas *in vivo*. A persistência de células CART19 de nível alto e expressão de superfície da molécula CAR19 no indivíduo UPN 01 e 03 forneceu a oportunidade para testar diretamente as funções atuadoras específicas para antiCD19 em células recuperadas a partir das amostras de sangue periférico criopreservado. O PBMC do indivíduo UPN 03 foi cultivado com células alvos que foram positivas ou negativas para a expressão de CD19 (Figura 4d). A função atuadora específica para antiCD19 robusta de células T CART19 foi demonstrada pela desgranulação específica contra células alvo contra CD19-positivas mas não CD19-negativas, como estimado pela expressão de CD107a de superfície. Notavelmente, a exposição da população de CART19 para alvos CD19-positivos induziu uma internalização rápida de superfície CAR-19 como descrito na Figura 8 para a expressão de superfície de CAR19 nas mesmas células atuadoras em tingimento de citometria de fluxo padrão. A presença de

moléculas coestimuladoras em células alvos não foi requerido para disparar a desgranulação de célula CART19 porque a linha NALM-6 não expressa CD80 ou CD86 (Brentjens et al., 2007, Clin Cancer Res 13:5426-5435). A função atuadora foi evidente no dia 56 pós infusão e foi retido no ponto de tempo do dia 169. A função atuadora robusta de células T CAR+ e CAR também pode ser demonstrada pelo estímulo farmacológico.

Atividade Clínica de Células CART19

[00269] Não existe toxicidades significantes observadas durante os quatro dias seguindo a infusão em qualquer indivíduo, outro do que as reações febris transitória. Entretanto, todos os pacientes desenvolvem subsequentemente as toxicidades clínicas e laboratoriais entre o dia 7 e 21 seguindo a primeira infusão. Estas toxicidades foram de termo curto e reversível. De três indivíduos tratados para encontrar, existem 2 CRs e 1 PR a >6 meses pós-infusão CART19 de acordo com o critério padrão (Halle et al., 2008, Blood 111:5446). Os detalhes do histórico médico passado e resposta à terapia para cada indivíduo são descritos na Figura 10.

[00270] Em breve, o indivíduo UPN 01 desenvolveu uma síndrome febril, com rigor e hipotensão transitório iniciando 10 dias após infusão. As febres persistem por aproximadamente 2 semanas e determinados; o indivíduo ainda não teve os sintomas constitucionais. O indivíduo atingiu uma resposta rápida e completa como descrito na Figura 5. Entre 1 e 6 meses após infusão, nenhuma circulação das células CLL foram detectados no sangue pela citometria de fluxo. A medula óssea a 1, 3 e 6 meses após as células da célula CART19 mostram a ausência adequada do infiltrado linfocítico pela morfologia e análise citométrica de fluxo como descrito na Figura SB. As varreduras CT a 1 e 3 meses após infusão mostram a resolução de adenopatia como descrito na Figura 5C. a remissão completa foi sustentada por 10+ meses neste tempo deste relatório.

[00271] O indivíduo UPN 02 foi tratado com 2 ciclos de bendamustina

com rituximab resultando na doença estável como descrito na Figura 5A. O indivíduo recebeu uma terceira dosagem de bendamustina como quimioterapia de linfoanulação antes da infusão da célula T CART19. O indivíduo desenvolveu febres de 40°C, rigor e dispnéia requerindo 24 horas de hospitalização no dia 11 após a primeira infusão e no dia da segunda intensificação da célula CART19. As febres e sintomas constitucionais persistem no dia 15, o indivíduo tem disfunção cardíaca transitória; todos os sintomas determinados após terapia de corticosteróide foi iniciada no dia 18. Seguindo a infusão CART19 e coincidentes com o início das febres altas, o indivíduo tem liberação rápida das células CLL deficientes de p53 a partir do sangue periférico como descrito na Figura 5A e uma redução parcial de adenopatia, medula óssea mostrou a infiltração extensiva persistente de CLL um mês após a terapia apesar da citoredução do sangue periférico dramático. O indivíduo permanece assintomático.

[00272] O indivíduo UPN 03 recebeu pentostatina e ciclofosfamida como quimioterapia de linfoanulação antes da infusão da célula CART19. Três dias após a quimioterapia mas antes da infusão celular, medula óssea foi hiper celular (60 %) com aproximadamente 50 % de envolvimento por CLL. O indivíduo recebeu uma dosagem baixa das células CART19 ($1,5 \times 10^5$ células T CAR+/kg divididas em 3 dias). Novamente, não existem toxicidades infusionais agudas. Entretanto, 14 dias após a primeira infusão, o indivíduo inicia tendo rigor, febres, náuseas e diarreias. Pelo dia 22 após infusão, síndrome da lise tumoral foi diagnosticado requerendo hospitalização. O indivíduo tem resolução dos sintomas constitucionais e dentro de 1 mês das infusões CART19, o indivíduo tem a liberação da circulação de CLL a partir do sangue e medula óssea pela morfologia, citometria de fluxo, citogenética e análise FISH. As varreduras CT mostrou resolução da adenopatia anormal como descrito nas Figuras 5B e 5C. A remissão completa foi adequada além de 8 meses a partir da infusão da célula CART19 inicial.

Considerações de eficazes CART19 in vivo à razão da célula alvo CLL

[00273] Os estudos pré-clínicos mostrou que os tumores amplos devem ser removidos e aquele da infusão de $2,2 \times 10^7$ CARs devem erradicar os tumores compreendidos de 1×10^9 células, por uma razão in vivo E:T de 1:42 em camundongos humanizados (Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-3365), embora estes cálculos não levam em conta a expansão das células T após injeção. O estímulo da carga do tumor CLL no tempo permitiu o cálculo da redução de tumor e as razões CART19 E:T estimadas atingiu in vivo em três indivíduos com base no número das células T CAR+ infundidas. As cargas tumorais foram calculadas pela medição da carga CLL na medula óssea, sangue e tecidos linfóides secundários. As cargas tumorais da linha de base como mostrado na Figura 10 indicam que cada indivíduo tem ordem das células 10^{12} CLL (isto é carga tumoral de 1 quilograma) antes da infusão de CART19. O indivíduo UPN 03 tem uma carga tumoral da linha de base estimada de $8,8 \times 10^{11}$ CLL na medula óssea no dia -1 (isto é pós-quimioterapia e infusão pré-CART19) e uma massa tumoral medida nos tecidos linfóides secundários de $3,3 - 5,5 \times 10^{11}$ células CLL, dependendo no método da análise de varredura 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 CLL) e que não as células CLL são detectáveis pós-tratamento, uma razão E:T de 1:93.000 notável foi atingida.

[00274] Pelos cálculos similares, uma razão E:T eficaz in vivo de 1:2200 e 1:1000 foi calculado por UPN 01 e UPN 02 como mostrado na tabela 3). No final, uma contribuição de morte serial pelas células T CART19, combinadas com a expansão in vivo CART19 de >1.000 vezes igualmente contribuídos aos efeitos antileucêmicos potentes mediados pelas células CART19.

Células T que expressam os receptores quiméricos estabelecem os efeitos antitumorais de memória e potentes em indivíduos com a leucemia avançada

[00275] A expressão in vivo limitada e função eficaz de CARs foi uma limitação central nestes ensaios testando uma geração de CARs (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115; Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24:e20-e22; Till 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 modelagem pré-clínica demonstrando a persistência intensificada de CARs contendo um módulo de sinalização 4-1BB (Milone et al., 2009, Mol Titer. 17:1453-1464; Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-3365), os experimentos foram indicados ao desenvolver uma segunda geração de CARs projetados com a tecnologia lentiviral do vetor. Esta segunda geração de CARs não foi observada segurar no ajuste da infecção HIV crônica (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci U S A 103:17372-17377). Os resultados presentes mostram que quanto esta segunda geração CAR foi expressada nas células T e cultivadas sob condições indicadas para promover o enxerto das células T de memória central (Rapoport et al., 2005, Nat Med 11:1230-1237; Bondanza et al., 2006, Blood 107:1828-1836), expansão melhorada das células T CAR após infusão foi observada comparada aos prévios relatórios. As células CART 19 estabelecem as células tumorais mortas e memória celular específica para CD19 nas razões E:T in vivo não previamente atingidos.

[00276] CART19 é o primeiro ensaio CAR para incorporar um domínio de sinalização 4-1BB e primeiro para usar a tecnologia lentiviral de vetor. O presente resultado demonstra localização eficiente de CARs aos locais do tumor, com o estabelecimento de fato dos “linfócitos de infiltração tumorais” que exibem a especificidade CD19. A expansão in vivo pronunciada permite a primeira demonstração que os CARs diretamente recuperados a partir dos indivíduos podem reter a função eficaz in vivo por meses. Um prévio estudo tem sugerido que uma primeira geração CAR nas células T específicas para vírus é preferível as células T primárias (Pule et al.,

2008, Nat Med 14:1264-1270), entretanto os resultados com a segunda geração CARs introduzida em idealmente coestimular as células T primárias dá esta noção em questão. Sem desejar ser limitado por qualquer teoria particular, uma nota preventiva é elevada que os efeitos clínicos foram profundos e não precedentes com a lise do quilograma das cargas tumorais medidas em todos os três indivíduos acompanhados com a liberação atrasada dos níveis altos potencialmente perigosos de citocinas em dois dos indivíduos. Os efeitos de distúrbios de citocina clássicos não foram observados. Entretanto, o presente estudo foi indicado para aliviar esta possibilidade pela infusão deliberada de CART19 em um período de três dias.

[00277] Foi observado que as dosagens muito menores de CARs podem eliciar as respostas clínicas potentes. Este foi um estudo piloto que demonstra a segurança do projeto de vetor CART19. A observação que as dosagens das células CART19 diversas ordens de magnitude abaixo aquelas testadas em prévios ensaios podem ter o benefício clínico que tem implicações importantes para a implementação importante para a implementação futura da terapia CAR em uma escala mais ampla e pelo projeto dos ensaios testando os CARs direcionados contra os alvos outros do que CD19.

[00278] Os presentes estudos ainda indicam que CART19 é expressado tanto das células memoriais quanto eficazes e este igualmente contribui à sobrevivência de termo longo comparado aos prévios relatórios. Sem desejar ser ligado por qualquer teoria particular, as células T CAR podem diferenciar *in vivo* em um estado semelhante à memória central no encontro e eliminação subsequente das células alvos (por exemplo células tumorais CLL ou células B normais) expressando o antígeno substituto. De fato a sinalização de 4-1BB foi relacionada para promover o desenvolvimento de memória no contexto da sinalização TCR (Sabbagh et al., 2007, Trends Immunol 28:333-339).

[00279] A proliferação estendido e sobrevivência de CART19 tem os

aspectos relevados de farmacocinéticos das células T CAR não tem sido previamente relacionado. Foi observado que os cinéticos da citocina liberam no soro e medula correlacionados com os níveis CART19 de pico de modo que é possível que o atraso seja iniciado quando os alvos celulares que expressam CD19 se tornam limitantes. O mecanismo da sobrevivência estendido de CART19 pode relacionar a incorporação anteriormente mencionada do domínio 4-1BB ou sinalização até um TCR e/ou CAR natural. Uma possibilidade intrigante é que a sobrevivência estendida é relacionada à população de CART19 que foi identificada nas espécimes da medula, elevando a hipótese que CD19 CARs deve ser mantido para encontrar com os progenitores da célula B na medula óssea. Com relação a esta questão é que conduz a expansão inicial das células CART19 in vivo? Com as 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 apenas o ensaio para ter infusões 1L-2 omitidas, contanto que as células CART19 igualmente expandidas em resposta às citocinas homeostáticas ou mais igualmente, ao CD19 expressados nos alvos leucêmicos e/ou células B normais. No último caso, este deve ser uma característica atrativa por CARs direcionados contra os alvos nos APCs normais tal como CD19 e CD20, como é possível pela própria substituição de CART19 ocorre nas células normais, fornecendo um mecanismo pela memória CAR por meios de “intensificação/vacinação própria” e portanto, imunovigilância tumoral de longo prazo. Os mecanismos de homeostase CART19 pode requerir ainda o estudo para elucidar os mecanismos intrínsecos e externos da célula da persistência. Prévios a estes resultados, mais pesquisadores tem resumidos a terapia CAR como uma forma transitória da imunoterapia, entretanto CARs com os domínios de sinalização otimizados por ter um papel tanto na indução da remissão quanto consolidação bem como pela imunovigilância de longo prazo.

[00280] Os efeitos antileucêmicos potentes foram observados em todos

os três indivíduos, incluindo dois indivíduos com leucemia deficiente p53. Os estudos prévios com CARs tem os efeitos antitumorais de separação difícil a partir da quimioterapia de linfoanulação. Entretanto, a liberação de citocina atrasada combinada com os cinéticos da lise tumoral nos indivíduos imunes à fludarabina que foi coincidente e possivelmente dependente da expansão in vivo CAR no presente estudo, indicando que CART19 media os efeitos antitumorais potentes. Os presentes resultados não excluem um papel pela quimioterapia em potencializar os efeitos de CARs.

[00281] Uma comparação completa do vetor, transgene e procedimentos de fabricação celular com os resultados a partir dos estudos avançados em outros centros podem ser requeridos para ganhar um entendimento total das características chaves para obter a função sustentada das células T CAR in vivo. As terapias de anticorpo diferentes, células T modificadas por CAR tem o potencial para substituir in vivo e persistência de termo longo deve levar ao controle tumoral sustentado. A disponibilidade de um desligamento da autoterapia compreende as células T mortas resistentes não cruzadas tem o potencial para melhorar o resultado dos indivíduos com as malignidades de célula B. Uma limitação da terapia de anticorpo, como por exemplo, com os agentes tal como rituximab e bevicizumab, é que a terapia requer as infusões de anticorpo repetido, que é inconveniente e caro. A liberação da terapia de anticorpo prolongada (neste caso por pelo menos 6 meses em 3 de 3 indivíduos tratados até hoje) com antiCD19 scFv expressado nas células T seguindo uma infusão simples das células CART19 tem um número de vantagens práticas, incluindo conveniências e economias de custo.

Exemplo 2: Células T modificadas pelo receptor AntiLen quimérico na leucemia linfóide crônica

[00282] Um vetor lentiviral que expressa um receptor antígeno quimérico com especificidade pelo antígeno da célula B CD19, ligado com domínios de sinalização CD137 (um receptor coestimulador nas células T [4-

1BB]) e CD3-zeta (um componente de transdução de sinal do receptor de antígeno da célula T), foi projetado. Foi observado que uma dosagem baixa (aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células por quilograma de peso corporal) das células T modificadas autólogas por receptor de antígeno quimérico infundidos novamente em um indivíduo com a leucemia linfocítica crônica imune (CLL) expandida a um nível que foi mais do que 1000 vezes tão alto quanto o nível de enxerto inicial in vivo. Também foi observado que o indivíduo exibiu o desenvolvimento atrasado da síndrome da lise tumoral e com a remissão completa.

[00283] À parte da síndrome da lise tumoral, apenas o outro efeito tóxico 3/4 graus relacionados das células T do receptor antígeno quimérico foi linfopenia. As células projetadas persistem nos níveis altos por pelo menos 6 meses no sangue e medula óssea e continua expressar o receptor antígeno quimérico. Uma resposta imune específica foi detectada na medula óssea, acompanhada pela perda das células B normais e células de leucemia que expressam CD19. A remissão foi avançada 10 meses após tratamento. A hipogamaglobulinemia foi um efeito tóxico crônico esperado.

[00284] Os materiais e métodos utilizados nestes experimentos agora não são descritos.

Materiais e métodos

Procedimentos do estudo

[00285] Um vetor lentiviral de inativação própria (GeMCRIS 0607-793) foi projetado, que foi submetido ao teste de segurança pré-clínico, como previamente relacionado (Milone et al., 2009, Mol Ther, 17: 1453-64). Os métodos da preparação de célula T também foram previamente descritos (Porter et al, 2006, Blood, 107:1325-31). A análise de reação de cadeia de polimerase (PCR) foi realizada para detectar células T receptoras de antígeno quimérico no sangue e medula óssea. O limite inferior da quantificação foi determinada pela curva padrão; valores médios abaixo do limite inferior da

quantificação (isto é, relatável mas não quantificável) são considerados aproximados. O limite inferior da quantificação do ensaio foi 25 cópias por micrograma de DNA genômico.

[00286] A análise de fator solúvel foi realizada com o uso do soro de sangue total e medula óssea que foi separada nas alíquotas para o uso simples e armazenado a -80°C. A quantificação dos fatores de citocina solúveis foi realizado com o uso da tecnologia de arranjo de pérola Luminex e reagentes (Life Technologies).

Aférese #1

[00287] Um procedimento de aférese de 12 a 15 litros é realizado no centro da aférese. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) são obtidas pela geração da célula T CART-19 durante este procedimento. A partir de uma leucaferese simples, pelo menos 50×10^9 células sanguíneas brancas são coletadas para fabricar as células T CART-19. Os leucócitos de sangue de linha de base também são obtidos e criopreservados.

Quimioterapia citorrredutiva

[00288] A quimioterapia é iniciada aproximadamente 5-10 dias antes da infusão contato que as células CART-19 podem ser dadas 1-2 dias após término da quimioterapia. O tempo da iniciação da quimioterapia portanto depende do comprimento do regime. O propósito da quimioterapia é para induzir a linfopenia a fim de facilitar o enxerto e expansão homeostática das células CART-19. A quimioterapia pode ser escolhida também para reduzir a carga do tumor da doença. A quimioterapia citorrredutiva é escolhida e administrada pela comunidade de oncologistas. A escolha da quimioterapia depende dos indivíduos da doença subjacente e as terapias anteriores. Fludarabina (30 mg/m²/dia x 3 dias) e ciclofosfamida (300 mg/m²/dia x 3 dias) são os agentes de escolha, como existe mais experiência com o uso destes agentes na facilitação da imunoterapia adotiva. Diversos outros regimes aceitáveis usando os medicamentos aprovados por FDA são

apropriados, incluindo CHOP, HyperCVAD, EPOCH, DHAP, ICE ou outros regimes.

Avaliação de Restagiamento

[00289] Um restagiamento limitado é realizado no término da quimioterapia a fim de fornecer as medições da carga de tumor de linha de base. Este inclui as avaliações da formação de imagem, exame físico e doença residual mínimo (MRD). Os indivíduos que sofreram o seguinte teste de pré-infusão: exame físico, documentação de eventos adversos e retiradas de sangue para a hematologia, teste de química e gravidez (se aplicável).

Preparação das células T CART-19

[00290] As células T autólogas são projetadas para expressar um anticorpo de cadeia simples extracelular (scFv) com a especificidade por CD19. O scFv extracelular pode redirecionar a especificidade submetida a transdução das células T para as células que expressam CD19, uma molécula que é restrita na expressão na superfície das células malignas e nas células B normais. Além disso ao CD19 scFv, as células são submetidas a transdução para expressar uma molécula de sinalização intracelular compreendido de cadeia TCR ou um domínio de sinalização de tandem compreendido dos módulos de sinalização 4-1BB e TCRK. O scFv é derivado de um anticorpo monoclonal de camundongo e deste modo contém as sequências de camundongo e os domínios de sinalização são totalmente das sequências humanas naturais. As células T CART-19 são fabricadas pelo isolamento das células T pela aférese e usando a tecnologia de 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 Viral, 72: 8463-71) para introduzir scFv:TCRζ:4-1BB nas células T CD4 e CD8. Em alguns indivíduos, um scFv:TCRζ: de controle é introduzido na porção das células para um experimento de repopulação competitiva. Estes receptores são “universal” em que estes se ligam ao antígeno em uma maneira independente de MHC, deste

modo, uma construção receptora pode ser usada para tratar a população dos indivíduos com os tumores positivos de antígeno CD19.

[00291] As construções de CAR foram desenvolvidas em University of Pennsylvania e o vetor de grau clínico foi fabricado a Lentigen Corporation. As células CART-19 são fabricadas na Clinical Cell and Vaccine Production Facility at the University of Pennsylvania de acordo com o processo mostrado na Figura 11. No final das culturas celulares, as células são criopreservadas no criomeio infusível. Uma dosagem simples de células T CART-19 transduzidas compreendidas da infusão de $2,5 \times 10^9$ a células totais 5×10^9 , são administradas em 1 ou 2 sacos. Cada saco contém uma alíquota (volume dependente na dosagem) de criomeio contendo os seguintes reagentes de grau infusíveis (% v/v): 31,25 plasmálito-A, 31,25 de dextrose (5 %), 0,45 de NaCl, até 7,50 de DMSO, 1,00 de dextrina 40, 5,00 de albumina de soro humano com aproximadamente $2,5-5 \times 10^9$ das células T autólogas por saco. Pela segurança aumentada, a primeira dosagem é dada como uma dosagem de separação nos dias 0 e 2, com 10 % das células no dia 0, 30 % no dia 1 e 60 % no dia 2.

Armazenagem

[00292] Os sacos (10 a 100 ml de capacidade) contendo Células T CART-19 transduzidas são armazenadas nas condições de banco de sangue em um congelador -135°C monitorado. Os sacos de infusão são armazenados no congelador até que sejam necessários.

Descongelamento celular

[00293] Após o registro das células na farmácia investigacional, as células congeladas são transportadas no gelo ao lado dos indivíduos. As células são descongeladas ao lado de um saco em um tempo usando um banho de água mantido a 36°C a 38°C . O saco é gentilmente massageado até as células serem descongeladas. Não devem ser deixados congelados no recipiente. Se o produto celular CART-19 parece ter um saco danificado ou

com vazamento, ou de outra maneira, parece estar comprometido, não deve ser submetido à infusão.

Pré-medicação

[00294] Os efeitos colaterais seguindo as infusões da célula T podem incluir a febre aleatória, frios e/ou náuseas. É recomendado que o indivíduo é pré-medicação com acetaminofeno 650 mg pela boca e cloridreto de difenidramina 25-50 mg pela boca ou IV, antes da infusão das células CART-19. Estas medicações podem ser repetidas a cada seis horas como necessárias. Um curso da medicação anti-inflamatória não esteroideal pode ser prescrito se o indivíduo continua ter febre não acreditado por acetaminofeno. É recomendado que os indivíduos não recebem os corticoesteróides sistêmicos tal como hidrocortisona, prednisona, prednisolona (Solu-Medrol) ou dexametasona (Decadron) em qualquer tempo, exceto no caso de uma emergência que ameaça a vida, visto que este pode ter um efeito adverso nas células T. Se os corticoesteróides são requeridos por uma reação de infusão aguda, uma dosagem inicial de hidrocortisona 100 mg é recomendado.

Administração/Infusão

[00295] As infusões iniciam 1 a 2 dias após término da quimioterapia. O dia das primeiras infusões, os indivíduos tem um CBC com diferencial e avaliação de contagens CD3, CD4 e CD8 visto que quimioterapia é dada em parte para induzir a linfopenia. Sem desejar ser ligado por qualquer teoria particular, é acreditado que uma dosagem i.v. inicial de $2,5-5 \times 10^9$ células CART-19 é ótimo por este protocolo. Porque existem cerca de 1×10^{12} células T em um adulto saudável, a dosagem total proposta é equivalente a cerca de 0,5 % da massa corporal total das células T (Roederer, 1995, Nat Med, 1: 621-7; Macallan et al., 2003, Eur J Immunol, 33; 2316-26). A primeira dosagem é administrada usando uma dosagem de divisão nos dias 0 (10 %), 1 (30 %) e 2 (60 %). Os indivíduos recebem a infusão em um ambiente isolado. As células são descongeladas nos indivíduos ao lado como

descrito em toda parte neste. As células descongeladas são dadas em uma taxa de infusão como rapidamente como tolerado de modo que a duração da infusão é aproximadamente 10-15 minutos. As células T transduzidas são administradas pela infusão intravenosa rápida em uma taxa de fluxo de aproximadamente 10 mL a 20 mL por minuto embora um jogo de sangue tipo Y isento de látex de calibre 18 com uma válvula de 3 vias. A duração da infusão é aproximadamente 15 minutos. Um ou dois sacos de células CART-19 modificadas são acreditadas no gelo e as células são administradas ao indivíduo enquanto esfria. Nos indivíduos que receberam as misturas das células CART-19, a fim de facilitar a mistura, as células são administradas simultaneamente usando um adaptador Y. Os indivíduos são infundidos e pré-medicados como descrito por toda parte neste. Os sinais vitais dos indivíduos são avaliados e oximetria de pulso é feito antes da dosagem, no final da infusão e a cada 15 minutos por meio deste por 1 hora e até estes são estáveis e satisfatórios. Uma amostra sanguínea para a determinação da linha de base do nível CART-19 é obtido antes da infusão e 20 minutos pós-infusão. Os indivíduos que experimentam as toxicidades a partir da sua quimioterapia citorredutiva precedente tem sua lista de infusão demorada até estas toxicidades foram determinadas. O atraso de garantia das toxicidades específicas das infusões da célula T incluem: 1) Pulmonar: requerimento para o oxigênio suplemental para manter a saturação maior do que 95 % ou presença das anomalias radiográficos no raio X do peito que são progressivos; 2) Cardíaco: nova arritmia cardíaca não controlada com a conduta médica. 3) Hipotensão requerindo o suporte vasoconstritor. 4) infecção ativa: culturas de sangue positivo para a bactéria, fungo, ou vírus dentro de 48 horas da infusão da célula T. Uma amostra do soro para potássio e ácido úrico é coletado antes da primeira infusão bem como duas horas após cada infusão subsequente.

Laboratórios de pós-infusão para avaliar o enxerto e persistência

[00296] Os indivíduos retornam no dia 4 e 10 após a infusão da célula

CART-19 inicial para ter a retirada do sangue pelos níveis de citocina de soro e CART-19 PCR a fim de avaliar a presença das células CART-19. Os indivíduos retornam uma vez por semana por três semanas para sofrer o seguinte: exame físico, documentação dos eventos adversos e retirada do sangue para a hematologia, química, enxerto e persistência das células CART-19 e laboratórios de pesquisa.

Segunda infusão

[00297] Sem desejar ser ligado por qualquer teoria particular, é acreditado que uma segunda dosagem das células CART-19 podem ser dados no dia 11 aos indivíduos, contanto que esta tolerância adequada à primeira dosagem e as células CART-19 suficientes foram fabricadas. A dosagem é 2×10^9 células totais. Uma amostra de soro para potássio e ácido úrico pode ser coletada duas horas após a infusão.

Segunda aférese

[00298] Um procedimento de aférese de 2 litros é realizado no centro de aférese, PBMC são obtidos para a busca e criopreservado. Os indivíduos que sofrem os seguintes: exame físico, documentação dos eventos adversos e retiradas de sangue para hematologia, química, enxerto e persistência das células CART-19 e laboratórios de pesquisa. Além disso o restante é feito a fim de fornecer as medições da carga de tumor. O teste restante é determinado pelo tipo de doença e inclui a formação de imagem, avaliações MRD, aspirado de medula óssea e biopsia e/ou biopsia de linfonodo.

Avaliações mensais 2 a 6 meses pós-infusão

[00299] Os indivíduos retornam e uma base mensal durante os meses 2 a 6 infusão da célula pós CART-19. Nestas visitas do estudo, indivíduos que sofrem o seguinte: medicação concomitante, exame físico, documentação dos eventos adversos e retiradas do sangue para a hematologia, química, enxerto e persistência das células CART-19 e laboratórios de pesquisa. O ensaio HTV DNA é realizado em meses da infusão da 2-6 células pós CART-19 para

excluir a presença de RCL detectável.

Avaliações trimestrais até 2 anos pós infusão

[00300] Os indivíduos são avaliados em uma base trimestral até 2 anos pós infusão. Nestas visitas de estudo, indivíduos que sofrem o seguinte: medicação concomitante, exame físico, documentação de eventos adversos e retirada do sangue para a hematologia, química, enxerto e persistência das células CART-19 e laboratórios de pesquisa, o ensaio HIV DNA é realizado em 3 meses e infusão da 6 células pós- CART-19 para excluir a presença de RCL detectável.

Os resultados dos experimentos agora são descritos.

Histórico do indivíduo

[00301] O indivíduo recebeu um diagnóstico do estágio I CLL em 1996. Primeiro o tratamento requerido após 6 anos de observação para leucocitose progressiva e adenopatia. Em 2002, foi tratado com dois ciclos de rituximab mais fludarabina; este tratamento resultou na normalização das contagens sanguíneas e resolução parcial de adenopatia. Em 2006, receberam quatro ciclos de rituximab e fludarabina para progressão da doença, novamente com normalização das contagens sanguíneas e regressão parcial de adenopatia. Esta resposta foi seguida por um intervalo livre de progressão de 20 meses e um intervalo livre de tratamento de 2 anos. Em Fevereiro 2009, temos rapidamente a leucocitose progressiva e adenopatia recorrente. A medula óssea foi extensivamente infiltrada com CLL. A análise citogenética mostrou que 3 de 15 células contendo uma anulação de cromossomo 17p e fluorescência no teste de hibridização in situ (FISH) mostrou que 170 de 200 células tem uma anulação que envolve TP53 no cromossomo 17p. Recebemos rituximab com bendamustina por um ciclo e três ciclos de bendamustina adicionais sem rituximab (por causa de uma reação alérgica diversa). Este tratamento resultou em apenas um melhoramento aleatório em linfocitose. A adenopatia progressiva foi documentada por meios da tomografia computada (CT) após terapia.

[00302] As células T autólogas foram coletadas por meios de leucaferese e criopreservada. O indivíduo então recebeu alemtuzumab (um antiCD52, linfócito maduro, antígeno de superfície da célula) por 11 semanas, com a hematopoiese melhorada e uma resolução parcial de adenopatia. Nos próximos 6 meses, tem a doença estável com envolvimento de medula extensiva, persistente e adenopatia difusa com 1- a 3-em linfonodos múltiplos. Em julho de 2010, o indivíduo foi enrolado em um ensaio clínico de 1 fase das células T modificadas por receptor de antígeno quimérico,

Infusões celulares

[00303] As células T autólogas a partir do indivíduo foram descongeladas e submetidas a transdução com lentivírus para expressar o receptor de antígeno quimérico específico para CD19 (Figura 12A); identificadores da sequência pelo vetor lentiviral e sequências relevantes são descritas na Tabela 5. Quatro dias antes da infusão celular, o indivíduo recebeu quimioterapia projetada para anulação de linfócitos (pentostatina em uma dosagem de 4 mg por metro quadrado da área de superfície corporal e ciclofosfamida em uma dosagem de 600 mg por metro quadrado) sem rituximab (Lamanna et al., 2006, J Clin Oncol, 24: 1575-81). Três dias após quimioterapia mas antes da infusão celular, a medula óssea foi hipercelular com aproximadamente 40 % de envolvimento por CLL. As células de leucemia expressadas pela cadeia leve capa e CD5, CD19, CD20 e CD23. A análise citogenética mostrou dois clones separados, ambos resultando em perda do cromossomo 17p e o local TP53(46,XY,del(17)(p12)[5]/46,XY,der(17)t(17;21)(q10;q10)[5]/46,XY[14]). Quatro dias após quimioterapia, o indivíduo recebeu um total de 3×10^8 células T, de que 5 % foram submetidos a transdução, por um total de $1,42 \times 10^7$ submetido as células de transdução ($1,46 \times 10^5$ células por quilograma) dividido em três infusões intravenosas diárias consecutivas (10 % no dia 1, 30 % no dia 2 e 60 % no dia 3). Nenhuma citocina pós-infusão foi administrada.

Nenhum dos efeitos tóxicos das infusões foram notados.

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

SEQ ID NO: #	IDENTIDADE
SEQ ID NO: 1	Vetor de transferência pELPS-CD19-BBZ (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 2	RSV's U3 (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 3	Repetição HW R (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 4	Repetição HIV U5 (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 5	Gag/Pol parcial (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 6	cPPT (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 7	Promotor alfa EF1 (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 8	CD19-BBzeta CAR (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 9	Hu Woodchuck PRE (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 10	Repetição R (sequência do ácido nucleico)t
SEQ ID NO: 11	Repetição U5 (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 12	CD19-BBzeta CAR (sequência de aminoácido)
SEQ ID NO: 13	Líder CD8 (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 14	AntiCD19scFv (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 15	Junta CD8 (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 16	Transmembrana CD8 (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 17	4- 1BB (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 18	CD3zeta (sequência do ácido nucleico)
SEQ ID NO: 19	Líder CD8 (sequência de aminoácido)
SEQ ID NO: 20	AntiCD19scFv (sequência de aminoácido)
SEQ ID NO: 21	Junta CD8 (sequência de aminoácido)
SEQ ID NO: 22	Transmembrana CD8 (sequência de aminoácido)
SEQ ID NO: 23	4-1BB (sequência de aminoácido)
SEQ ID NO: 24	CD3zeta (sequência de aminoácido)

Resposta clínica e avaliações

[00304] Quatorze dias após a primeira infusão, o indivíduo iniciou tendo frio e febre de grau baixo associado com fadiga de 2 graus. Nos próximos 5 dias, os frios intensificados e a temperatura escalada a 39,2°C (102,5°F), associado com rigores, diaforese, anorexia, náusea e diarreia. Não temos sintomas respiratórios ou cardíacos. Por causa das febres, radiografia do peito e sangue, culturas de urina e fezes foram realizados e foram todos negativos ou normais. A síndrome de lise tumoral foi diagnosticada no dia 22 após infusão (Figura 12B). O nível do ácido úrico foi 10,6 mg por decilitro (630,5 µmol por litro), o nível de fósforo era de 4.7 mg por decilitro (1.5 mmol por litro) (faixa normal, 2,4 a 4,7 mg por decilitro [0,8 a 1,5 mmol por litro]) e o nível de desidrogenase de lactato foi de 1130 U por litro (faixa normal, 98 a 192). Existe evidência do dano do rim agudo, 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 [$<88,4 \mu\text{mol}$ por litro]). O indivíduo foi hospitalizado e tratado com ressuscitação de fluido e rasburicase. O nível de ácido úrico retorna à faixa normal dentro de 24 horas e o nível de creatinina dentro de 3 dias; foi descarregado no hospital do dia 4. O nível de desidrogenase de lactato diminui gradualmente, tornando-se normal no seguinte mês.

[00305] Por dia 28 após infusão de célula CART19, adenopatia não foi mais longo palpável e no dia 23, não existe evidência de CLL na medula óssea (Figura 12C). O cariótipo estava agora normal em 15 de 15 células (46,XY) e teste FISH foi negativo para a anulação TP53 em 198 das 200 células examinadas; este é considerado estar dentro dos limites normais nos controles negativos. A análise citométrica de fluxo não mostrou as células CLL e B residuais não foram detectáveis (<1 % das células dentro da abertura de linfócito CD5+CD10-CD19+CD23+). A avaliação CT realizada no dia 31 após infusão mostrou a resolução de adenopatia (Figura 12D).

[00306] Três e 6 meses após infusão da célula CART19, o exame físico permaneceu não remarcável, com nenhuma adenopatia palpável e avaliação CT realiza 3 meses após a infusão das célula CART19 mostrou a remissão adequada (Figura 12D). Os estudos da medula óssea em 3 e 6 meses também não mostrou evidência de CLL por meios da análise morfológica, análise de cariótipo (46,XY), ou análise de citometria de fluxo, com uma perda continuada das células B normais também. A remissão foi sustentada por pelo menos 10 meses.

Toxicidade das células CART 19

[00307] As infusões da célula não tem os efeitos tóxicos agudos. Apenas os sérios eventos adversos (grau 3 ou 4) notados foi a síndrome de lise tumoral de grau 3 descrito acima. O indivíduo tem linfopenia de grau 1 na linha de base e grau 2 ou 3 linfopenia inicia no dia 1 e continua embora pelo menos 10 meses após a terapia. A linfopenia de grau 4, com uma contagem de

linfócito absoluto das 140 células por milímetro cúbico, foi registrado no dia 19, mas do dia 22 embora pelo menos 10 meses, a contagem de linfócito absoluto varia entre 390 e 780 células por milímetro cúbico (grau 2 ou 3 linfopenia). O indivíduo tem trombocitopenia de grau 1 aleatório (contagem granular, 98.000 a 131.000 por milímetro cúbico) a partir do dia 19 embora o dia 26 e neutropenia de grau 1 ou 2 (contagem de neutrófilo absoluto, 1090 a 1630 por milímetro cúbico) a partir do dia 17 até o dia 33. Outros sinais e sintomas que foram provavelmente relacionado ao tratamento do estudo inclui as elevações de grau 1 e 2 em aminotransferase e níveis de fosfatase alcalina, que desenvolveu 17 dias após a primeira infusão e determinado pelo dia 33. Os sintomas constitucionais de grau 1 e 2 que consiste de febre, frio, diaforese, mialgia, dor de cabeça e fadiga. A hipogamaglobulinemia de grau 2 foi corrigido com as infusões da globulina imune intravenosa.

Análise do soro e citocinas de medula óssea

[00308] A resposta clínica dos indivíduos foi acompanhada por um aumento atrasado em níveis das citocinas inflamatórias (Figura 13A até a Figura 13D), com os níveis de quimiocinas responsivas de interferon- γ , o interferon- γ CXCL9 e CXCL10 e interleucina-6 que foram 160 vezes tão alto como o nível de linha de base. A elevação temporal nos níveis de citocina paralelas os sintomas clínicos, elevando 17 a 23 dias após a primeira infusão da célula CART 19.

[00309] Os sobrenadantes a partir dos aspirados de medula óssea seriais foram medidos pelas citocinas e mostrou evidência da ativação imune (Figura 13E). O aumento significativo no receptor de interferon- γ , CXCL9, interleucina-6 e interleucina-2 solúvel foram notados, como comparado com o nível de linha de base no dia antes da infusão da célula T; os valores elevam-se no dia 23 após a primeira infusão da célula CART19. O aumento nas citocinas da medula óssea coincidem com a eliminação das células de leucemia a partir da medula. O fator de necrose tumoral de soro e medula

permaneceu não mudado.

Expansão e persistência das células T receptoras de antígeno quimérico

[00310] O DNA detectado por PCR em tempo real que codifica o receptor de antígeno quimérico antiCD19 (CAR19) iniciado no dia 1 após a primeira infusão (Figura 14A). Mais do que uma expansão 3-log das células *in vivo* foi notada pelo dia 21 após infusão. Nos níveis de pico, as células CART19 no sangue contadas por mais do que 20 % da circulação de linfócitos; estes níveis de pico coincidem com a ocorrência dos sintomas constitucionais, a síndrome de lise tumoral (Figura 12B) e elevações nos níveis de citocina de soro (Figura 13A até a Figura 13D). As células CART19 permanecem detectadas nos níveis altos 6 meses após as infusões, através dos valores diminuídos pelo fator 10 dos níveis de pico. O tempo de duplicação das células T receptoras de antígeno quimérico no sangue foi aproximadamente 1,2 dias, com uma vida média de eliminação de 31 dias.

Células T receptoras de antígeno quiméricas na Medula óssea

[00311] As células CART19 foram identificadas nas espécimes de medula óssea iniciando 23 dias após a primeira infusão (Figura 14B) e persistem por pelo menos 6 meses, com um atraso da vida média de 34 dias. Os níveis maiores das células CART19 na medula óssea foram identificados na primeira avaliação 23 dias após a primeira infusão e coincide com a indução de uma resposta imune, como indicado pelos perfis de secreção de citocina (Figura 13E). A análise citométrica de fluxo dos aspirados da medula óssea indicam uma expansão clonal das células CD5+CD19+ na linha de base que está ausente 1 mês após infusão e em uma amostra obtida 3 meses após infusão (dados não mostrados). As células B normais não foi detectadas após o tratamento (Figura 14C).

Tratamento com células CART19 modificadas geneticamente autólogas

[00312] Descritas neste está o atraso no desenvolvimento da síndrome da lise tumoral e uma resposta completa 3 semanas após o tratamento com as

células T autólogas geneticamente modificadas para alvejar CD19 até a transdução com um vetor de lentivírus que expressa antiCD19 ligado aos domínios de sinalização CD3-zeta e CD137 (4-1BB). As células geneticamente modificadas estavam presentes nos níveis altos na medula óssea por pelo menos 6 meses após infusão. A geração de uma resposta imune específica para CD19 na medula óssea foi demonstrada pela liberação temporal das citocinas e remoção das células de leucemia que coincidem com a infiltração do pico das células T receptoras de antígeno quimérico. O desenvolvimento da síndrome da lise tumoral após imunoterapia celular não foi previamente relatada (Baeksgaard et al., 2003, *Cancer Chemother Pharmacol*, 51: 187-92).

[00313] A manipulação genética das células T autólogas para alvejar os antígenos tumorais específicos é uma estratégia atrativa pela terapia de câncer (Sadelain et al., 2009, *Cur Opin Immunol*, 21: 215-23; Jena et al., 2010, *Blood*, 116: 1035-44). Uma característica importante do método descrito neste é que as células T receptoras de antígeno quimérico podem reconhecer alvos tumorais em uma maneira não restrita por HLA, de modo que os receptores de antígeno quiméricos “fora da prateleira” podem ser construídos pelos tumores com uma ampla variedade das características histológicas. Os vetores lentivirais derivados por HIV foram usados para terapia contra câncer, um método que pode ter algumas vantagens no uso dos vetores retrovirais (June et al., 2009, *Nat Rev Immunol*. 9: 704-16).

[00314] Nos prévios ensaios das células T receptoras de antígeno quimérico, as respostas tumorais objetivas foram as células modificadas pela proliferação modesta e in vivo não foram sustentadas (Kershaw et al., 2006, *Clin Cancer Res*, 12: 6106-15; Till et al., 2008, *Blood*, 112: 2261-71; Pule et al., 2008, *Nat Med*, 14: 1264-70). Brentjens and colleagues relataram os resultados preliminares de um ensaio clínico de receptores de antígeno quimérico alvejados por CD19 ligado ao domínio de sinalização CD28 e

respostas tumorais aleatórias observadas em dois ou três indivíduos com CLL avançado (Brentjens et al., 2010, Mol Ther, 18: 666-8); entretanto, os receptores de antígeno quimérico rapidamente desaparecem a partir da circulação.

[00315] Foi inesperado que a dosagem muito baixa das células T receptoras de antígeno quimérico que foram infundidas resultem em uma resposta tumoral antitumor clinicamente evidente. De fato, a dosagem infundida das $1,5 \times 10^5$ células T receptoras de antígeno quimérico por quilograma foi diversas ordens da magnitude abaixo nas dosagens usadas nos prévios estudos das células T modificadas para expressar os receptores de antígeno quimérico ou receptores de célula T transgênicos (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 ajudar em qualquer teoria particular, é especulado que a quimioterapia pode potencializar os efeitos do receptor de antígeno quimérico.

[00316] A persistência prolongada das células CART19 no sangue e medula óssea do indivíduo resulta a partir da inclusão do domínio da sinalização 4-1BB. Este é igualmente que a célula CART19 mediada pela eliminação das células B normais facilitam a indução da tolerância imunológica ao receptor de antígeno quimérico, visto que as células CART 19 que expressam o fragmento de anticorpo Fv de cadeia simples contendo sequências de murino não foram rejeitadas. Dado a ausência das células de leucemia positivas CD19 detectáveis neste indivíduo e sem ajudar em qualquer teoria particular, é possível que a homeostase das células T receptoras de antígeno quimérico foi atingida pelo menos em parte a partir da estimulação liberada pelos progenitores de célula B precoce como estes iniciam para aparecer na medula óssea. A invenção diz respeito a recuperação que um novo mecanismo pode existir para manter as células T receptoras de

antígeno quimérico “memória”.

[00317] Embora CD19 é um alvo tumoral atrativo, exceto com uma expressão limitada às células B normais e malignas, existe consideração que a persistência das células T receptoras de antígeno quimérico podem mediar a deficiência da célula B de termo longo. De fato, no indivíduo, as células B estavam ausentes a partir do sangue e medula óssea por pelo menos 6 meses após infusão. Estes indivíduo não tem as infecções recorrentes. O alvejamento das células B até CD20 com rituximab é uma estratégia relativamente segurança e eficaz pelos indivíduos com neoplasmos da célula B e linfopenia da célula B de termo longo é controlável (Molina, 2008, Ann Rev Med, 59: 237-50). Os indivíduos tratados com rituximab foram relacionados ter um retorno das células B dentro de meses após o rompimento da terapia. Já não é claro se tal recuperação ocorra em indivíduos cujas células T anticélula B persistem in vivo.

[00318] Os indivíduos que tem CLL com anulações TP53 tem remissões curtas após as terapias padrões (Dohner et al., 1995, Blood, 85: 1580-9). O transplante de medula óssea alogênica foi apenas o método que tem as remissões de termo longo induzido em indivíduos com o CLL avançado (Gribben et al., 2011, Biol Blood Medula Transplant, 17: Suppl:S63-S70). Entretanto, o efeito de enxerto-versus-tumor potente resultante é associado com morbidez considerada por causa da frequência alta da doença de enxerto-versus-hodpedeiro crônica, que é frequentemente especialmente diversos em indivíduos mais velhos – aqueles que são tipicamente afetados por CLL (Gribben et al., 2011, Biol Blood Medula Transplant, 17: Suppl:S63-S70; Sorrow et al., 2008, Blood, 111: 446-52). Os dados apresentados neste sugerem que as células T autólogas geneticamente modificadas podem evitar sua limitação.

[00319] O início atrasado da síndrome da lise tumoral ou secreção da citocina, combinado com vigor na expansão da célula T do receptor de

antígeno quimérico in vivo e atividade antileucemia proeminente, pontos as funções sustentadas e substanciais das células CART19. Os experimentos descritos neste realçam a potência desta terapia e fornece o suporte pelo estudo detalhado das células T autólogas geneticamente modificadas para alvejar CD19 (e outros alvos) através da transdução de um receptor de antígeno quimérico ligado aos domínios de sinalização potentes. A terapia mediada pelo anticorpo diferente, as células T modificadas por receptor de antígeno quimérico tem o potencial para replicar in vivo e persistência de termo longo deve levar ao controle de tumor sustentado. Dois outros indivíduos com o CLL avançado também têm infusões de CART19 recebido de acordo com este protocolo e todos os três tem as respostas tumorais. Estas descobertas garantem o estudo contínuo das células T redirecionadas à CD19 pelos neoplasmas da célula B.

[00320] As descrições de todas as Patentes, Pedidos de Patente e Publicações citados neste são, portanto, incorporados neste por referência em sua totalidade. Enquanto esta invenção for divulgada com referência às formas de realização específicas, estará evidente que outras formas de realização e variações desta invenção podem ser determinadas por outras pessoas habilitadas na técnica sem divergir do espírito verdadeiro e escopo da invenção. As reivindicações são pretendidas serem construídas em todas as tais formas de realização e variações equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma célula, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para estimular uma resposta imune mediada por células T a uma população de células alvo ou tecido em um mamífero, em que a célula compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR), o CAR compreendendo um domínio de ligação ao antígeno, um domínio transmembrana, uma região de sinalização coestimuladora e um domínio de sinalização CD3 zeta compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, em que o domínio de ligação ao antígeno se liga especificamente à população de células alvo ou ao tecido, e em que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio de ligação ao antígeno CD19 compreendendo, do terminal amino ao terminal carboxi, uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 20,

em que a sequência de ácido nucleico compreende:

(i) a sequência de SEQ ID NO: 18, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e

(ii) a sequência de SEQ ID NO: 14, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

2. Uso de uma célula, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para fornecer uma imunidade antitumoral em um mamífero, em que a célula compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR), o CAR compreendendo um domínio de ligação ao antígeno, uma transmembrana domínio, uma região de sinalização coestimuladora e um domínio de sinalização CD3 zeta compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e em que o domínio de ligação ao antígeno compreende um

domínio de ligação ao antígeno CD19 compreendendo, do terminal amino ao terminal carboxi, uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 20,

em que a sequência de ácido nucleico compreende:

(i) a sequência de SEQ ID NO: 18, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e

(ii) a sequência de SEQ ID NO: 14, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

3. Uso de uma célula, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento de um mamífero com uma doença, distúrbio ou condição associada a uma expressão elevada de um antígeno tumoral, em que a célula compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR), o CAR compreendendo um domínio de ligação ao antígeno, um domínio transmembranar, uma região de sinalização coestimuladora e um domínio de sinalização zeta de CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e em que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio de ligação ao antígeno CD19 compreendendo, do terminal amino ao terminal carboxi, uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 20,

em que a sequência de ácido nucleico compreende:

(i) a sequência de SEQ ID NO: 18, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e

(ii) a sequência de SEQ ID NO: 14, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

4. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula T autóloga.

5. Uso de uma célula, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento de um ser humano com leucemia linfocítica crônica, em que a célula é uma célula T, em que a célula compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR), o CAR compreendendo um domínio de ligação ao antígeno, um domínio transmembranar, uma região de sinalização coestimuladora e um domínio de sinalização zeta de CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e em que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio de ligação ao antígeno CD19 compreendendo, do terminal amino ao terminal carboxi, uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 20,

em que a sequência de ácido nucleico compreende:

(i) a sequência de SEQ ID NO: 18, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e

(ii) a sequência de SEQ ID NO: 14, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

6. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o ser humano é resistente a pelo menos um agente quimioterápico.

7. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a leucemia linfocítica crônica é a leucemia CD19 + refratária e o linfoma.

8. Uso de uma célula, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para gerar uma população persistente de células T geneticamente modificadas em um humano diagnosticado com

câncer, em que a população persistente de células T geneticamente modificadas persiste no ser humano por pelo menos um mês após a administração, e em que a célula é uma célula T, em que a célula compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR), o CAR compreendendo um domínio de ligação ao antígeno, um domínio transmembrana, uma região de sinalização coestimuladora e um domínio de sinalização zeta CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e em que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio de ligação ao antígeno CD19 compreendendo, do terminal amino ao terminal carboxi, uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 20,

em que a sequência de ácido nucleico compreende:

- (i) a sequência de SEQ ID NO: 18, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e
- (ii) a sequência de SEQ ID NO: 14, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

9. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a população persistente de células T geneticamente modificadas compreende pelo menos uma célula selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula T que foi administrada ao ser humano, uma progênie de uma célula T que foi administrada a o humano e uma combinação dos mesmos.

10. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a população persistente de células T geneticamente modificadas compreende uma célula T de memória.

11. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o câncer é leucemia linfocítica crônica.

12. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a leucemia linfocítica crônica é a leucemia CD19 + refratária e o linfoma.

13. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a população persistente de células T geneticamente modificadas persiste no ser humano por pelo menos três meses após a administração.

14. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a população persistente de células T geneticamente modificadas persiste no ser humano por 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.

15. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a leucemia linfocítica crônica é tratada.

16. Uso de uma célula, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para expandir uma população de células T geneticamente modificadas em um ser humano diagnosticado com câncer, em que a célula T geneticamente modificada administrada produz uma população de células T descendentes no ser humano, em que a célula é uma célula T, em que a célula compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR), o CAR compreendendo um domínio de ligação ao antígeno, um domínio transmembrana, uma região de sinalização coestimulatória e um domínio de sinalização zeta CD3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e em que o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio de ligação ao antígeno CD19 compreendendo, do terminal amino ao terminal carboxi, uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 20,

em que a sequência de ácido nucleico compreende:

(i) a sequência de SEQ ID NO: 18, ou uma sequência

degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e

(ii) a sequência de SEQ ID NO: 14, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

17. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que as células T descendentes no ser humano compreendem uma célula T de memória.

18. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a célula T é uma célula T autóloga.

19. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o ser humano é resistente a pelo menos um agente quimioterápico.

20. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o câncer é leucemia linfocítica crônica.

21. Uso de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a leucemia linfocítica crônica é a leucemia CD19 + refratária e o linfoma.

22. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a população de células T descendentes persiste no ser humano por pelo menos três meses após a administração.

23. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a população de células T descendentes persiste no ser humano por pelo menos quatro meses, cinco meses, seis meses, sete meses, oito meses, nove meses, dez meses, onze meses, doze meses, dois ou três anos após a administração.

24. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o câncer é tratado.

25. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que a célula expressa a sequência de

aminoácidos de SEQ ID NO: 12 ou o CAR consiste em um scFv anti-CD19 da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 como o domínio de ligação ao antígeno, uma região de dobradiça CD8 α de SEQ ID NO: 21, uma região transmembrana de CD8 α de SEQ ID NO: 22 como o domínio transmembranar e um domínio 4-1BB de SEQ ID NO: 23 como a região de sinalização coestimuladora,

em que a sequência de ácido nucleico compreende:

(i) a sequência de SEQ ID NO: 8, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12,

(ii) a sequência de SEQ ID NO: 14, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20,

(iii) a sequência de SEQ ID NO: 15, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21,

(iv) a sequência de SEQ ID NO: 16, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, e

(v) a sequência de SEQ ID NO: 17, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

26. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácido nucleico compreende a SEQ ID NO: 8.

27. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

28. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

24, caracterizado pelo fato de que o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab ou um scFv.

29. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que o antígeno tumoral está associado a uma malignidade hematológica.

30. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que o antígeno tumoral está associado a um tumor sólido.

31. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que a região de sinalização coestimulatória compreende o domínio intracelular de uma molécula coestimuladora selecionada do grupo que consiste em CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD- 1, ICOS, antígeno-1 associado à função linfocitária (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, um ligante que se liga especificamente a CD83 e qualquer combinação dos mesmos.

32. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização zeta de CD3 é codificado pela sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 18.

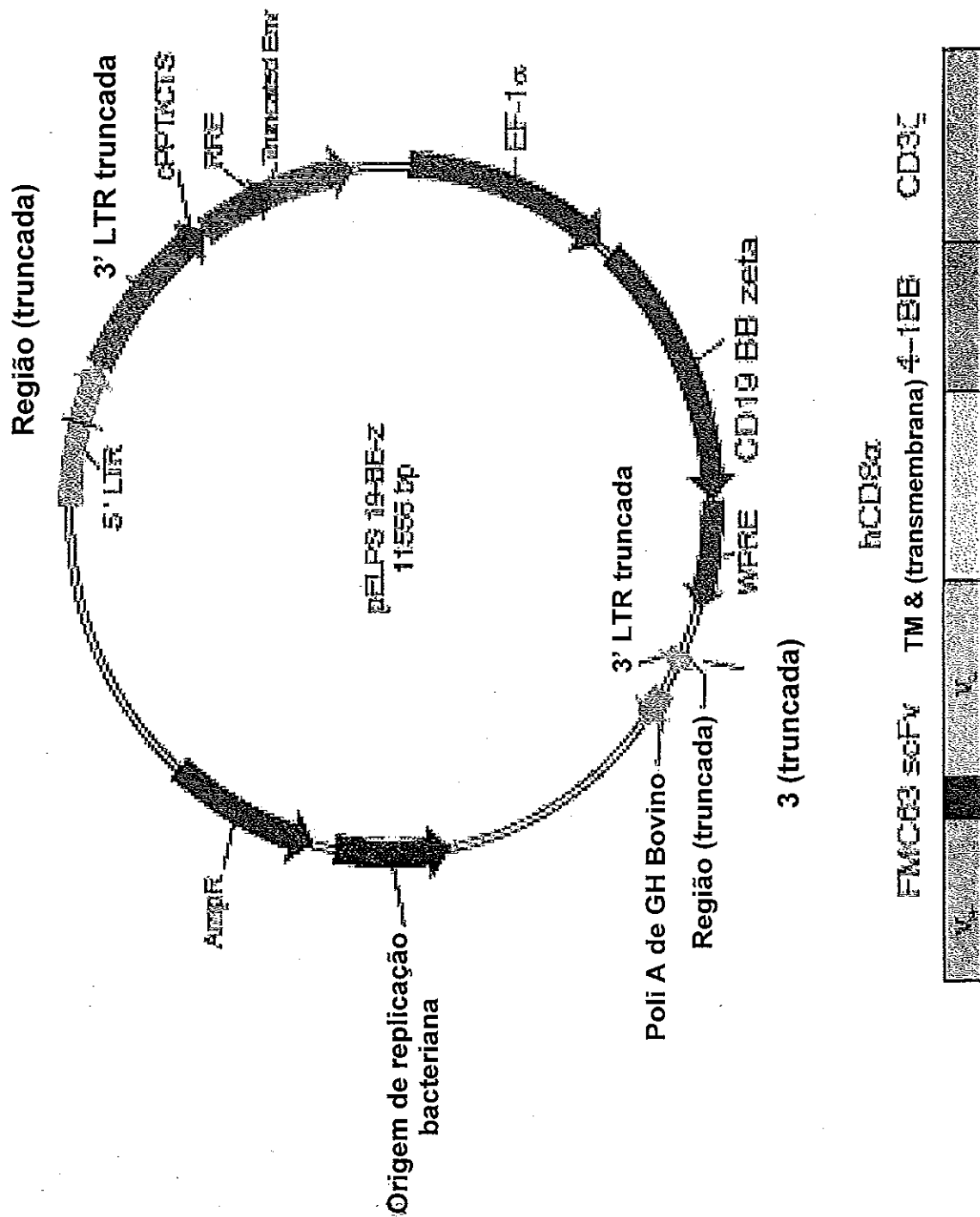


Figura 1A

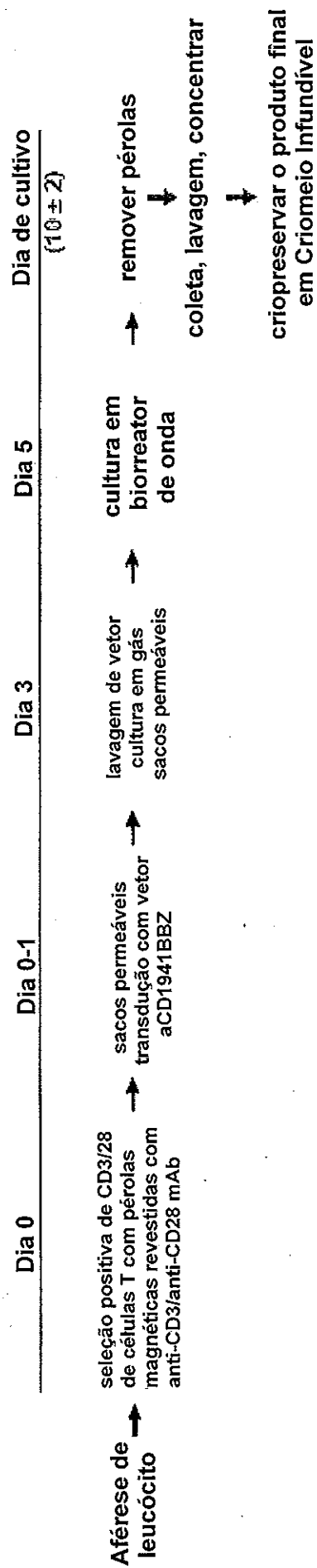


Figura 1B

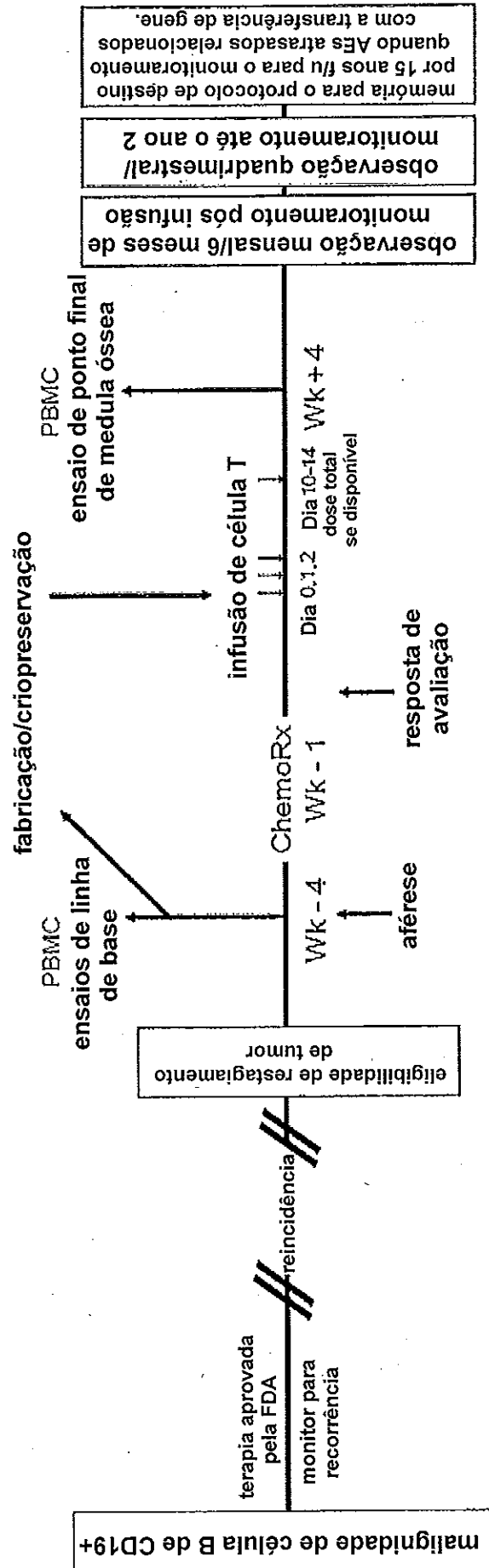
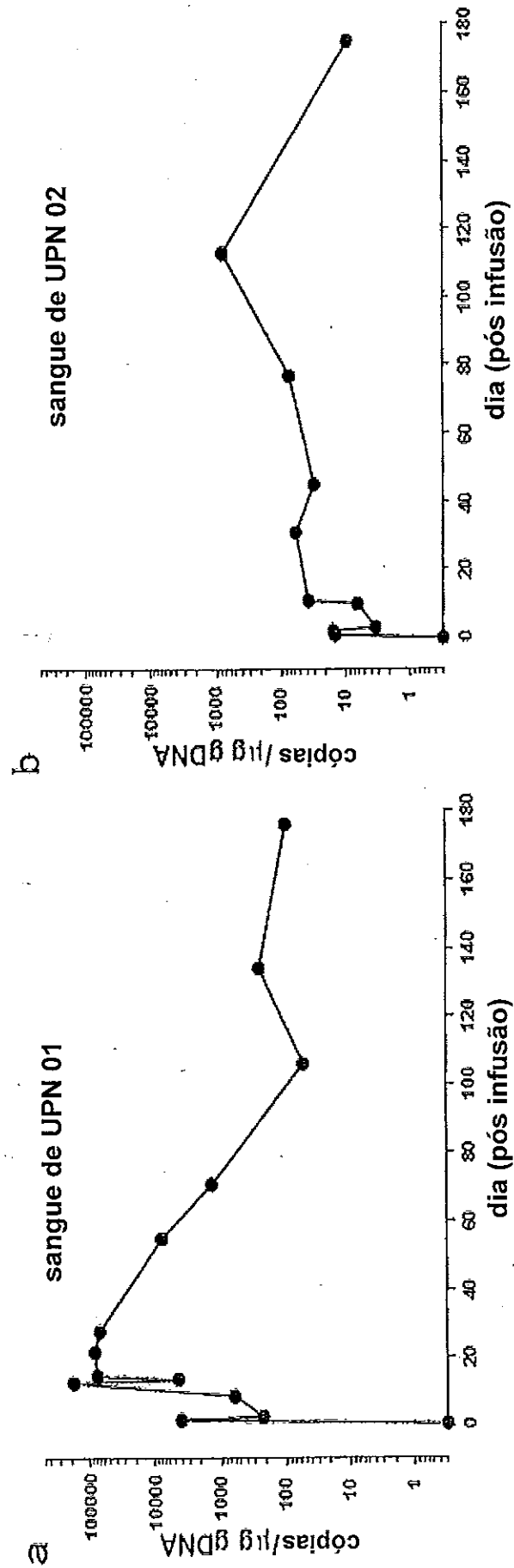
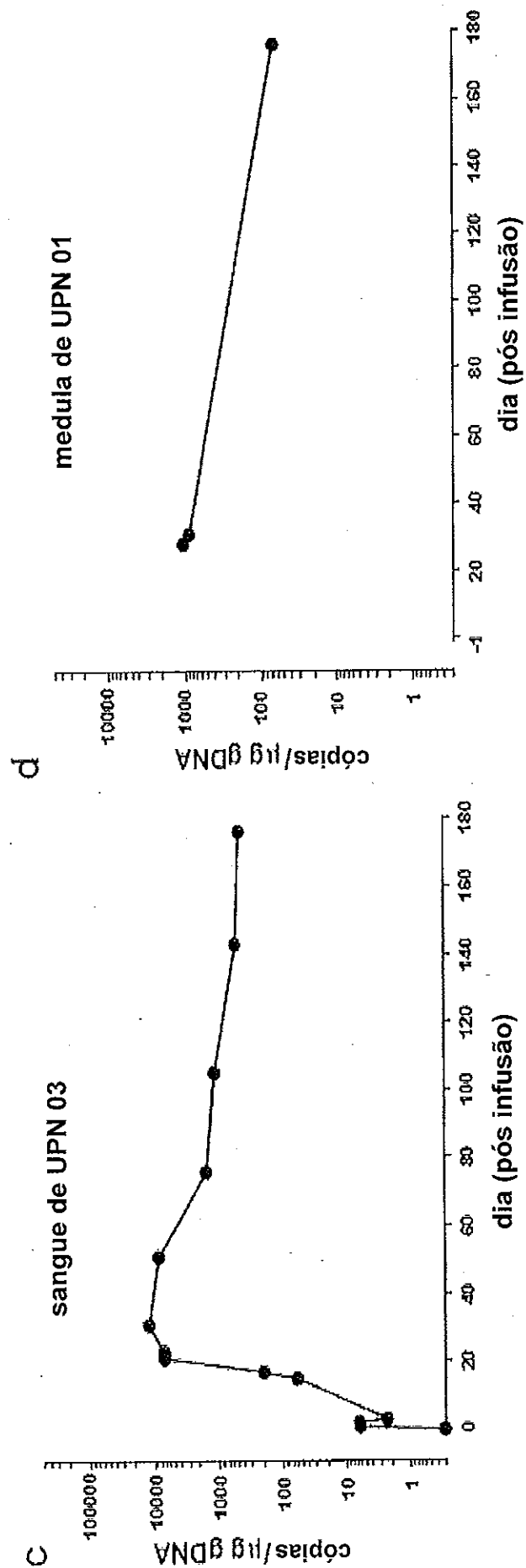


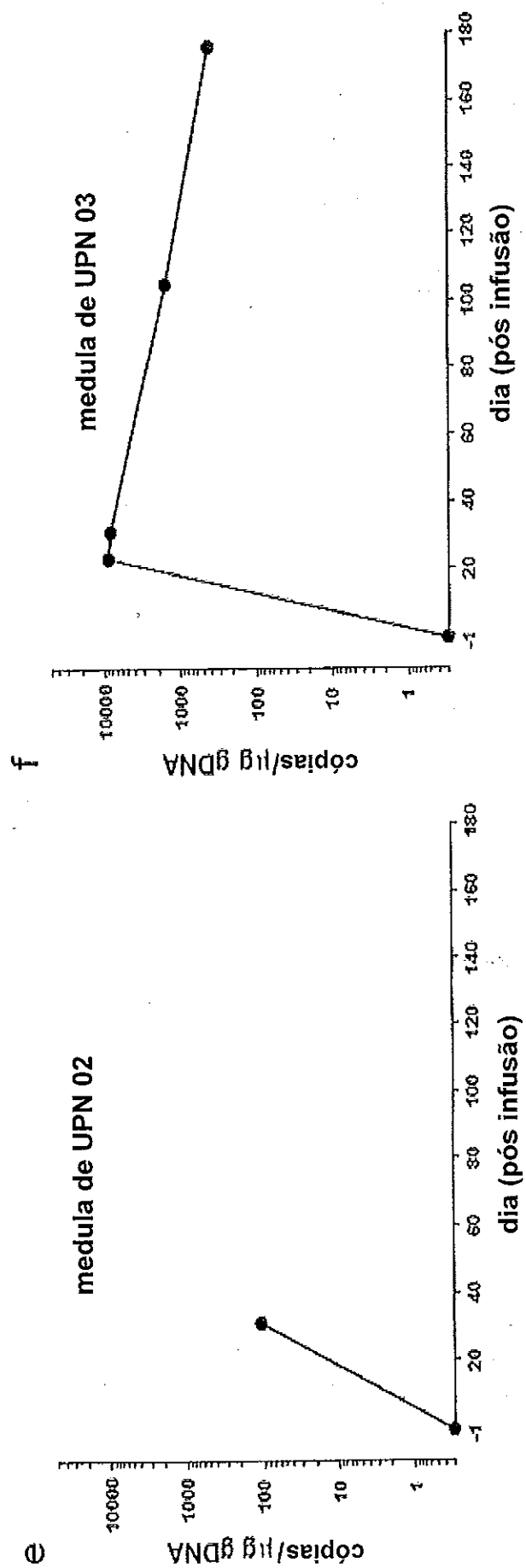
Figura 1C



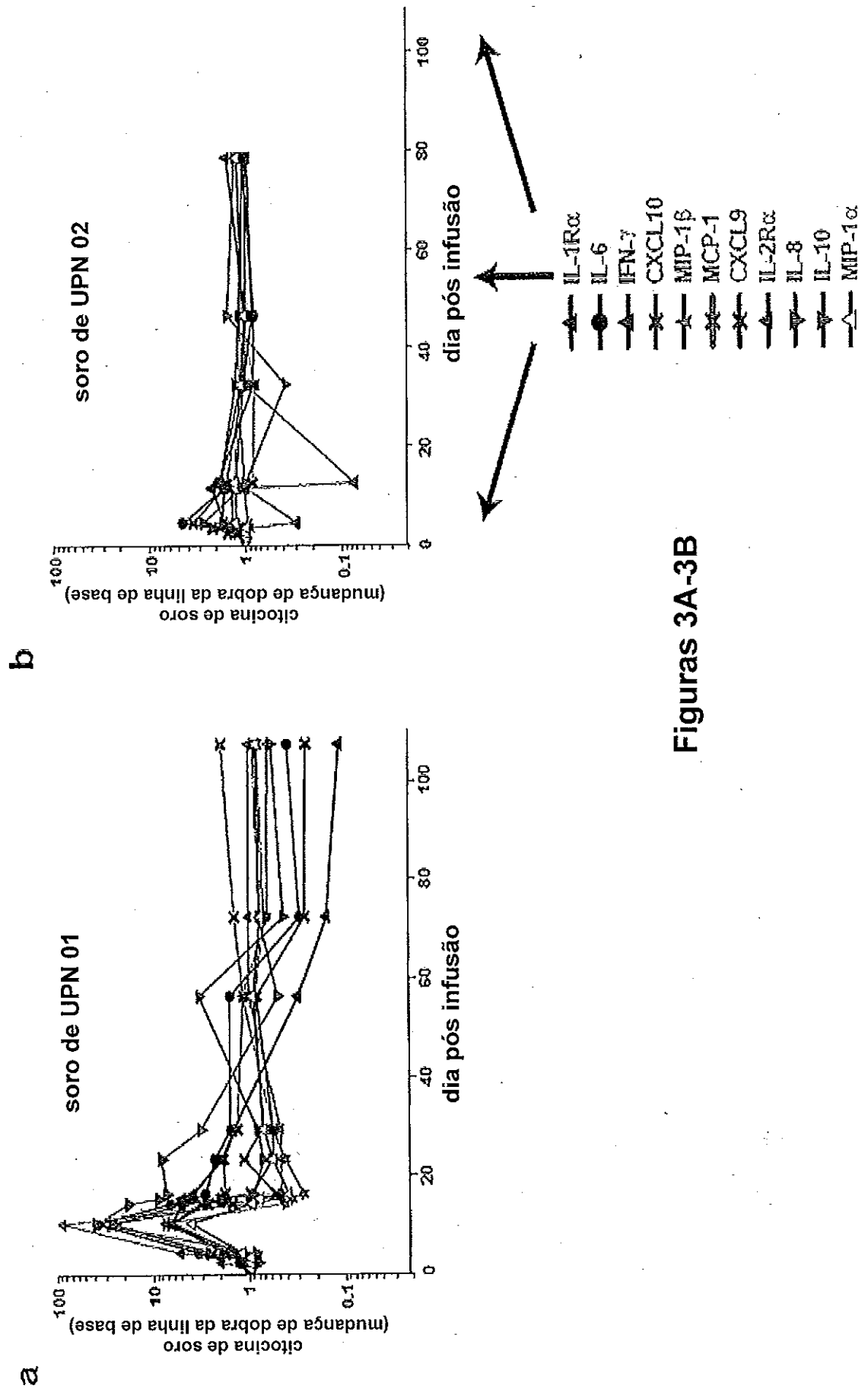
Figuras 2A-2B



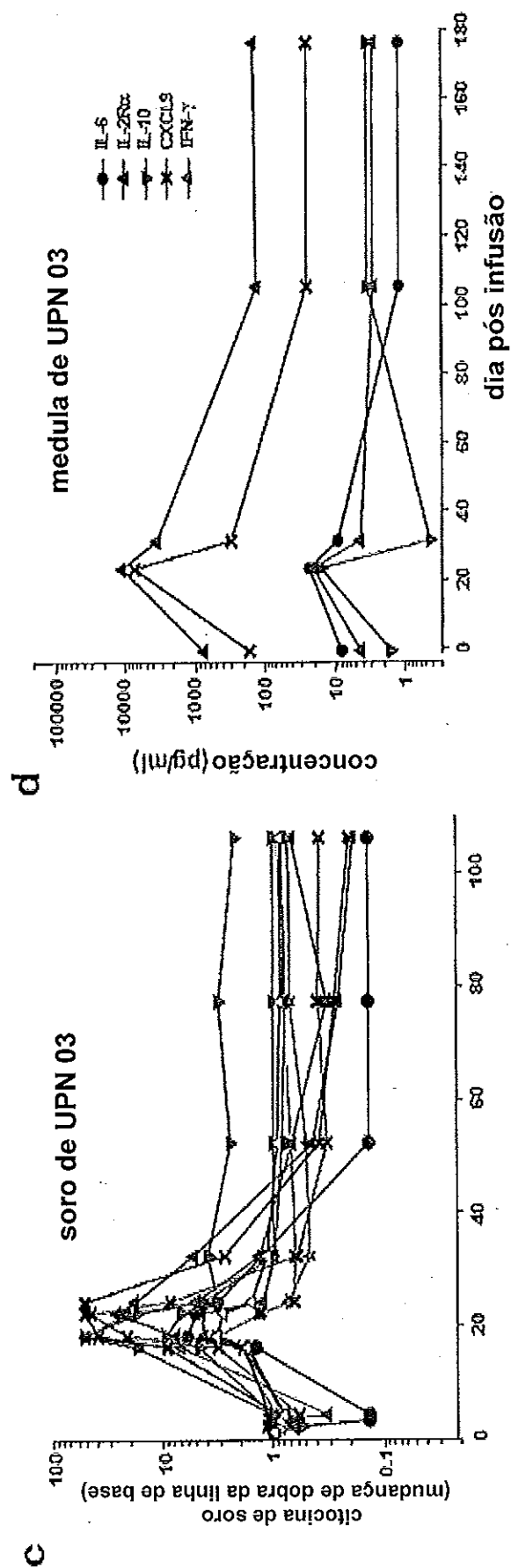
Figuras 2C-2D



Figuras 2E-2F

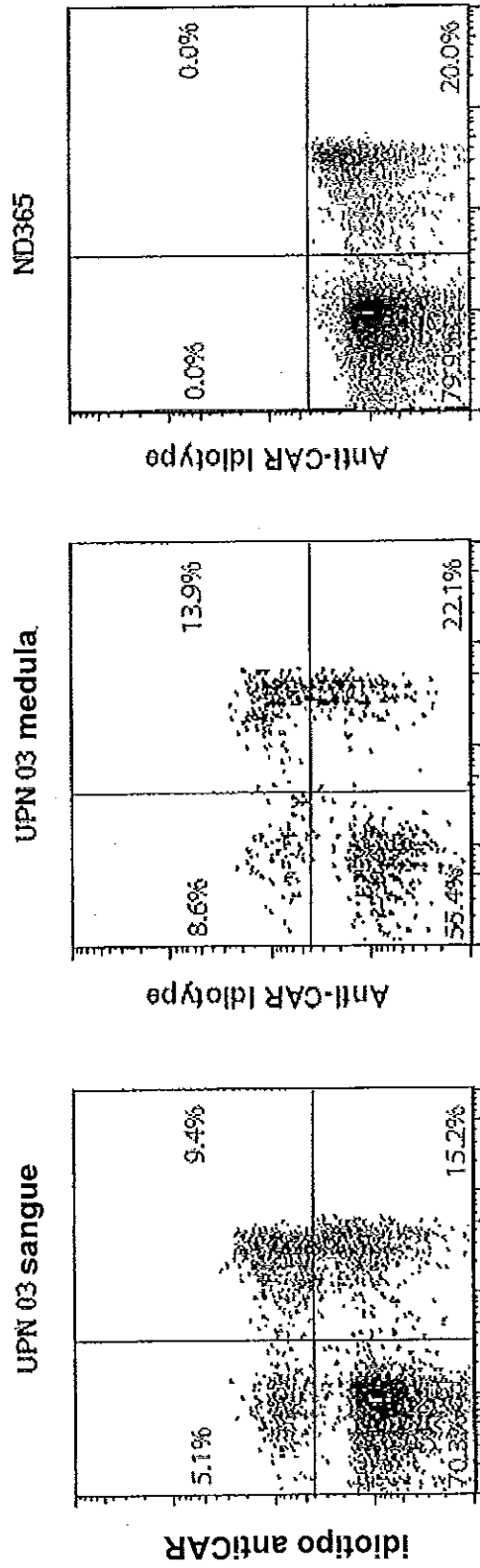


Figuras 3A-3B



Figuras 3C-3D

a Porta
CD3+



Porta
CD3-, CD14-

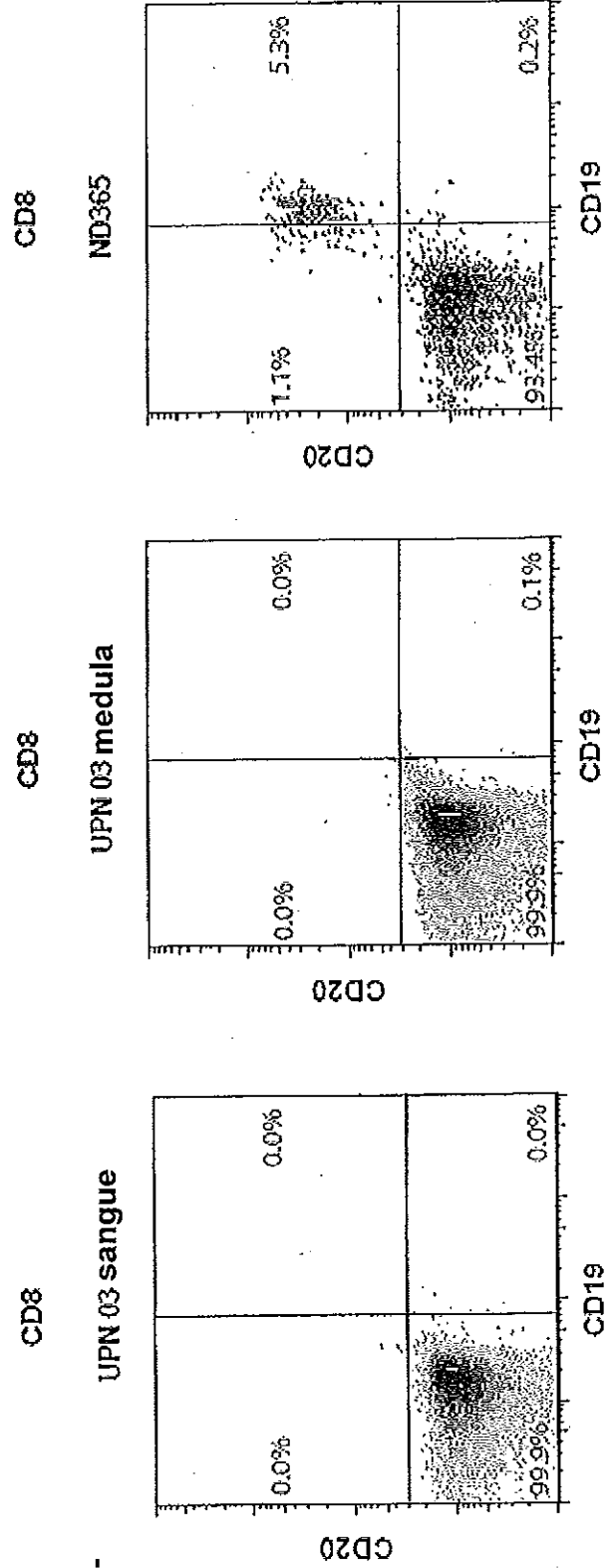


Figura 4A

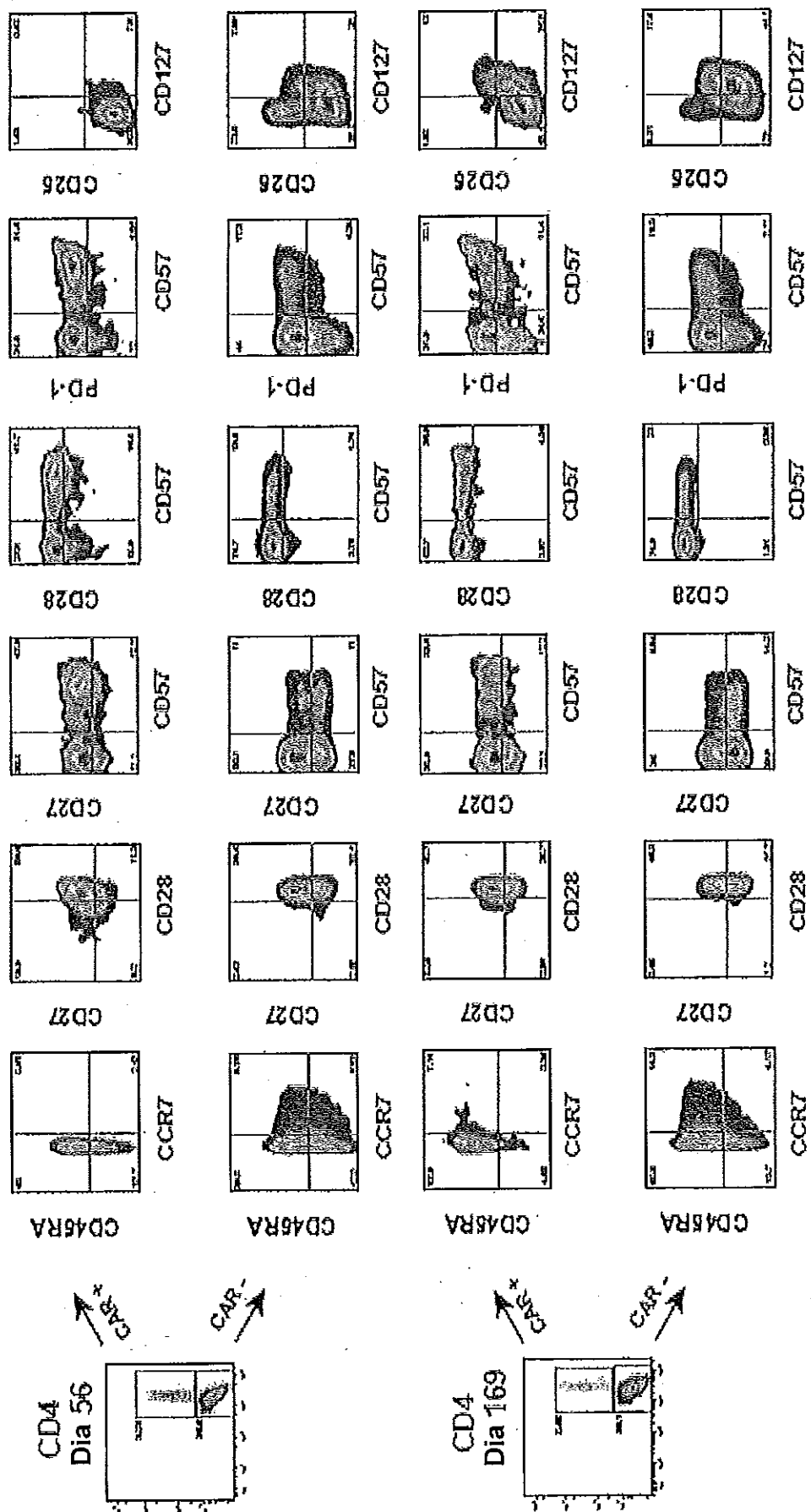


Figura 4B

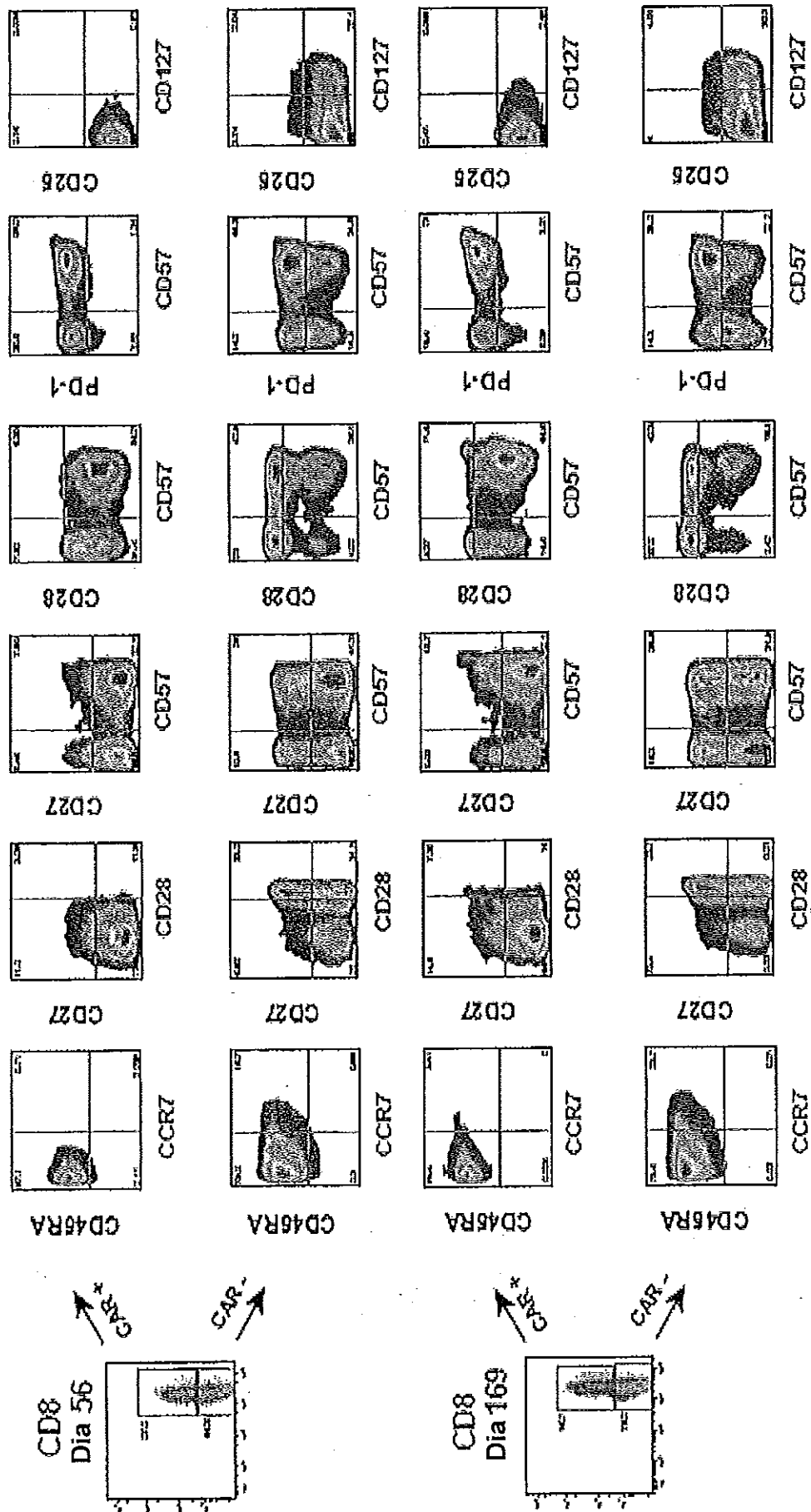


Figura 4C

d

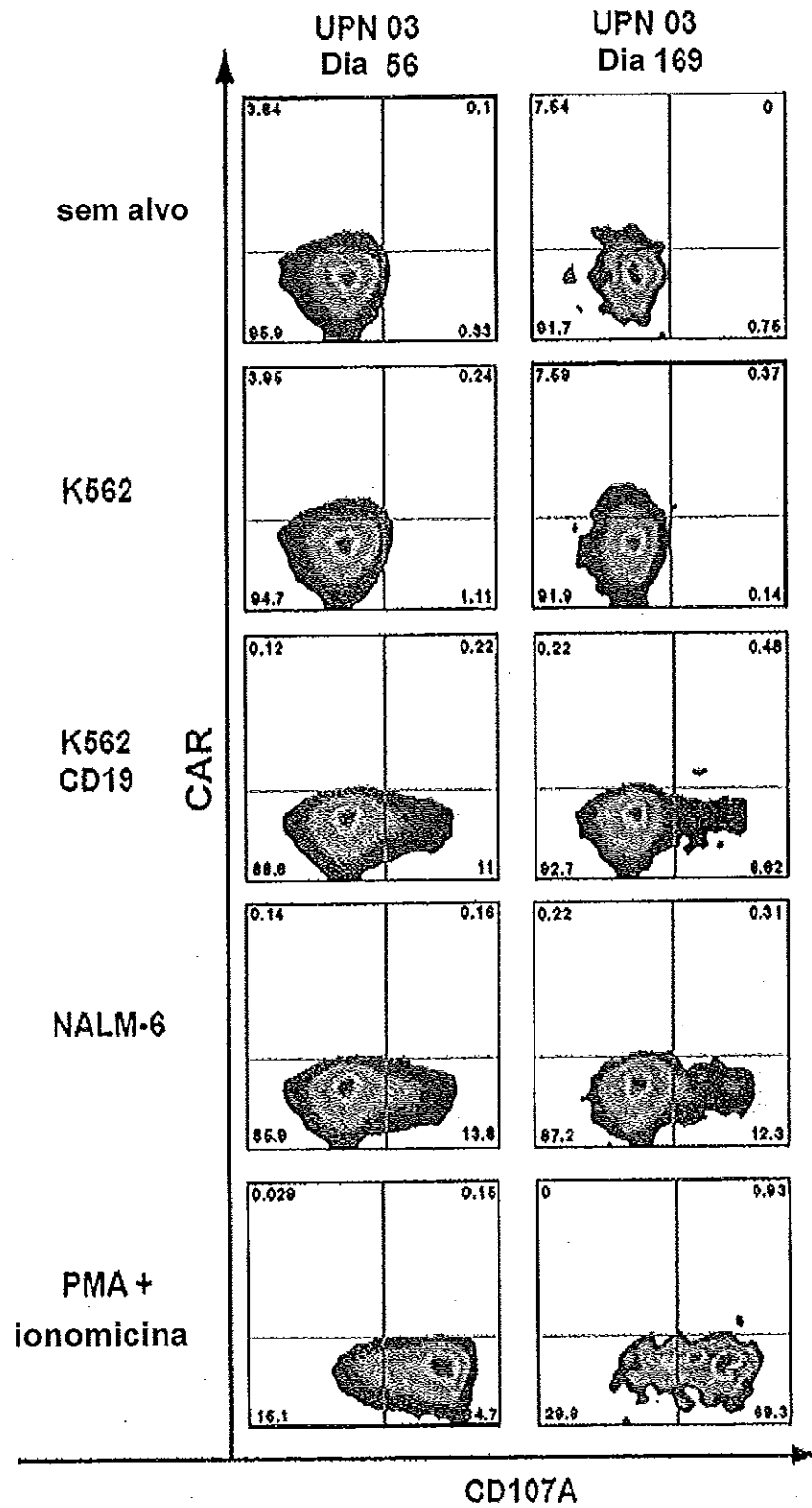


Figura 4D

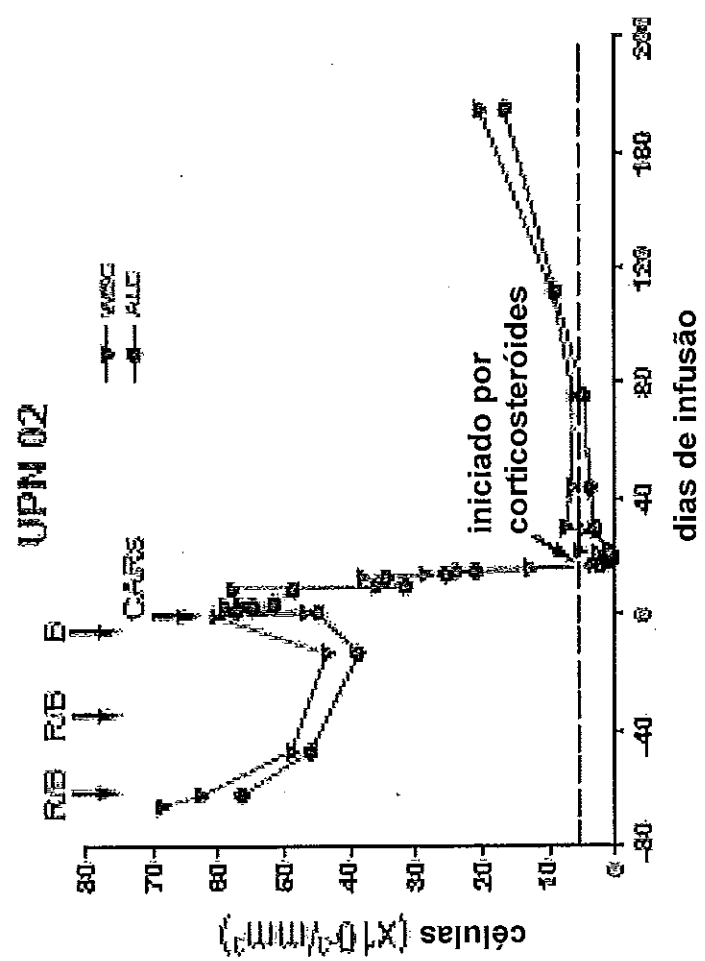
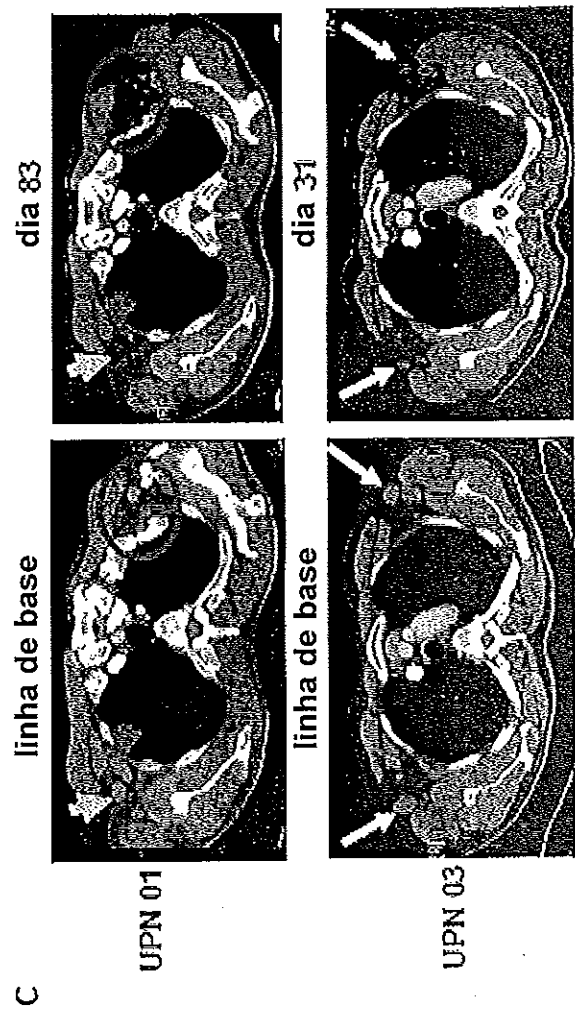
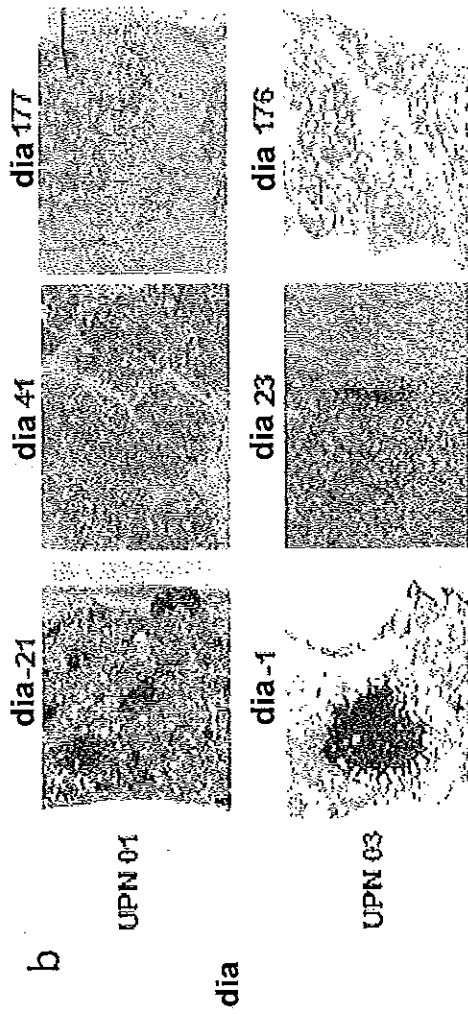


Figura 5A



Figuras 5B-5C

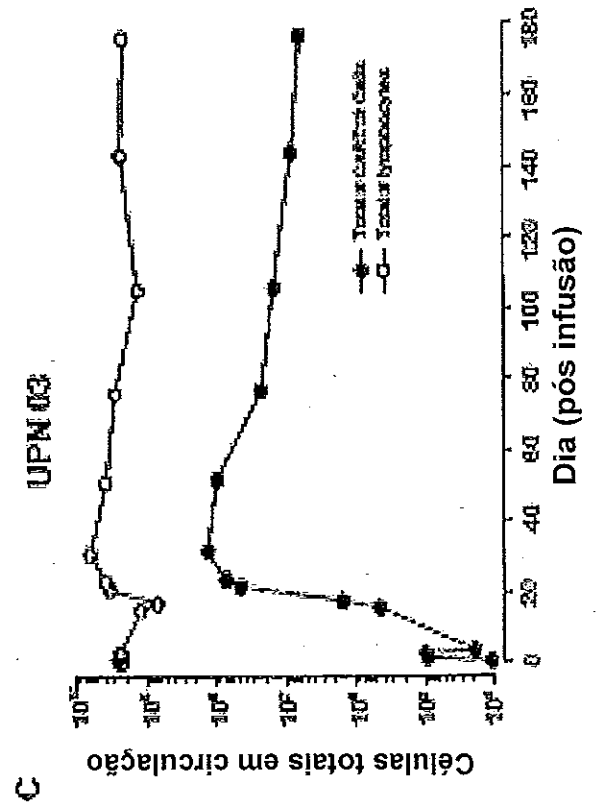
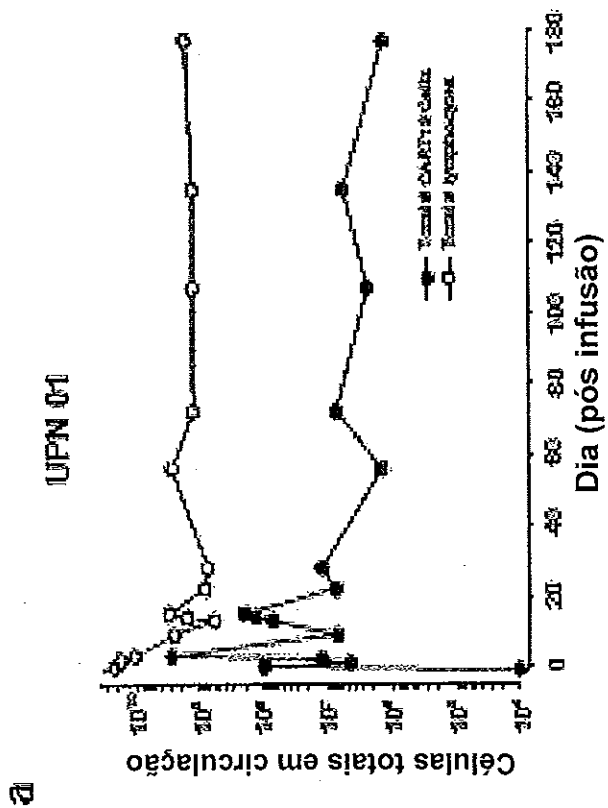
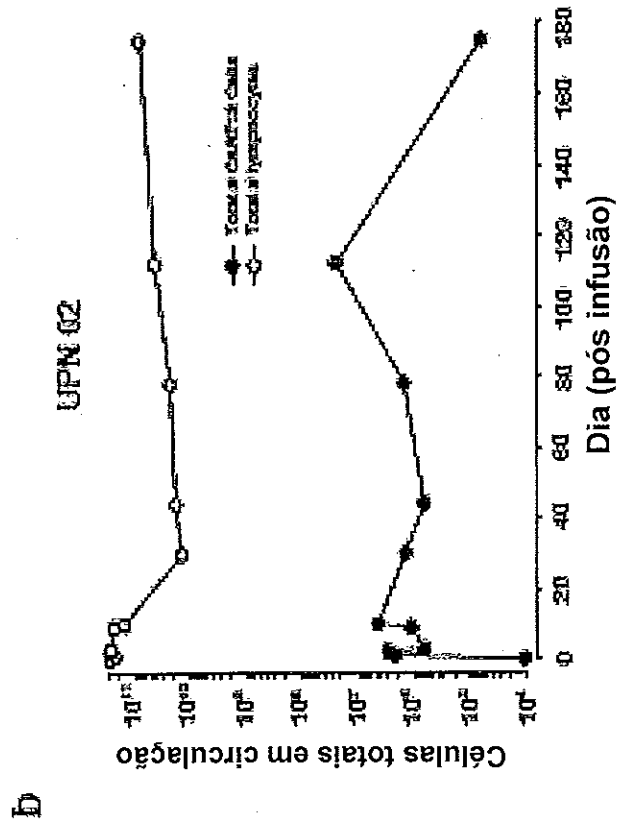


Figura 6

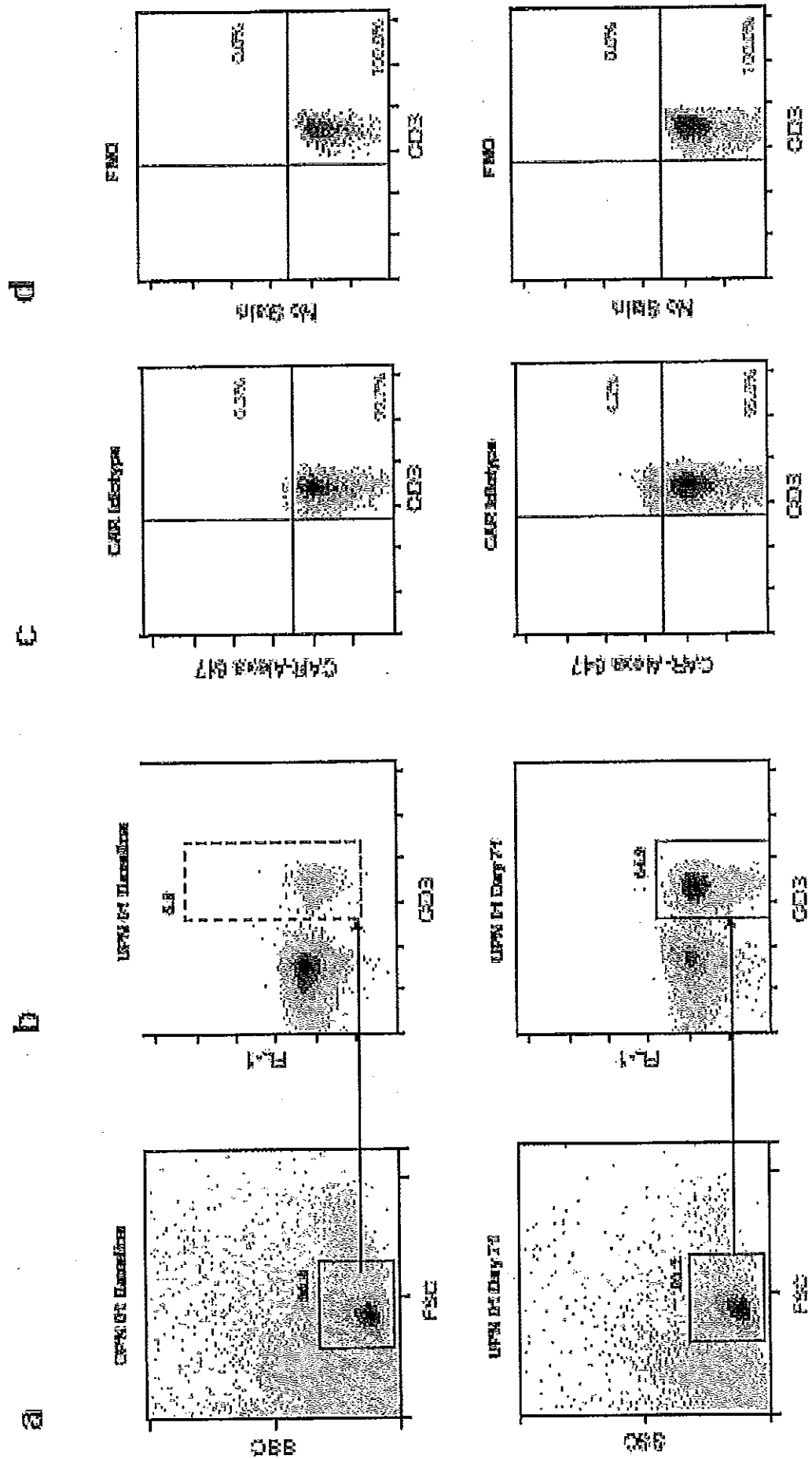


Figura 7

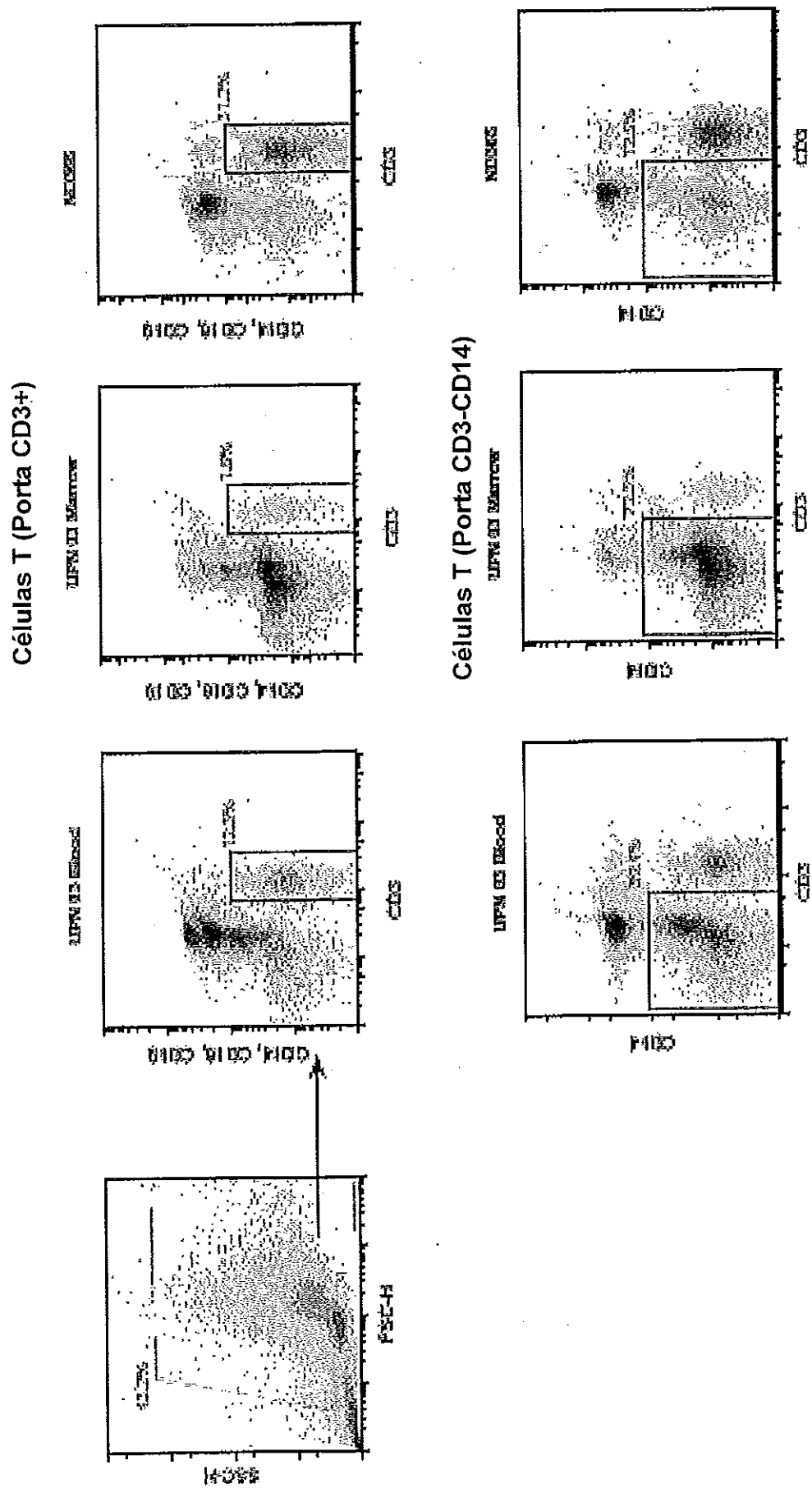


Figura 9

indivíduo UPN	idade/sexo cariótipo	terapias prévias	carga de tumor CLL na linha de base			dose total de CART19 (células/kg)	resposta D +30 (duração)
			medula óssea ³ (dia de estudo)	sangue ³ (dia de estudo)	nós/baço ³ (dia de estudo)		
01	65M normal	fludarabina x 4 ciclos (2002) rituximab/fludarabina x 4 ciclos (2005) Alemtuzumab x 12 wks (2006) Rituximab (2 cursos 2008-2009) R-CVP x 2 ciclos (2009) lenalidomida (2009) PCR x 2 ciclos (5/18-6/18/2010) Bendamustina x 1 ciclo (7/31-8/1/10) pre-CART19	hipercelular 70% CLL 2,4x10 ¹² células CLL (Dia - 14) 1,7x10 ¹² células CLL (Dia - 1)	N/A	6,2x10 ¹¹ - 1,0x10 ¹² células CLL (Dia - 37)	1,1x10 ⁸ (1,5x10 ⁷ /kg)	CR (8-meses)
02	77M del(17)(p13)	Alemtuzumab x 16 wks (6/2007) Alemtuzumab x 18 wks (3/2009) Bendamustina/Rituximab: 7/1/2010 (ciclo 1) 7/28/2010 (ciclo 2) 8/26/2010 (ciclo 3) pre-CART19	hipercelular >95% CLL 3,2x10 ¹² células CLL (Dia - 47)	2,75 x 10 ¹¹ células CLL (Dia - 1)	1,2x10 ¹² - 2,0x10 ¹² células CLL (Dia - 24)	5,8x10 ⁸ (1,0x10 ⁷ /kg)	PR (5-meses)
03	64M del(17)(p13)	R-Fludarabina x 2 ciclos (2002) R-Fludarabina x 4 ciclos (10/06-1/07) R-Bendamustina x 1 ciclo (2/09) Bendamustina x 3 ciclos (3-5/09) Alemtuzumab x 11 wks (12/09-3/10) Pentostatin/cyclophosphamide (9/10/10) pre-CART19	hipercelular 40% CLL 8,8x10 ¹¹ células CLL (Dia - 1)	N/A	3,3x10 ¹¹ - 5,5x10 ¹¹ células CLL (Dia - 24)	1,4x10 ⁷ (1,48x10 ⁶ /kg)	CR (7-meses)

1. cariótipo UPN 02 (nomenclatura ISCN): 45,XY,del(1)(q25),+del(1)(p13),t(2;20)(p13;q11.2),t(3;5)(p13;q35),add(9)(p22),2del(13)(q14q34),-14,del(17)(p13)[cp24]

2. cariótipo UPN 03 (nomenclatura ISCN): 46,XY,del(17)(p12)[18]/44-46,idem,der(17)t(17;21)(p11.2;q11.2)[cp4]/40-45,XY,-17[cp3]

3. ver materiais complementares para métodos de determinação de carga tumoral.

Figura 10

Processo de fabricação de CART19

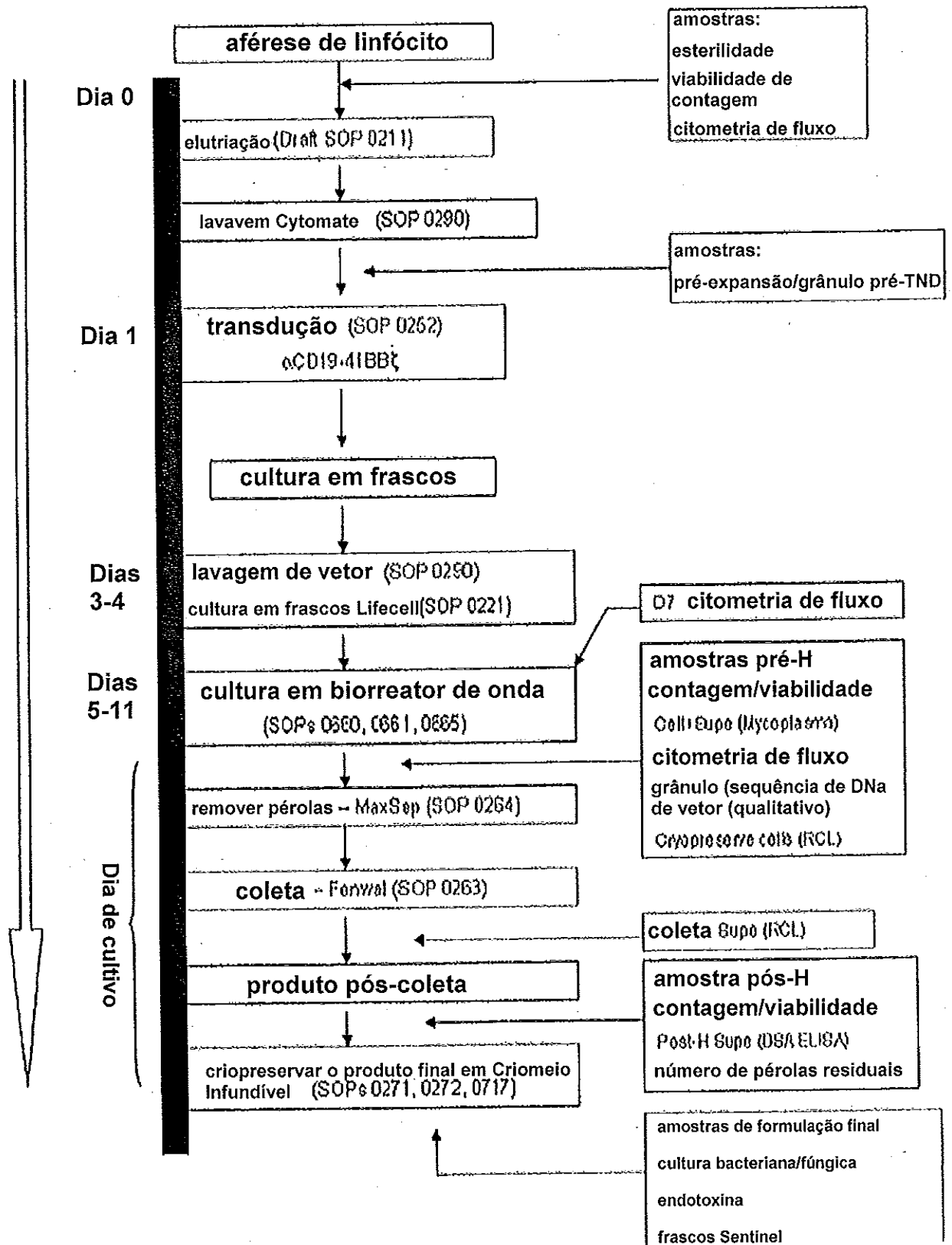
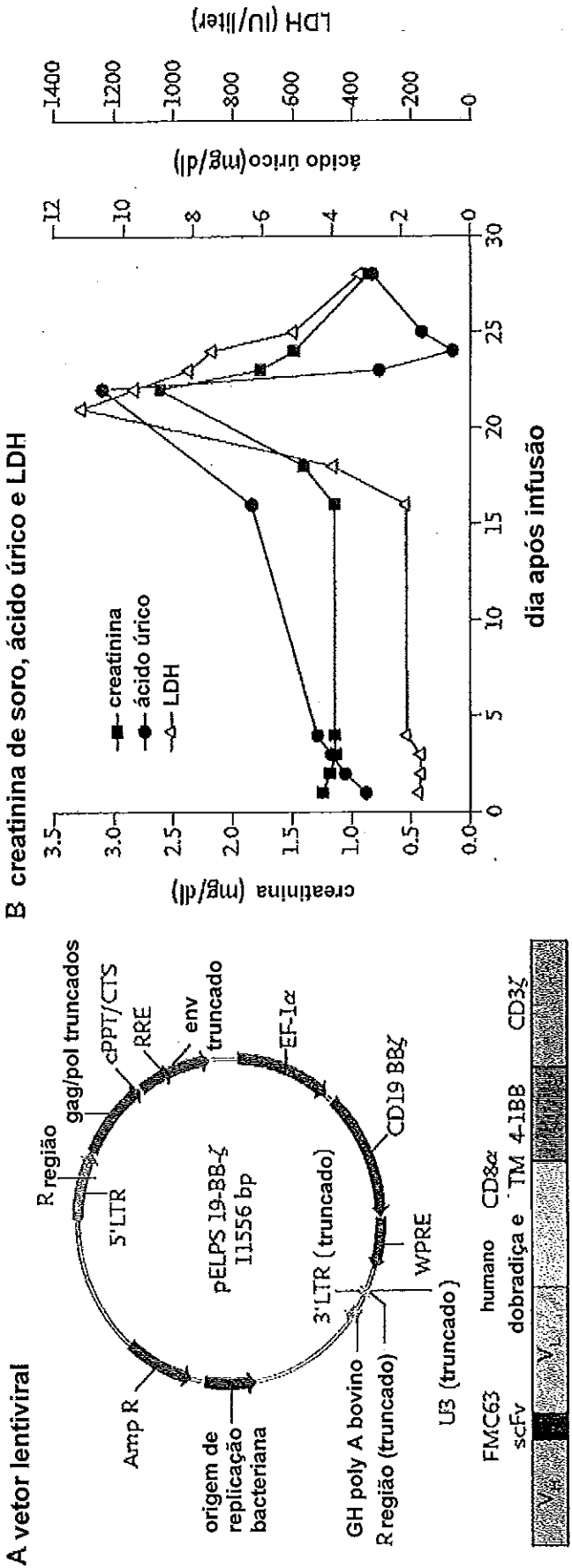
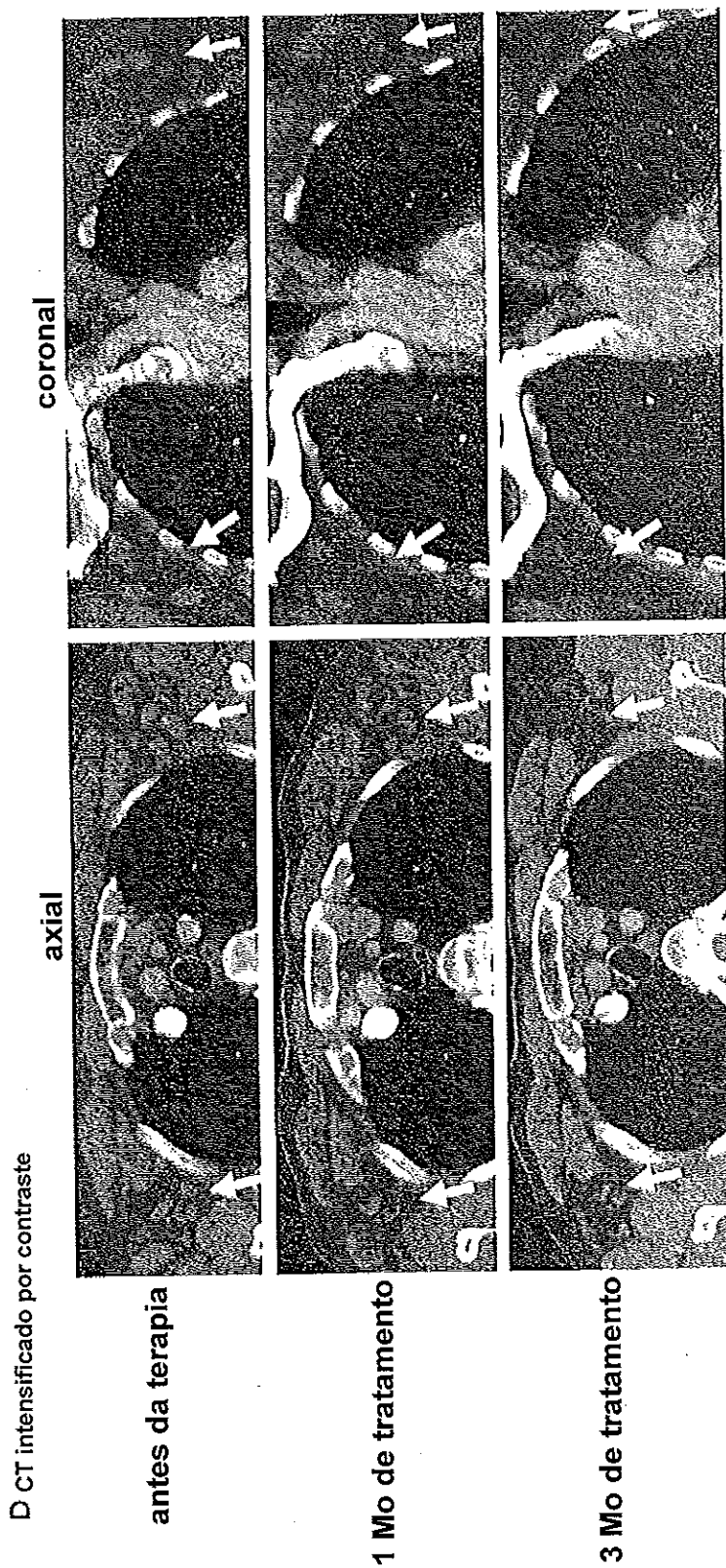
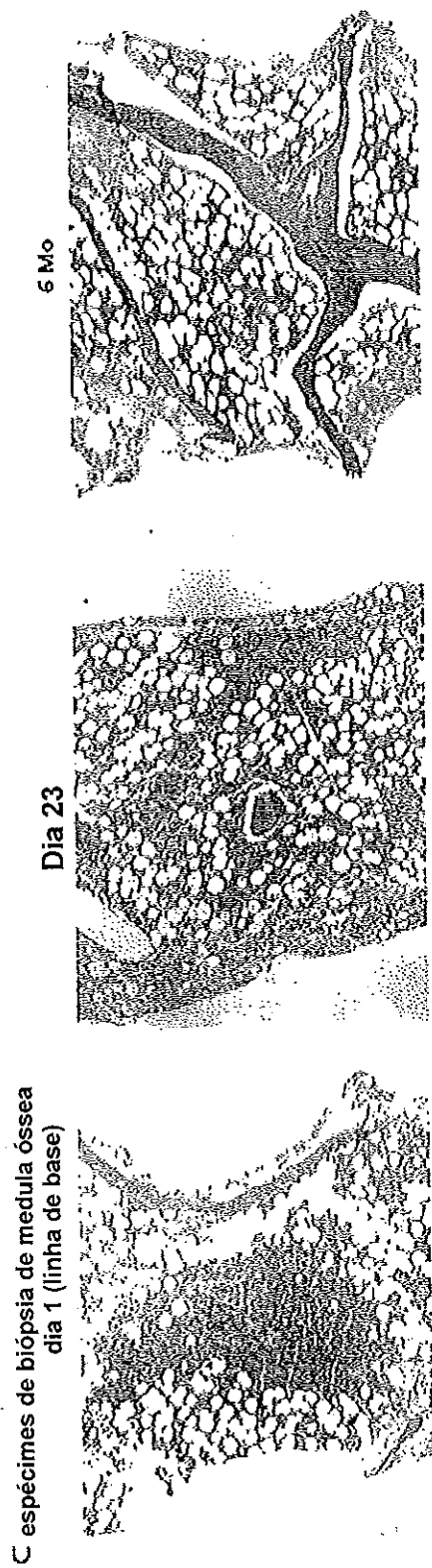


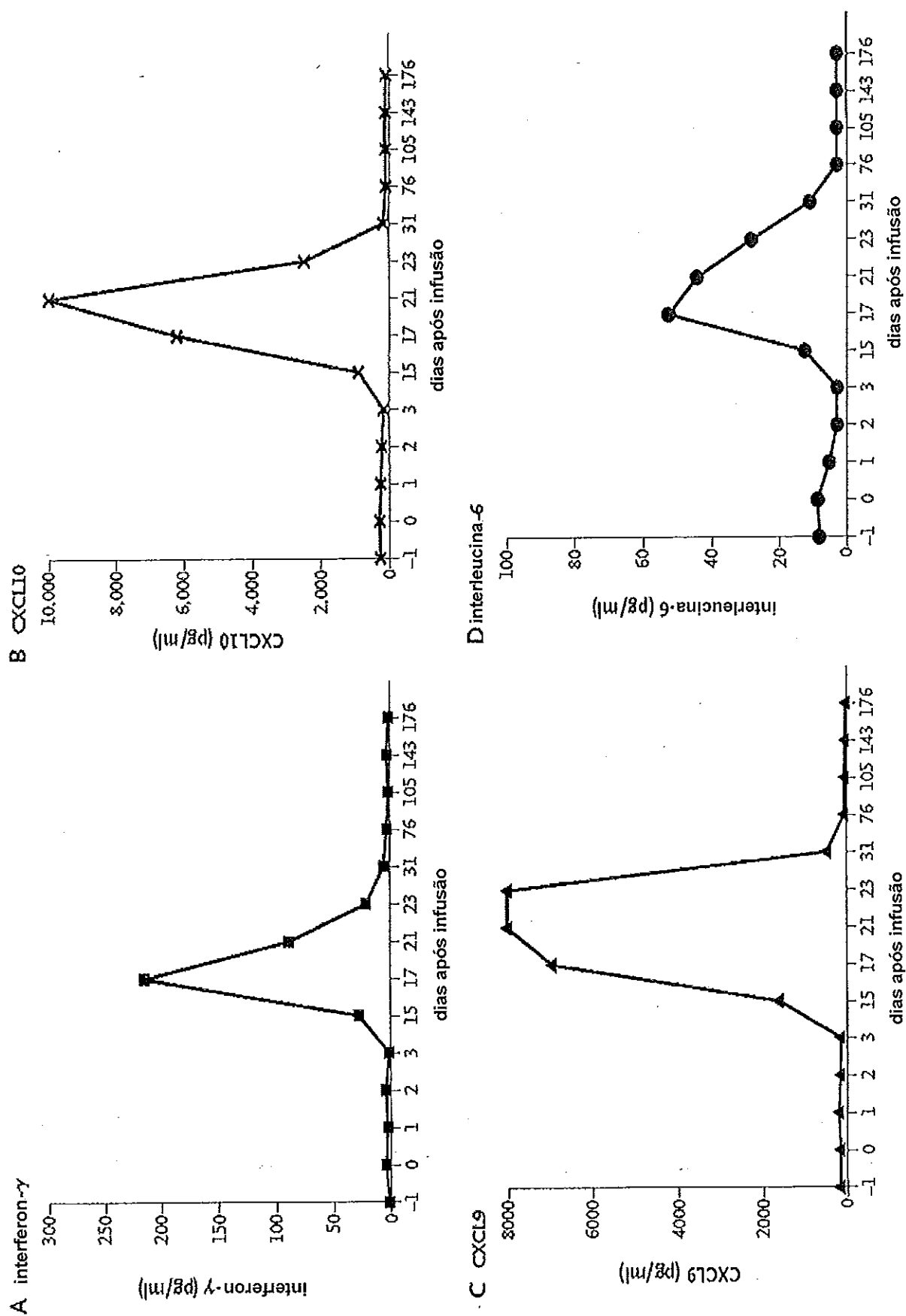
Figura 11



Figuras 12A-12B



Figuras 12C-12D



Figuras 13A-13D

E resposta imune em medula óssea

1 dia após infusão 23 dias após infusão 31 dias após infusão 105 dias após infusão 176 dias após infusão

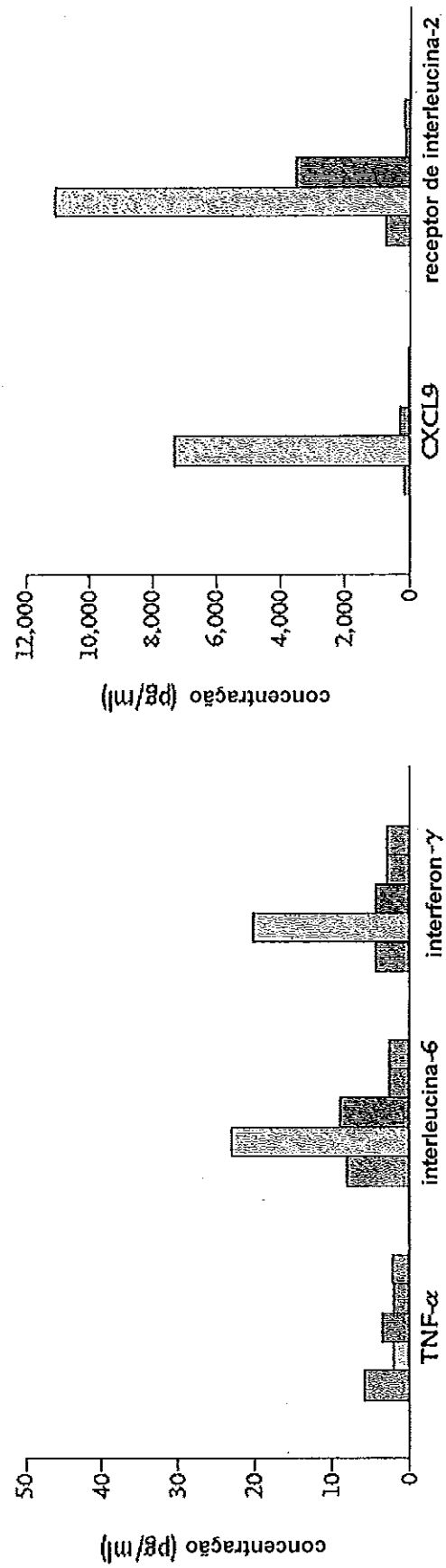
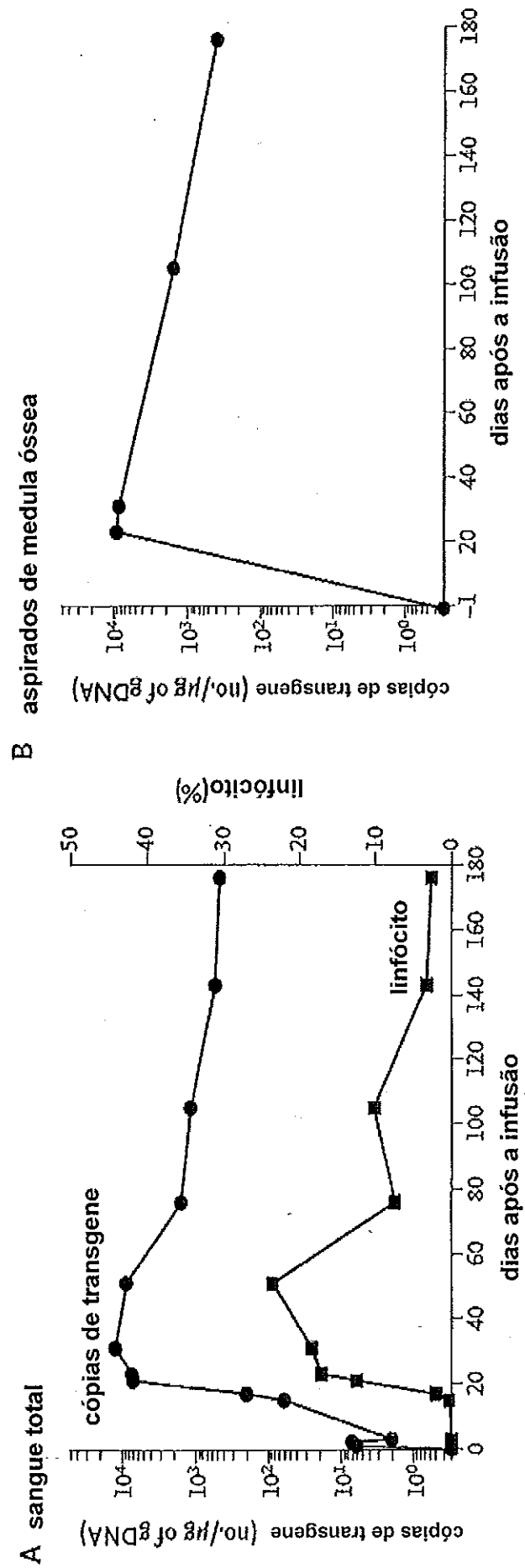


Figura 13E



Figuras 14A-14B

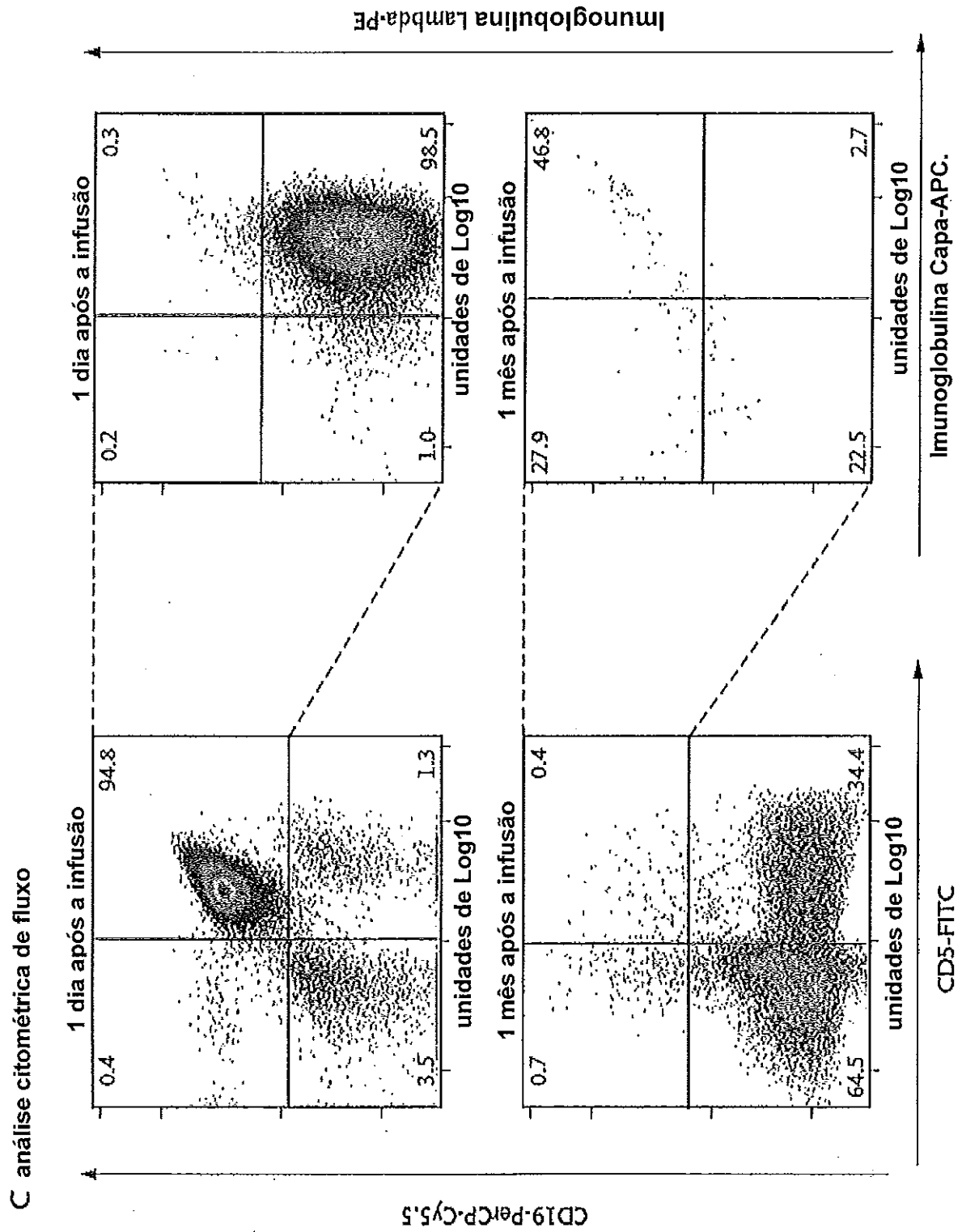


Figura 14C