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

(21) BR 112020015884-4 A2

(22) Data do Depósito: 17/01/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 08/12/2020

(54) Título: RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICO (CARS) ESPECÍFICOS DE FLUORESCEÍNA EXIBINDO A FUNÇÃO DE CÉLULA T ÓTIMA CONTRA OS TUMORES MARCADOS POR FL-PLE

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; C07K 16/30; A61K 39/395; A61P 35/00; C09K 11/00.

(30) Prioridade Unionista: 06/02/2018 US 62/627,147.

(71) Depositante(es): SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL (DBA SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE).

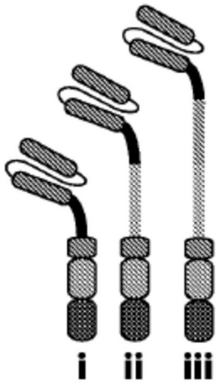
(72) Inventor(es): MICHAEL C. JENSEN; JAMES F. MATTHAEI.

(86) Pedido PCT: PCT US2019014054 de 17/01/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/156795 de 15/08/2019

(85) Data da Fase Nacional: 04/08/2020

(57) Resumo: Os aspectos aqui descritos se referem a receptores de antígeno quiméricos (CARs) manipulados e suas composições com especificidade e afinidade para ligantes contendo fluoresceína apresentados na superfície das células tumorais. Também são aqui fornecidas composições incluindo CARs, compreendendo adicionalmente um braço espaçador e métodos para fabricar e usar essas composições.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **"RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICO (CARS) ESPECÍFICOS DE FLUORESCEÍNA EXIBINDO A FUNÇÃO DE CÉLULA T ÓTIMA CONTRA OS TUMORES MARCADOS POR FL-PLE"**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica prioridade para U.S. Prov. No. 62/627,147, depositado em 6 de fevereiro de 2018 intitulado "FLUORESCEIN-SPECIFIC CARS EXHIBITING OPTIMAL T CELL FUNCTION AGAINST FL-PLE LABELLED TUMORS", que é aqui expressamente incorporado por referência em sua totalidade

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] O presente pedido está sendo depositado em conjunto com uma Listagem de Sequências em formato eletrônico. A Listagem de Sequências é fornecida como um arquivo intitulado SCRI163WOSEQLIST, criado em 17 de janeiro de 2019, que tem aproximadamente 42 Kb de tamanho. A informação no formato eletrônico da Listagem de Sequências é aqui expressamente incorporada por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] As alternativas aqui descritas se referem a receptores de antígeno quiméricos (CARs) manipulados e suas composições tendo especificidade e afinidade para ligantes contendo fluoresceína apresentados na superfície das células tumorais. Assim, são fornecidos aqui composições e métodos

para fabricar e usar essas composições.

FUNDAMENTOS

[004] A transferência adotiva de linfócitos T humanos que são manipulados por transferência genética para expressar receptores de antígenos quiméricos (CARs) específicos para moléculas de superfície expressas em células tumorais tem o potencial de tratar eficazmente o câncer. Receptores quiméricos são receptores sintéticos que incluem um domínio extracelular de ligação ao ligante, mais comumente um fragmento variável de cadeia simples de um anticorpo monoclonal (scFv) ligado a componentes de sinalização intracelular, mais comumente o CD3ζ sozinho ou combinado com um ou mais domínios coestimuladores. Grande parte da pesquisa no projeto de receptores de antígenos quiméricos focalizou na definição de scFvs e outros elementos de ligação ao ligante que visam células malignas sem causar séria toxicidade aos tecidos normais essenciais e na definição da composição ótima de módulos de sinalização intracelular para ativar as funções efetoras de células T. Permanece uma necessidade de uma terapia mediada por célula T CAR que seja seletiva para alvos específicos e que minimize os efeitos colaterais adversos.

SUMÁRIO

[005] Em um primeiro aspecto, um complexo é fornecido, em que o complexo compreende um receptor de antígeno

quimérico (CAR) ou um receptor de células T (TCR), em que o CAR ou TCR é unido a um lipídio, em que o lipídio compreende uma fração alvo e o CAR é unido ao referido lipídio através de uma interação com a referida fração alvo, e em que o CAR ou TCR compreende um domínio espaçador tendo um comprimento espaçador de 1 a 22 aminoácidos, 23 a 50 aminoácidos, 51 a 100 aminoácidos, 100 a 150 aminoácidos ou 151 a 250 aminoácidos ou um comprimento espaçador que está dentro de uma faixa definida por quaisquer dois dos comprimentos mencionados acima. Em algumas alternativas, o CAR ou TCR compreende uma sequência como apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-6. Em algumas alternativas, o domínio espaçador é uma dobradiça de IgG4 conectada a um domínio CH2 a um domínio CH3. Em algumas dessas modalidades, o domínio espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 7. Em algumas alternativas, o domínio espaçador é uma dobradiça de IgG4 conectada a um domínio CH3. Em algumas dessas modalidades, o domínio espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8. Em algumas alternativas, o domínio espaçador é apenas uma dobradiça de lgG4. Em algumas dessas modalidades, o domínio espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9. Algumas modalidades incluem ácidos nucleicos que codificam qualquer uma das SEQ ID NO: 1-9, que podem estar presentes em um vetor e/ou introduzidos em uma célula (por exemplo,

uma célula T). Em algumas alternativas, o espaçador compreende um comprimento de 229 aminoácidos. Em algumas alternativas, o lipídio compreende um grupo de cabeça polar e um grupo hidrofóbico. Em algumas alternativas, a cabeça polar compreende um grupo colina, fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfoetanolamina, um resíduo de oligossacarídeo, um resíduo de açúcar, fosfatidilserina ou fosfatidilinositol. Em algumas alternativas, o grupo de cabeça polar compreende fosfocolina, uma fração de piperidina ou uma fração trimetilarseno-etil-fosfato. Em algumas alternativas, o grupo hidrofóbico é ácido graxo, tal como uma cadeia alifática. Em algumas alternativas, o ácido graxo é saturado ou insaturado. Em algumas alternativas, o grupo hidrofóbico compreende um grupo alquila, alquenila ou alquinila. Em algumas alternativas, o grupo hidrofóbico compreende um lipídio terpenoide, tal como um esteroide ou colesterol. Em algumas alternativas, o grupo hidrofóbico compreende uma ligação éter, em que a ligação éter está entre o grupo de cabeça polar e a cadeia alifática. Em algumas alternativas, o resíduo de açúcar é um glicerol. Em algumas alternativas, o grupo hidrofóbico compreende uma cadeia alquila de carbono, em que a cadeia alquila de carbono compreende 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 carbonos ou qualquer número que está dentro de um intervalo definido por quaisquer dois valores mencionados acima. Em

algumas alternativas, a cadeia alquila de carbono compreende 18 carbonos. Em algumas alternativas, o lipídio é um éter fosfolipídico. Em algumas alternativas, a fração alvo é biotina, digoxigenina, dinitrofenol ou fluoresceína. Em algumas alternativas, o espaçador compreende um espaçador PEG, um espaçador Hapteno (2x) ou uma cadeia de alcano. Em algumas alternativas, o espaçador PEG compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 moléculas de PEG, ou qualquer quantidade de moléculas de PEG que estão dentro de um intervalo definido por quaisquer dois valores mencionados acima. Em algumas alternativas, o CAR ou TCR é expresso por uma célula ou uma célula T. Em algumas alternativas, o CAR ou TCR está na superfície de uma célula ou de uma célula T. Em algumas alternativas, a célula é uma célula T precursora. Em algumas alternativas, a célula T precursora é uma célula-tronco hematopoiética. Em algumas alternativas, a célula é uma célula linfocitária citotóxica T CD8+ selecionada do grupo que consiste em células T CD8+ ingênuas, células T CD8+ de memória central, células T CD8+ de memória efetora e células T CD8+ em massa. Em algumas alternativas, a célula é uma célula linfocitária auxiliar T CD4+ selecionada do grupo que consiste em células T CD4+ ingênuas, células T CD4 de memória central, células T CD4+ de memória efetora e células T CD4+ em massa. Em algumas alternativas, o lipídio é intercalado em uma bicamada

lipídica de uma célula alvo. Em algumas alternativas, a célula alvo é uma célula tumoral. Em algumas alternativas, a célula alvo é uma célula imune. Em algumas alternativas, a célula imune é uma célula T ou uma célula B. Em algumas alternativas, a célula alvo está presente em um microambiente tumoral.

[006] Em um segundo aspecto, uma célula compreendendo um complexo de qualquer uma das alternativas aqui é fornecido, a célula compreendendo um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de células T (TCR), em que o CAR ou TCR é ligado a ou é configurado para se ligar a um lipídio, em que o lipídio compreende uma fração alvo e a célula compreendendo o CAR é ligada à fração alvo do lipídio, e em que o CAR ou TCR compreende um domínio espaçador. Em algumas alternativas, o complexo compreende um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou um receptor de células T (TCR), em que o CAR ou TCR é unido a ou é configurado para ser unido a um lipídio, em que o lipídio compreende uma fração alvo e o CAR é unido a ou configurado para ser unido ao referido lipídio através de uma interação com a referida fração alvo, e em que o CAR ou TCR compreende um domínio espaçador tendo um comprimento espaçador de 1 a 22 aminoácidos, 23 a 50 aminoácidos, 51 a 100 aminoácidos, 100 a 150 aminoácidos ou 151 a 250 aminoácidos ou um comprimento espaçador que está dentro de uma faixa definida por quaisquer dois dos

comprimentos mencionados acima. Em algumas alternativas, o CAR ou TCR compreende uma sequência como apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-6. Em algumas alternativas, o domínio espaçador é uma dobradiça de lgG4 conectada a um domínio CH2 a um domínio CH3. Em algumas dessas modalidades, o domínio espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 7. Em algumas alternativas, o domínio espaçador é uma dobradiça de lgG4 conectada a um domínio CH3. Em algumas dessas modalidades, o domínio espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8. Em algumas alternativas, o domínio espaçador é apenas uma dobradiça de lgG4. Em algumas dessas modalidades, o domínio espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9. Em algumas alternativas, a célula compreende um ácido nucleico que codifica qualquer uma das SEQ ID NO: 1-9). Em algumas alternativas, o espaçador compreende um comprimento de 229 aminoácidos. Em algumas alternativas, o lipídio compreende um grupo de cabeça polar e um grupo hidrofóbico. Em algumas alternativas, a cabeça polar compreende um grupo colina, fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfoetanolamina, um resíduo de oligossacarídeo, um resíduo de açúcar, fosfatidilserina ou fosfatidilinositol. Em algumas alternativas, o grupo de cabeça polar compreende fosfocolina, uma fração piperidina ou uma fração trimetilarseno-etil-fosfato. Em algumas alternativas, o

grupo hidrofóbico é ácido graxo, tal como uma cadeia alifática. Em algumas alternativas, o ácido graxo é saturado ou insaturado. Em algumas alternativas, o grupo hidrofóbico compreende um grupo alquila, alquenila ou alquinila. Em algumas alternativas, o grupo hidrofóbico compreende um lipídio terpenoide, tal como um esteroide ou colesterol. Em algumas alternativas, o grupo hidrofóbico compreende uma ligação éter, em que a ligação éter está entre o grupo de cabeça polar e a cadeia alifática. Em algumas alternativas, o resíduo de açúcar é um glicerol ou álcool de açúcar. Em algumas alternativas, o grupo hidrofóbico compreende cadeia alquila de carbono, em que a cadeia alquila de carbono compreende 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 carbonos ou qualquer número que está dentro de um intervalo definido por quaisquer dois valores mencionados acima. Em algumas alternativas, a cadeia alquila de carbono compreende 18 carbonos. Em algumas alternativas, o lipídio é um éter fosfolipídico. Em algumas alternativas, a fração alvo é biotina, digoxigenina, dinitrofenol ou fluoresceína. Em algumas alternativas, o espaçador compreende um espaçador PEG, um espaçador Hapteno (2X) ou uma cadeia de alcano. Em algumas alternativas, o espaçador PEG compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 moléculas de PEG, ou qualquer quantidade de moléculas de PEG que está dentro de uma faixa definida por quaisquer dois valores

mencionados acima. Em algumas alternativas, o CAR ou TCR é expresso por uma célula ou célula T. Em algumas alternativas, o CAR ou TCR está na superfície de uma célula ou de uma célula T. Em algumas alternativas, a célula é uma célula T precursora. Em algumas alternativas, a célula T precursora é uma célula-tronco hematopoiética. Em algumas alternativas, a célula é uma célula linfocitária citotóxica T CD8+ selecionada do grupo que consiste em células T CD8+ ingênuas, células T CD8+ de memória central, células T CD8+ de memória efetora e células T CD8+ em massa. Em algumas alternativas, a célula é uma célula linfocitária auxiliar T CD4+ selecionada do grupo que consiste em células T CD4+ ingênuas, células T CD4 de memória central, células T CD4+ de memória efetora e células T CD4+ em massa. Em algumas alternativas, o lipídio é intercalado em uma bicamada lipídica de uma célula alvo. Em algumas alternativas, a célula alvo é uma célula tumoral. Em algumas alternativas, a célula alvo é uma célula imune. Em algumas alternativas, a célula imune é uma célula T ou uma célula B. Em algumas alternativas, a célula alvo está presente em um microambiente tumoral. Em algumas alternativas, a célula é uma célula T precursora. Em algumas alternativas, a célula T precursora é uma célula-tronco hematopoiética. Em algumas alternativas, a célula é uma célula linfocitária citotóxica T CD8+ selecionada do grupo que consiste em células T CD8+ ingênuas, células T CD8+ de

memória central, células T CD8+ de memória efetora e células T CD8+ em massa. Em algumas alternativas, a célula é uma célula linfocitária auxiliar T CD4+ selecionada do grupo que consiste em células T CD4+ ingênuas, células T CD4+ de memória central, células T CD4+ de memória efetora e células T CD4+ em massa. Em algumas alternativas, o lipídio é intercalado em uma bicamada lipídica de uma célula alvo. Em algumas alternativas, a célula alvo é uma célula tumoral. Em algumas alternativas, a célula alvo é uma célula imune. Em algumas alternativas, a célula imune é uma célula T ou uma célula B. Em algumas alternativas, a célula alvo está presente em um microambiente tumoral.

[007] Em um terceiro aspecto, é fornecido um método para tratar, melhorar ou inibir um câncer em um indivíduo, o método compreende a) introduzir, fornecer ou administrar a um indivíduo uma composição que compreende um lipídio, que compreende uma fração alvo que está ligada a uma fração de mascaramento, b) introduzir, fornecer ou administrar ao referido indivíduo uma célula compreendendo um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de células T (TCR), que é específico para a fração alvo uma vez que a fração de mascaramento é removida da fração alvo, e em que o CAR ou TCR compreende um domínio espaçador, c) remover a fração de mascaramento da fração alvo, permitindo assim que a fração alvo se ligue ao CAR presente na célula, e, d) opcionalmente,

medir ou avaliar a ligação da célula compreendendo o CAR ao lipídio, após as etapas a - c e/ou e) opcionalmente, medir ou avaliar o tratamento, melhoria ou inibição do referido câncer após as etapas a – d, e/ou f) e opcionalmente, identificar um indivíduo necessitado de uma terapia para câncer antes das etapas a – c. Em algumas alternativas, o complexo ou a célula é fornecido ao indivíduo ao mesmo tempo que a composição ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 24, 36 ou 48 horas antes ou depois da administração da composição, ou a qualquer momento dentro de uma intervalo definido por quaisquer dois valores mencionados acima. Em algumas alternativas, a célula é fornecida ao indivíduo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 24, 36 ou 48 horas antes da administração da composição, ou a qualquer momento dentro de um intervalo definido por quaisquer dois valores mencionados acima. Em algumas alternativas, a célula é fornecida ao indivíduo dentro de segundos ou minutos, tal como menos de uma hora, para fornecer a composição ao indivíduo. Em algumas alternativas, um impulso da célula e/ou da composição é fornecido ao indivíduo. Em algumas alternativas, uma terapia adicional ao câncer é fornecida, tal como uma pequena molécula, por exemplo, um composto químico, uma terapia de anticorpo, por exemplo, um anticorpo monoclonal humanizado com ou sem conjugação a um radionuclídeo, toxina ou fármaco, cirurgia e/ou radiação. Em

algumas alternativas, o câncer é um tumor sólido, tal como câncer de cólon, mama, ovário, pulmão, pancreático, próstata, melanoma, renal, pancreático, glioblastoma, neuroblastoma, meduloblastoma, sarcoma ou fígado; ou um tumor não-sólido, tal como uma leucemia ou um mieloma múltiplo. Em algumas alternativas, o domínio espaçador é uma dobradiça de lgG4 conectada a um domínio CH2 a um domínio CH3. Em algumas dessas modalidades, o domínio espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 7. Em algumas alternativas, o domínio espaçador é uma dobradiça de lgG4 conectada a um domínio CH3. Em algumas dessas modalidades, o domínio espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8. Em algumas alternativas, o domínio espaçador é apenas uma dobradiça de lgG4. Em algumas dessas modalidades, o domínio espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9. Em algumas alternativas, o espaçador compreende uma sequência como apresentada na SEQ ID NO: 7. Em algumas alternativas, a ligação da fração alvo ao CAR presente na célula induz a produção de pelo menos uma citocina. Em algumas alternativas, pelo menos uma citocina compreende IL-2, TNF-α e/ou INF-α.

[008] Em um quarto aspecto, um kit que compreende FL-PLE de grau farmacêutico é fornecido. Em algumas alternativas, o FL-PLE de grau farmacêutico compreende um hapteno. Em algumas alternativas, o FL-PLE de grau

farmacêutico compreende fluoresceína (por exemplo, FITC).

Breve descrição dos desenhos

[009] A Figura 1A e a Figura 1B ilustram esquematicamente diferentes espaçadores para células T CAR. A Figura 1A mostra um exemplo de: (i) um CAR de segunda geração. A fração de reconhecimento do antígeno (porção superior da molécula), que é apresentada a uma distância desejada por um domínio espaçador curto, a partir da superfície celular. Este espaçador está conectado a um domínio transmembranar, que está conectado a dois domínios de sinalização; (ii) um CAR de espaçador médio, onde outro domínio é adicionado ao espaçador curto; e (iii) um CAR de espaçador longo, onde outro domínio é adicionado ao espaçador médio. A Figura 1B mostra um exemplo de diferentes espaçadores expostos em células T CAR. Em algumas modalidades, espaçadores longos, médios e curtos podem compreender uma sequência como apresentada na SEQ ID NO: 7, 8 e 9, respectivamente.

[0010] A Figura 2 ilustra esquematicamente um exemplo de comprimento e orientação do espaçador sobre uma superfície de uma célula tumoral. Uma célula tumoral cuja superfície é marcada com agente de direcionamento tumoral de célula T CAR (CTCT). A superfície tumoral tem proteínas e outros resíduos celulares que se projetam a partir da superfície, o que pode impactar a capacidade de um CAR específico de CTCT de

reconhecer o agente de direcionamento tumoral de célula T CAR (CTCT). Painéis A - C ilustram o exemplo de modalidades de um PLE-CTCT embutido na membrana lipídica, enquanto os painéis D – E ilustram o exemplo de modalidades de um agente de direcionamento tumoral de célula T CAR (CTCT) conjugado a uma proteína de superfície. No painel A, um CAR longo é capaz de alcançar e ativar através do PLE-CTCT. No painel B, um CAR curto é incapaz de alcançar o agente de direcionamento tumoral de célula T CAR (CTCT) e não será capaz de ativar. No painel C, um CAR longo cujo domínio de reconhecimento é colocado em uma orientação diferente e é incapaz de reconhecer o agente de direcionamento tumoral de célula T CAR (CTCT). Nos painéis D e E, o CAR longo mostrado no painel C e o CAR curto ilustrado no painel B são ambos capazes de reconhecer e ativar através de um agente de direcionamento tumoral de célula T CAR (CTCT) que é conjugado a uma proteína de superfície.

[0011] A Figura 3 ilustra esquematicamente um exemplo de uma célula T CAR CTCT reconhecendo somente PLE-CTCT não mascarado e sendo ativada. Um tumor carregado com uma versão de pró-fármaco de PLE-CTCT. Neste exemplo de modalidade, o pró-fármaco fornece impedimento estérico para a célula T CAR específica de CTCT que torna o Pro-PLE-CTCT irreconhecível para a célula T CAR específica de CTCT. Uma vez que o microambiente tumoral tenha clivado a parte pro do Pro-PLE-

CTCT, o CAR específico de CTCT pode reconhecer e ativar através do PLE-CTCT não mascarado.

[0012] A Figura 4A ilustra um exemplo de modalidade de um fosfolipídio conjugado com um hapteno, fluoresceína (PLE-CTCT). Estrutura do éter fosfolipídico (PLE) preso a fluoresceína de hapteno (FL-PLE). (i) FL (fluoresceína), o alvo para as células T CAR. (ii) polietilenoglicol (PEG), o espaçador utilizado para estender o alvo a uma distância ideal da superfície celular. (iii & iv) PLE, (iii) é o grupo de cabeça polar e (iv) é a cauda hidrofóbica para incorporação ou fixação na membrana plasmática da célula. A Figura 4B ilustra um exemplo de uma versão pró-fármaco de FL-PLE em que uma fração Pro é conjugada ao hapteno (fluoresceína) através de uma ligação clivável indicada pela seta. O FL-PLE mascarado é substancialmente não fluorescente. A ligação pode ser clivada pela presença de espécies reativas de oxigênio (ROS), tal como em um microambiente tumoral. Uma vez não mascarada, a estrutura resultante é FL-PLE, que fornece um sinal fluorescente e pode se ligar a um CAR antiFL.

[0013] A Figura 5 ilustra exemplos de diferentes antiFL scFvs que foram selecionados para a criar uma biblioteca CAR antiFL (porção superior). A porção inferior ilustra estruturas de CARs de exemplo com um espaçador longo (L), um espaçador médio (M) ou um espaçador curto (S). As estruturas

incluem uma sequência líder, um scFv, uma dobradiça/espaçador, um domínio CD28tm, um domínio 41BB, um CD3ζ, uma sequência T2A e um domínio EGFTt. No total, 18 plasmídeos diferentes foram utilizados para criar células T CAR antiFL.

[0014] A Figura 6 ilustra a análise FACS de células T CD8+ contendo CARs antiFL. Painel (a) e (b) ilustram a coloração em células T para o marcador de seleção EGFRt contendo um CAR antiFL(FITC-E2), que compreende a SEQ ID NO: 5 [96% positivo] ou um CAR antiFL(4M5.3), que compreende a SEQ ID NO: 2 [80% positivo], respectivamente. Painéis (c) e (d) ilustram células T incubadas com um anticorpo CD19-FITC de camundongo, então coradas com um anticorpo anti-camundongo-Fc-Alexa647 (“anti-mouse-Fc-Alexa647”) para o anticorpo FITC ligado, para células T contendo o antiFL(FITC-E2) CAR [97% positivo] ou o CAR antiFL(4M5.3) [79% positivo], respectivamente.

[0015] A Figura 7A ilustra uma análise FACS de células tratadas com FL-PLE.

[0016] A Figura 7B ilustra a lise específica de células K562 na presença ou ausência de FL-PLE e na presença ou ausência de células T CD8+ contendo um CAR antiFL.

[0017] A Figura 7C ilustra a produção de citocina a partir de células K562 na presença ou ausência de FL-PLE e na presença ou ausência de células T CD8+ contendo um CAR

antiFL.

[0018] A Figura 8A ilustra FACS de várias linhagens celulares tratadas com FL-PLE.

[0019] A Figura 8B ilustra a lise específica de células tratadas com FL-PLE e em contato com células T CD8+ contendo um CAR antiFL(FITC-E2) contendo um espaçador longo.

[0020] A Figura 9 ilustra uma análise FACS de células T CD8+ contendo vários CARs antiFL e coloração para um marcador de superfície, EGFRt.

[0021] A Figura 10 ilustra uma análise FACS de células T CD4+ contendo vários CARs antiFL e coloração para um marcador de superfície, EGFRt.

[0022] A Figura 11 ilustra uma análise FACS de células marcadas com FL-PLE.

[0023] A Figura 12 ilustra a lise específica de células alvo incubadas com FL-PLE e em contato com células T CD8+ contendo CARs antiFL.

[0024] A Figura 13 ilustra a produção de citocina de células incubadas com FL-PLE e em contato com células T CD4+ contendo CARs antiFL.

[0025] A Figura 14A ilustra a lise específica de células alvo incubadas com FL-PLE e em contato com células T CD8+ contendo CARs antiFL.

[0026] A Figura 14B ilustra a produção de citocina de células incubadas com FL-PLE e em contato com células T CD4+

contendo CARs antiFL.

[0027] A Figura 15A ilustra uma análise FACS de células contendo vários CARs antiFL.

[0028] A Figura 15B ilustra uma análise FACS de células tratadas com FL-PLE.

[0029] A Figura 15C ilustra uma série de gráficos para lise específica de várias células tumorais na presença ou ausência de FL-PLE e em contato com vários CARs antiFL.

[0030] A Figura 15D ilustra uma série de gráficos para a produção de citocina a partir de células T contendo vários CARs antiFL e em contato com várias células tumorais na presença ou ausência de FL-PLE.

[0031] A Figura 15E ilustra uma série de gráficos para a produção de citocina a partir de células T contendo vários CARs antiFL e em contato com várias células tumorais na presença ou ausência de FL-PLE.

[0032] A Figura 16 (painel superior esquerdo) ilustra uma imagem de um xenoenxerto de glioma ortotópico em um indivíduo que foi dosado intravenosamente com FL-PLE e avaliado 48 horas depois. Painel inferior esquerdo é uma imagem do hemisfério contralateral de controle do indivíduo. Tanto o xenoenxerto de glioma ortotópico quanto o hemisfério contralateral de controle do indivíduo foram avaliados por coloração com um anticorpo antifluoresceína. Níveis de FL-PLE retidos também foram quantificados tanto no xenoenxerto

de glioma ortotópico quanto no hemisfério contralateral de controle, ao longo do tempo (painel direito).

[0033] A Figura 17 ilustra gráficos que demonstram a retenção de FL-PLE em diferentes tumores *in vivo*.

[0034] A Figura 18A ilustra uma análise FACS de células tratadas com FL-PLE ou ProFL-PLE.

[0035] A Figura 18B ilustra a lise específica de células tratadas com FL-PLE ou ProFL-PLE e em contado com células T CD8+ contendo um CAR antiFL.

[0036] A Figura 18C ilustra uma série de gráficos para o produto de citocina para células na presença ou ausência de ProFL-PLE e FL-PLE mascarado ou não mascarado, na presença ou ausência de células T CD4+ contendo um CAR antiFL(FITCE2) com um espaçador longo.

[0037] A Figura 19A ilustra uma análise FACS da ligação de FL-PLE ou ProFL-PLE às células.

[0038] A Figura 19B ilustra uma série de gráficos para o produto de citocina para células na presença ou ausência de ProFL-PLE ou FL-PLE, na presença ou ausência de células T CD4+ contendo um CAR antiFL(FITCE2) com um espaçador longo.

[0039] A Figura 19C ilustra uma análise FACS de células tratadas com FL-PLE ou ProFL-PLE.

[0040] A Figura 20 ilustra um gráfico da expectativa de vida relativa de camundongos tendo um tumor neuroblastoma (Be2) e tratados com ProFL-PLE, FL-PLE ou controle e

administrados com células T contendo um CAR antiFL(FITCE2) com um espaçador longo, que compreendia a SEQ ID NO: 5, ou um controle.

[0041] A Figura 21A ilustra gráficos para a progressão média do tumor (painel superior) e sobrevivência percentual (painel inferior) em camundongos injetados intratumoralmente com ProFL-PLE e células T administradas contendo um CAR antiFL(FITCE2) com um espaçador longo.

[0042] Figura 21B ilustra gráficos para a progressão média do tumor (painel superior) e sobrevivência percentual (painel inferior) em camundongos injetados intravenosamente com ProFL-PLE e células T administradas contendo um CAR antiFL(FITCE2) com um espaçador longo.

Descrição Detalhada

[0043] São descritos aqui receptores de antígenos quiméricos (CARs) manipulados com especificidade e uma afinidade selecionada ou projetada para a molécula de fluoresceína quando apresentada na superfície das células tumorais carregadas com FL-PLE exógeno, o que resulta em redirecionamento da reatividade de células T antitumorais. Em algumas modalidades, FL-PLE é uma estrutura molecular sintética que é projetada para integrar na membrana plasmática de tumores, de modo que a fluoresceína da molécula esteja presente adjacente à casca externa da membrana plasmática no espaço extracelular. Em algumas modalidades,

a estrutura FL-PLE inclui atributos terapeuticamente importantes. Em algumas modalidades, um CAR que visa a fração de fluoresceína (FL) do FL-PLE é fornecido e métodos de fabricação e utilização do mesmo também são contemplados. Estes CARs podem ser constitutivamente expressos ou colocados sob controle regulado.

[0044] Embora a transferência adotiva de células T modificadas por transgene tenha sido bem sucedida em configurações selecionadas, tais como malignidades da linhagem de células B CD19, estas terapias provaram ser difíceis de generalizar para outros tipos de câncer devido à falta de um único antígeno alvo que está presente em todas as formas de câncer, mas não células normais, saudáveis. Consequentemente, o desenvolvimento de terapias de célula T CAR foi dificultado pela onerosa tarefa de identificar e verificar dezenas de centenas de antígenos, tais como alvos de CAR, como foi o desenvolvimento de CARs associados a fim de tratar cada tipo de câncer que afeta os seres humanos. Trabalho anterior desenvolveu um FL-PLE que se integra em todos os tumores que apresentam uma molécula alvo sintética para as células T CAR reconhecerem. Isto elimina a necessidade de validação de dezenas de centenas de CARs e, em vez disso, permite o uso de um único CAR específico de FL.

[0045] A presente descrição trata da identificação,

criação e manipulação de células T CAR adequadas para ligação à fração FL do FL-PLE. Em algumas modalidades, a fração FL pode ser mascarada e não mascarada de modo que a fração FL possa ser ativada para receber a célula T CAR. Em algumas modalidades, um CAR específico de FL pode reconhecer apenas agentes de direcionamento tumoral de célula T CAR (CTCTs) não mascarados e FLs não mascarados.

[0046] Algumas modalidades dos métodos e composições aqui fornecidas podem incluir aspectos descritos em WO 2018/148224, intitulado “PHOSPHOLIPID ETHER (PLE) CAR T CELL TUMOR TARGETING (CTCT) AGENTS”, que é aqui expressamente incorporado por referência em sua totalidade.

Definições

[0047] Na descrição que se segue, os termos devem ter seu significado simples e comum quando lidos à luz do relatório. Alguém versado na técnica compreenderia os termos como utilizados tendo em vista todo relatório.

[0048] Conforme aqui utilizado, “um” ou “uma” pode significar um ou mais de um.

[0049] Conforme aqui utilizado, o termo "aproximadamente" indica que um valor inclui a variação inerente de erro para o método que é empregado para determinar um valor ou a variação que existe entre experimentos.

[0050] “Receptor quimérico”, conforme aqui utilizado,

refere-se a um receptor projetado sinteticamente compreendendo um domínio de ligação ao ligante de um anticorpo ou outra sequência de proteína que se liga a uma molécula associada com a doença ou distúrbio e é ligada através de um domínio espaçador a um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma célula T ou outros receptores, tal como um domínio coestimulador. Receptor quimérico também pode ser referido como receptores de células T artificiais, receptores de células T quiméricas, imunoreceptores quiméricos e receptores de antígenos quiméricos (CARs). Estes receptores podem ser utilizados para enxertar a especificidade de um anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação do mesmo sobre uma célula T, em que a transferência de suas sequências de codificação é facilitada por vetores virais, tais como um vetor retroviral ou um vetor lentiviral. CARs são receptores de células T geneticamente manipuladas projetados para redirecionar células T para células alvo que expressam antígenos específicos de superfície celular. Células T podem ser removidas de um indivíduo e modificadas de modo que elas possam expressar receptores que podem ser específicos para um antígeno por um processo chamado de transferência de células adotivas. As células T são reintroduzidas no paciente onde elas podem então reconhecer e mirar um antígeno. Estes CARs são receptores manipulados que podem enxertar uma especificidade

selecionada sobre uma célula receptora imunológica. O termo receptores de antígenos quiméricos ou "CARs" também são considerados por alguns investigadores para incluir o anticorpo ou fragmento de anticorpo, o espaçador, o domínio de sinalização e a região transmembranar. Devido aos efeitos surpreendentes de modificação dos diferentes componentes ou domínios do CAR aqui descrito, tal como a região de ligação do epítopo (por exemplo, fragmento de anticorpo, scFv ou porção do mesmo), espaçador, domínio transmembranar e/ou domínio de sinalização), os componentes do CAR são frequentemente distinguidos por toda esta descrição em termos de elementos independentes.

[0051] "Agente de direcionamento de célula T CAR" (CTCT) é dado seu significado simples e comum em vista do relatório e pode ser descrito, por exemplo, como uma composição que pode integrar a membrana de uma célula alvo. Nas alternativas aqui, o CTCT compreende um lipídio, em que o lipídio compreende uma fração alvo e uma fração de mascaramento. A fração de mascaramento pode ser não mascarada na presença de baixo pH, de espécies ROS e dentro de um microambiente tumoral, por exemplo. Em algumas modalidades, a fração de mascaramento inibe a ligação específica de um CAR à fração alvo. A fração alvo pode ser reconhecida e ligada ao receptor de antígeno quimérico que é específico para a fração alvo. Em algumas alternativas aqui, a fração

de mascaramento é removida em um pH de 4, 5, 6 ou 6,5 ou qualquer pH entre uma faixa definida por quaisquer dois valores mencionados acima.

[0052] Um "receptor de célula T" ou "TCR" é uma molécula que é encontrada na superfície de linfócitos T ou células T que é responsável pelo reconhecimento de fragmentos de antígeno ligados a uma grande molécula complexa de histocompatibilidade.

[0053] "Fração alvo", conforme aqui descrito, refere-se a um grupo específico ou sítio em uma molécula ou substância química que é um alvo de ligação para outra substância química ou proteína de interesse. Em algumas alternativas, um complexo é fornecido, em que o complexo compreende um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou um receptor de célula T (TCR) unido a um lipídio, em que o lipídio compreende uma fração alvo e o CAR é unido ao referido lipídio através de uma interação com a referida fração alvo. Em algumas alternativas, a fração alvo é biotina, digoxigenina, dinitrofenol ou fluoresceína.

[0054] Um "fragmento variável de cadeia única" (scFv) é uma proteína de fusão que pode ter regiões variáveis das cadeias pesadas (VH) e leves (VL) de imunoglobulinas, conectadas com um peptídeo ligante curto de dez a 25 aminoácidos. O peptídeo ligante curto pode compreender 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25

aminoácidos ou qualquer número de aminoácidos entre uma faixa definida por quaisquer dois valores mencionados acima. O ligante é usualmente rico em glicina para flexibilidade, bem como serina ou treonina para solubilidade e pode conectar o terminal N do VH com o terminal C do VL, ou vice-versa. Esta proteína retém a especificidade da imunoglobulina original, apesar da remoção das regiões constantes e da introdução do ligante. O scFv pode ser específico para um antígeno. "Antígeno" ou “Ag”, como aqui utilizado, refere-se a uma molécula que provoca uma resposta imunológica. Esta resposta imune pode envolver a produção de anticorpos ou a ativação de células imunologicamente competentes específicas, ou ambas. Um antígeno pode ser gerado, sintetizado, produzido de forma recombinada ou pode ser derivado de uma amostra biológica. Tal amostra biológica pode incluir, mas não está limitada a, uma amostra de tecido, uma amostra de tumor, uma célula ou um fluido biológico, tal como, por exemplo, sangue, plasma ou fluido de ascite. Em algumas alternativas aqui, uma composição é fornecida, em que a composição compreende células fabricadas por qualquer um dos métodos alternativos aqui. Em algumas alternativas, as células compreendem um receptor de antígeno quimérico, em que o receptor de antígeno quimérico compreende um scFv que é específico para um antígeno.

[0055] Algumas modalidades aqui fornecidas se referem

a um ScFv descrito aqui como antiFL(FITCE2 TyrHl33Ala) (também referido como antiFL(FITC-E2 Mut2) ou como antiFL(Mut2)), que pode ser incorporado em um CAR de acordo com esta descrição (SEQ ID NO: 1), tendo uma sequência de aminoácidos de SVLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVP DRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSEFLFGTGTKLTVLGGGGGSGGG GSGGGGSQVQLVESGGNLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGLEWVAGLS ARSSLTHYADSVKGRFTISRDNAKNSVYLQMNSLRVEDTAVYYCARRSYDSSGYWGHFA SYMDVWGQGTLVTVS.

[0056] Algumas modalidades aqui fornecidas se referem a um scFv descrito aqui como antiFL(4M5.3), que pode ser incorporado em um CAR de acordo com esta descrição (SEQ ID NO: 2), tendo uma sequência de aminoácidos de DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIYKVSNR VSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKSSADDA KKDAAKKDDAKKDDAKKDGGVKLDETGGGLVQPGGAMKLSCVTSGFTFGHYWMNWVRQS PEKGLEWVAQFRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDTGIYYCT GASYGMEYLGQGTSVTVS.

[0057] Algumas modalidades aqui fornecidas se referem a um ScFv descrito aqui como antiFL(4420), que pode ser incorporado em um CAR de acordo com esta descrição (SEQ ID NO: 3), tendo uma sequência de aminoácidos de DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSQGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIYKVSNR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIGGGGSGG

GGSGGGGSEVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQI
RNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQ
GTSVTVSS.

[0058] Algumas modalidades aqui fornecidas se referem a um ScFv descrito aqui como antiFL(4D5Flu), que pode ser incorporado em um CAR de acordo com esta descrição (SEQ ID NO: 4), tendo uma sequência de aminoácidos de DYKDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSLVHSQGNTYLRWYQQKPGKAPKVLIYKV
SNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSTHVPWTFGQGTKVELKRAG
GGGSGGGGSGGGGSSGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
DYWMNWVRQAPGKGLEWVAQIRNKPYNYETYYADSVKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLR
AEDTAVYYCTGSYYGMDYWGQGTLVTVSS.

[0059] Algumas modalidades aqui fornecidas se referem a um ScFv descrito aqui como antiFL(FITCE2), que pode ser incorporado em um CAR de acordo com esta descrição (SEQ ID NO: 5), tendo uma sequência de aminoácidos de SVLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVP
DRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSEFLFGTGTKLTVLGGGGGSGGG
GSGGGGSQVQLVESGGNLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGLEWVAGLS
ARSSLTHYADSVKGRFTISRDNAKNSVYLQMNSLRVEDTAVYYCARRSYDSSGYWGHFY
SYMDVWGQGTLVTVS.

[0060] Algumas modalidades fornecidas aqui se referem a um ScFv descrito aqui como antiFL(FITCE2 HisHl3lAla), que pode ser incorporado em um CAR de acordo com esta descrição (SEQ ID NO: 6), tendo uma sequência de aminoácidos de

SVLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVP
DRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSEFLFGTGTKLTVLGGGGGSGGG
GSGGGGSQVQLVESGGNLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGLEWVAGLS
ARSSLTHYADSVKGRFTISRDNAKNSVYLQMNSLRVEDTAVYYCARRSYDSSGYWGAFY
SYMDVWGQGTLVTVS.

[0061] “Domínios de ligação específicos de antígeno” podem incluir proteína ou domínios de proteína que podem se ligar especificamente a um epítopo em uma proteína com uma afinidade de ligação baixa ou elevada (capacidade de ligação de fM a mM). Em algumas alternativas, a proteína de fusão compreende uma proteína ou porção da mesma que pode modular uma resposta imunológica. Em algumas alternativas, a proteína compreende um domínio de ligação específico do antígeno.

[0062] “Células T” ou “linfócitos T”, conforme aqui utilizados, podem ser de qualquer espécie mamífera, preferencialmente primatas, incluindo macacos, cães e seres humanos. Em algumas alternativas, as células T são alogênicas (da mesma espécie, mas doador diferente) como o indivíduo receptor; em algumas alternativas, as células T são autólogas (o doador e o receptor são os mesmos); em algumas alternativas, as células T são singênicas (o doador e os receptores são diferentes, mas são gêmeos idênticos).

[0063] “Terapia de combinação”, conforme aqui descrito, refere-se a uma terapia que utiliza mais de uma medicação ou

modalidade para um tratamento. Terapia de combinação, por exemplo, pode também se referir a terapias múltiplas para uma única doença e, muitas vezes, todas as terapias são combinações de produtos farmacêuticos. Terapia de combinação pode também envolver a prescrição e administração de drogas separadas, nas quais a dosagem também pode ter mais de um ingrediente ativo. Em algumas alternativas, uma terapia de combinação é fornecida, em que a terapia de combinação compreende a administração de uma célula imune geneticamente modificada para modificação de um microambiente tumoral. Em algumas alternativas, a terapia de combinação compreende a administração de uma célula imune geneticamente modificada para modular a supressão da resposta imunológica em um microambiente tumoral. Em algumas alternativas, a terapia de combinação compreende a administração de uma célula imune geneticamente modificada para minimizar a proliferação de células tumorais e supressoras em um indivíduo em necessidade deste, por exemplo, um ser humano. Em algumas alternativas, a terapia de combinação compreende a administração de uma célula imune geneticamente modificada para aumentar a eficiência de uma terapia anticâncer, terapia anti-infecção, terapia antibacteriana, terapia antiviral ou terapia antitumoral em um indivíduo em necessidade destes, por exemplo, um ser humano. Em algumas alternativas, a terapia de combinação compreende ainda a administração de um

inibidor. Em algumas alternativas, o inibidor não é um inibidor enzimático. Em algumas alternativas, o inibidor é um inibidor enzimático. Em algumas alternativas, a terapia de combinação compreende a administração de uma dose terapêutica de um inibidor ou um anticorpo ou um fragmento de ligação do mesmo. Estes anticorpos ou seus fragmentos de ligação podem ser humanizados em algumas alternativas. Em algumas alternativas, a terapia de combinação pode ainda compreender a administração de uma célula T contendo CAR a um indivíduo em necessidade, por exemplo, um ser humano.

[0064] "Fármacos quimioterapêuticos" são uma categoria de medicamentos anticâncer que podem usar, por exemplo, substâncias químicas, tais como fármacos anticancerígenos (agentes quimioterapêuticos), que podem ser administrados como parte de um tratamento de quimioterapia padronizado. Fármacos quimioterapêuticos podem ser administrados com um proposito de cura ou para prolongar a vida ou para reduzir os sintomas (quimioterapia paliativa). Quimioterapêuticos adicionais também podem incluir terapia hormonal e terapia direcionada, já que é uma das principais categorias da oncologia médica (farmacoterapia para câncer). Estas modalidades são frequentemente utilizadas em conjunto com outras terapias de câncer, tais como terapia de radiação, cirurgia e/ou terapia de hipertermia. Em alguns casos, sabe-se que o câncer se espalha devido à cirurgia. Em algumas

alternativas, uma célula imune geneticamente modificada é administrada ao sítio tumoral antes ou depois de um procedimento cirúrgico.

[0065] Quimioterapia, na qual fármacos quimioterapêuticos são administrados, pode usar um fármaco por vez (quimioterapia de agente único) ou vários fármacos de uma vez (quimioterapia de combinação ou poliquimioterapia). A combinação de quimioterapia e radioterapia é quimioraditerapia. Quimioterapia que utiliza fármacos que convertem a atividade citotóxica apenas quando expostos à luz é chamada fotoquimioterapia ou terapia fotodinâmica. Em algumas alternativas de administração da célula imune geneticamente modificada aqui descrita, o método pode ainda compreender a administração a um indivíduo tendo câncer, fotoquimioterapia ou terapia fotodinâmica após receber as células imunes geneticamente modificadas ou macrófagos geneticamente manipulados (GEMs).

[0066] Fármacos quimioterapêuticos podem incluir, mas não estão limitados a, conjugados de fármacoanticorpo (por exemplo, um anticorpo ligado a um fármaco por um ligante), nanopartículas (por exemplo, uma nanopartícula pode ser uma partícula de tamanho de 1-1000 nanômetros para promover a seletividade do tumor e auxiliar na distribuição de fármacos de baixa solubilidade), eletroquimioterapia, agentes alquilantes, antimetabólitos (por exemplo, 5-fluorouracil

(5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), Capecitabina (Xeloda®), Cladribina, Clofarabina, Citarabina (Ara-C®), Floxuridine, Fludarabina, Gencitabina (Gemzar®), Hidroxiuréia, Metotrexato, Pemetrexede (Alimta®), Pentostatina ou Tioguanina), antibióticos antitumorais, inibidores de topoisomerase, inibidores mitóticos, corticosteróides, agentes de intercalação de DNA ou inibidores de checkpoint (por exemplo, quinases de checkpoint CHK1 ou CHK2). Em algumas alternativas dos métodos aqui descritos, as células imunes geneticamente modificadas ou composições compreendendo células imunes geneticamente modificadas são administradas em combinação com um ou mais agentes anticâncer, tais como qualquer um ou mais dos compostos ou terapias precedentes. Em algumas alternativas, um ou mais agentes anticancerígenos que são coadministrados ou administrados em conjunto com as células imunes geneticamente modificadas compreendem conjugados de fármacoanticorpo, nanopartículas, eletroquimioterapia, agentes alquilantes, antimetabólitos, antibióticos antitumorais, inibidores de topoisomerase, inibidores mitóticos, corticosteróides, agentes de intercalação de DNA ou inibidores de checkpoint. Em algumas alternativas, os antimetabólitos compreendem 5-fluorouracil (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), Capecitabina (Xeloda®), Cladribina, Clofarabina, Citarabina (Ara-C®), Floxuridine, Fludarabina,

Gencitabina (Gazar®), Hidroxiuréia, Metotrexato, Pemetrexede (Alimta®), Pentostatina ou Tioguanina.

[0067] "Indivíduo" ou "paciente", como descrito aqui, refere-se a qualquer organismo sobre o qual as alternativas descritas aqui podem ser utilizadas ou administradas, por exemplo, para finalidades experimentais, diagnosticas, profiláticas e/ou terapêuticas. Indivíduos ou pacientes incluem, por exemplo, animais. Em algumas alternativas, o indivíduo é camundongo, ratos, coelhos, primatas não humanos e seres humanos. Em algumas alternativas, o indivíduo é uma vaca, ovelha, porco, cavalo, cachorro, gato, primata ou um humano.

[0068] Algumas modalidades se referem a um agente de direcionamento tumoral de célula T CAR (CTCT). Algumas modalidades aqui fornecidas se referem a um éter fosfolipídico (PLE) preso a fluoresceína de hapteno (FL-PLE). "Fluoresceína", como descrito aqui, é um composto orgânico sintético que é solúvel em água e álcool. O mesmo é amplamente utilizado como um rastreador fluorescente para muitas aplicações. Nas alternativas aqui, fluoresceína é uma fração alvo em um lipídio que é especificamente reconhecida por um receptor de antígeno quimérico projetado e/ou selecionado por sua capacidade de se ligar ou interagir com a fluoresceína. Em algumas alternativas, o lipídio é um éter fosfolipídico.

[0069] "Lipídio", como descrito aqui, é uma classe de compostos orgânicos que compreendem cadeias de carbono, ácidos graxos ou um derivado de ácido graxo que é tipicamente insolúvel em água, mas pode se integrar ou se misturar com solventes hidrofóbicos ou orgânicos. Sem ser limitante, os lipídios podem incluir gorduras, ceras, vitaminas solúveis em gordura, monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos, esfingolipídios, cerebrosídeos, ceramidas ou fosfolipídios. São aqui descritos os lipídios anfifílicos que podem ter um grupo de cabeça polar e uma fração hidrofóbica ou grupo hidrofóbico. "Grupo hidrofóbico" ou fração hidrofóbica, conforme aqui descrito, é uma molécula ou uma parte de uma molécula que é repelida de uma massa de água e tende a ser apolar. Isto pode incluir alcanos, óleos ou gorduras. Sem ser limitante, lipídios podem ser glicerolipídios, glicerofosfolipídios, esfingolipídios, lipídios esteróis, lipídios prenólicos, sacarolipídios ou policetídeos. Nas alternativas aqui, um complexo é fornecido, em que o complexo compreende um lipídio. Em algumas alternativas, o lipídio compreende um grupo de cabeça polar e uma fração hidrofóbica. Em algumas alternativas, a fração hidrofóbica é uma cauda de carbono hidrofóbico. Em algumas alternativas, a cauda de carbono hidrofóbico é saturada ou insaturada. Em algumas alternativas, a cauda de carbono hidrofóbico compreende 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25

carbonos ou qualquer número de carbonos entre uma faixa estabelecida em qualquer valor mencionado anteriormente. Em algumas alternativas, a fração hidrofóbica é um esteroide ou um colesterol. Em algumas alternativas, o lipídeo compreende um glicerolipídio, glicerofosfolipídio, esfingolipídio, lipídio de esterol, lipídio prenólico, sacarolipídio ou policetídeo. Em algumas alternativas, o lipídio é um éter fosfolipídico. Em algumas alternativas, o lipídio contém caudas de alquila ramificadas.

[0070] Em algumas alternativas, o lipídio pode ser um esfingolipídio. O esfingolipídio pode conter uma cadeia principal de bases esfingoides, tal como um conjunto de aminoálcoois alifáticos que incluem esfingosina. Um esfingolipídio com um grupo R consistindo em um átomo de hidrogénio é uma ceramida. Outros grupos R comuns incluem fosfocolina, produzindo uma esfingomielina e vários monômeros ou dímeros de açúcar, produzindo cerebrosídeos e globosídeos, respectivamente. Cerebrosídeos e globosídeos são coletivamente conhecidos como glicoesfingolipídeos. Em algumas alternativas, o lipídio é um glicoesfingolipídeo.

[0071] Como aqui fornecido, o lipídio compreende um grupo de cabeça polar e um grupo hidrofóbico. Em algumas alternativas, o grupo hidrofóbico compreende um ácido graxo, tal como uma cadeia alifática. O ácido graxo pode ser saturado ou insaturado. Em algumas alternativas, o grupo

hidrofóbico compreende um grupo alquila, alquenila ou alquinila. Em algumas alternativas, o grupo hidrofóbico compreende um lipídio terpenoide, tal como um esteroide ou colesterol. Em algumas alternativas, o grupo hidrofóbico compreende uma ligação éter, em que a ligação éter está entre o grupo de cabeça polar e a cadeia alifática. Em algumas alternativas, o lipídio é um éter fosfolipídico. Em algumas alternativas, a cabeça polar compreende um grupo colina, fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfoetanolamina, um resíduo de oligossacarídeo, um resíduo de açúcar, fosfatidilserina ou fosfatidilinositol. Em algumas alternativas, o açúcar é um glicerol ou álcool de açúcar.

[0072] Em algumas alternativas, o lipídio é um alquilfosfolipídio de cadeia simples.

[0073] Em algumas alternativas, o lipídeo compreende uma estrutura de alquilfosfolipídios sintéticos, tais como edelfosina, perifosine ou erucilfosfocolina. Em algumas alternativas, o lipídio é um lisofosfatidilcolina, edelfosina, erucilfosfocolina, D-21805 ou perfisona. Tais lipídios são descritos, por exemplo, em van der Lui *et al* ("A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells” Mol Cancer Ther 2007; 6(8), 2007; aqui expressamente incorporado por referência em sua totalidade). Em algumas alternativas dos lipídios aqui descritos, uma colina no grupo

de cabeça polar pode ser substituída por uma fração piperidina. Em algumas alternativas, o lipídio é um alquilfosfolipídio anticâncer. Os fosfolipídios anticâncer são descritos por vander Lui *et al.* (”A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells” Mol Cancer Ther 2007; 6(8), 2007; aqui expressamente incorporado por referência em sua totalidade).

[0074] Em algumas alternativas, os lipídios aqui fornecidos são agentes antitumorais estruturalmente relacionados e sintéticos que interagem com uma membrana celular. Estes tipos de lipídios sintéticos são alquilfosfolipídios e são descritos, por exemplo, por van Blitterswijk *et al.* (“Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphopholipids” Biochimica et Biophysica Acta 1831 (2013)663-674, incorporado aqui por referência em sua totalidade). Sem ser limitante, os alquilfosfolipídios sintéticos podem incluir edelfosina, miltefosina, perifosine, erucilfosfocolina ou Erufosina. Em algumas alternativas, o lipídio é edelfosina, miltefosina, perifosine, erucilfosfocolina ou Erufosina. Em algumas alternativas, o lipídio é um análogo estável de lisofosfatidilcolina. Em algumas alternativas, o lipídio é uma variante tio-éter de edelfosina ou l-hexadeciltio-2-metoximetil-rac-glicero-3-fosfocolina. Em algumas

alternativas, o lipídio é LysoPC, edelfosina, Ilmofosina, Miltefosina, Perifosina, Erucilfosfocolina ou Erufosina.

[0075] "Grupo de cabeça polar", como descrito aqui, é o grupo hidrofílico de um lipídio, tal como um fosfolipídio. "Fosfolipídios", como aqui descritos, são uma classe específica de lipídios que podem formar bicamadas lipídicas devido à sua característica anfifílica. A molécula de fosfolipídio compreende pelo menos uma "cauda" de ácido graxo hidrofóbico e uma "cabeça" hidrófila ou "grupo de cabeça polar". De acordo com a alternativa aqui, o fosfolipídio ou éter fosfolipídico compreende um grupo de cabeça polar. Em algumas alternativas, o grupo de cabeça polar compreende fosfocolina, uma fração piperidina ou uma fração trimetilarseno-etil-fosfato. Em algumas alternativas, o lipídio compreende uma fração alvo e o CAR é unido a ou é configurado para unir-se ao referido lipídio através de uma interação com a referida fração alvo. Em algumas alternativas, o lipídeo compreende um grupo de cabeça polar (por exemplo, compreendendo um anel aromático) e uma cadeia alquila de carbono. Em algumas alternativas aqui, um complexo é fornecido, em que o complexo compreende um ou mais dos referidos lipídios. Em algumas alternativas, o lipídeo compreende um grupo de cabeça polar. Em algumas alternativas, o lipídio é um éter fosfolipídico. Em algumas alternativas, o éter fosfolipídico compreende uma fração alvo e o CAR é

unido a ou é configurado para unir-se ao referido éter fosfolipídico através de uma interação e/ou ligação com a referida fração alvo. Em algumas alternativas, o éter fosfolipídico compreende um grupo de cabeça polar e uma cadeia alquila de carbono. Em algumas alternativas, o grupo de cabeça polar compreende um grupo colina, fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfoetanolamina, um resíduo de oligossacarídeo, um resíduo de açúcar, fosfatidilserina ou fosfatidilinositol. Em algumas alternativas, o grupo de cabeça polar compreende fosfocolina, uma fração piperidina ou uma fração trimetilarseno-etil-fosfato. Em algumas alternativas, o lipídio é um éter fosfolipídico. Em algumas alternativas, o açúcar é glicerol ou álcool de açúcar. Em algumas alternativas, o grupo de cabeça polar compreende um grupo de açúcar. Em algumas alternativas, o lipídeo compreende um grupo de cabeça contendo manose. Em algumas alternativas, o grupo de cabeça polar compreende esfingosina. Em algumas alternativas, o grupo de cabeça polar compreende uma glicose. Em algumas alternativas, o grupo de cabeça polar compreende um di-, tri- ou tetra-sacarídeo. Em algumas alternativas, o lipídio é um glicosilcerebrosídeo (“glucosylcerebroside”). Em algumas alternativas, o lipídeo é lactosilceramida. Em algumas alternativas, o lipídeo e um glicolipídio. Em algumas alternativas, o glicolipídio compreende unidades de açúcar,

tais como n-glicose, n-galactose ou N-acetil-n-galactosamina. Em algumas alternativas, o lipídeo compreende um anel de hidrocarboneto tal como um esterol.

[0076] Em algumas alternativas, o grupo de cabeça polar do lipídio compreende glicerol ou um álcool de açúcar. Em algumas alternativas, o grupo de cabeça polar do lipídio compreende um grupo fosfato. Em algumas alternativas, o grupo de cabeça polar do lipídio compreende colina. Em algumas alternativas, o lipídio é um fosfatidiletanolamina. Em algumas alternativas, o lipídio é um fosfatidilinositol. Em algumas alternativas, o lipídeo compreende uma cadeia principal de base esfingoide. Em algumas alternativas, o lipídeo compreende um lipídio de esterol, tal como colesterol ou seus derivados. Em algumas alternativas, o lipídeo compreende sacarolipídios. Em algumas alternativas, o grupo de cabeça polar compreende colina, fosfato e/ou glicerol.

[0077] Em algumas alternativas, o lipídio é um glicolipídio. Em algumas alternativas, o lipídeo compreende um açúcar. Em algumas alternativas, o lipídeo é derivado da esfingosina. Em algumas alternativas, o lipídeo é um glicerol-glicolipídio ou um esfingoglicolipídio.

[0078] Em algumas alternativas, o lipídeo é um éter lipídico com cadeias hidrofóbicas ramificadas.

[0079] “Saturado”, como descrito aqui, é uma molécula de ácido graxo, na qual não existem ligações duplas dentro

das moléculas de carbono. Insaturado, como descrito aqui, indica que há uma ou mais ligações duplas em uma cadeia de ácido graxo. Em algumas alternativas aqui, um complexo compreendendo um lipídio é fornecido. Em algumas alternativas, o lipídio compreende uma cadeia de ácido graxo, em que o ácido graxo é saturado ou insaturado.

[0080] "Alquila", conforme aqui descrito, é um substituinte alquila que tem um hidrogénio ausente.

[0081] Um grupo "alquenila" é um hidrocarboneto insaturado que contém pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono.

[0082] Um grupo "alquinila" é um hidrocarboneto insaturado contendo pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono.

[0083] "Terpenoide", conforme aqui descrito, é uma molécula que é derivada de cinco unidades de isopreno de carbono. Esteroides e esteróis podem ser produzidos a partir de precursores terpenoides. Por exemplo, esteroides e colesterol podem ser biosintetizados por precursores terpenoides.

[0084] "Éter fosfolipídico", conforme aqui descrito, é um lipídio no qual um ou mais dos átomos de carbono em um grupo de cabeça polar são ligados a uma cadeia alquila através de uma ligação éter, em oposição à ligação éster mais comum. Em algumas alternativas, o grupo de cabeça polar

é um glicerol.

[0085] Vários tipos de "espaçadores" são descritos aqui. O espaçador para um receptor de antígeno quimérico refere-se a um espaçador de polipeptídio, cujo comprimento espaçador é configurado para ou é selecionado pela sua capacidade de promover um aumento na ligação ou interação com um receptor de antígeno quimérico ou para reduzir ou minimizar um efeito colateral adverso associado com a terapia de células T CAR. Em algumas modalidades, um domínio espaçador curto de um CAR tem cerca de 12 aminoácidos ou menos, porém maior do que 1 aminoácido e compreende toda ou uma porção de uma sequência da região da dobradiça de lgG4 ou variante da mesma. Em algumas modalidades, um domínio espaçador intermediário de um CAR tem cerca de 119 aminoácidos ou menos, porém maior do que 1 aminoácido e compreende toda ou uma porção de uma sequência da região da dobradiça de lgG4 e uma região CH3 ou variante da mesma. Em algumas modalidades, um domínio espaçador longo de um CAR tem cerca de 229 aminoácidos ou menos, porém maior do que 1 aminoácido e compreende toda ou uma porção de uma sequência da região da dobradiça de lgG4, uma região CH2 e uma região CH3 ou variante da mesma. Com relação ao lipídio, o lipídio pode também compreender um espaçador que separa a fração alvo do lipídio e é ligado ao grupo de cabeça polar do lipídio. O espaçador do lipídeo pode compreender um espaçador

PEG, um espaçador Hapteno, um pequeno peptídeo ou uma cadeia de alcano. Em algumas alternativas, o espaçador hapteno compreende dois haptenos (espaçador hapteno (2X)). Em algumas alternativas, o lipídeo compreende um grupo hidrofóbico, tal como uma cadeia de alcano. Em algumas alternativas, a cadeia de alcano pode compreender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 carbonos, ou qualquer número de carbonos entre uma faixa definida por quaisquer dois valores mencionados. Em algumas alternativas, o espaçador PEG compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 moléculas de PEG, ou qualquer quantidade de moléculas de PEG que está dentro de uma faixa definida por quaisquer dois valores mencionados acima.

[0086] "Hapteno", como descrito aqui, é uma pequena molécula que suscita uma resposta imune somente quando ligada a um grande carreador, tal como uma proteína; o carreador pode ser um que também não suscite uma resposta imunológica por si só. Uma vez que o corpo tenha gerado anticorpos para um aduto carreador de hapteno, o hapteno de molécula pequena pode também ser capaz de se ligar ao anticorpo, mas não irá iniciar uma resposta imune; usualmente apenas o aduto carreador de hapteno pode fazer isto. Em algumas modalidades, um hapteno é uma pequena fração de molécula de ligação, que pode ser ligada por ou ter especificidade em relação a um scFv ou anticorpo.

[0087] Em algumas alternativas aqui, as células fornecidas são linfócitos T citotóxicos. "Linfócitos T Citotóxicos" (CTL), conforme aqui utilizado, refere-se a um linfócito T que expressa CD8 na sua superfície (por exemplo, uma célula T CD8+). Em algumas alternativas, tais células são preferencialmente células T de "memória" (células T_M) que são experimentadas por antígeno. Em algumas alternativas, a célula é uma célula T precursora. Em algumas alternativas, a célula T precursora é uma célula-tronco hematopoiética. Em algumas alternativas, a célula é uma célula linfocitária citotóxica T CD8+ selecionada do grupo que consiste em células T CD8+ ingênuas, células T CD8+ de memória central, células T CD8+ de memória efetora e células T CD8+ em massa. Em algumas alternativas, a célula é uma célula linfocitária auxiliar T CD4+ que é selecionada a partir do grupo que consiste em células T CD4+ ingênuas, células CD4+ de memória central, células T CD4+ de memória efetora e células T CD4+ em massa.

[0088] "Fração de mascaramento", conforme aqui utilizada, refere-se a uma fração em um éter lipídico que é ligado à fração alvo. A fração de mascaramento funciona como um grupo protetor para impedir o reconhecimento da fração alvo do lipídio bloqueando a ligação e reconhecimento de um receptor de antígeno quimérico que é específico para a fração alvo. Quando o lipídio é integrado em uma célula, em que a

célula existe em um ambiente tumoral ou sítio de espécies reativas de oxigênio, a fração de mascaramento pode ser auto-clivada, permitindo assim ligação, interação e/ou reconhecimento da fração alvo pelo receptor de antígeno quimérico. Em algumas alternativas, o lipídio é um éter fosfolipídico. Em algumas alternativas, a fração de mascaramento compreende um grupo hidroxila fenólico ou PEG. Em algumas alternativas, o grupo hidroxila fenólico é ligado a uma hidroxila em uma fração xanteno da fluoresceína. Em algumas alternativas, a fração de mascaramento é ligada à fração alvo por uma fração clivável, que é opcionalmente configurada para ser especificamente clivável em um microambiente tumoral. Em algumas alternativas, a fração clivável, que é configurada para ser clivável em um microambiente tumoral, é clivada por uma reação de espécies reativas de oxigênio, um pH ácido, hipóxia ou nitrosilação. Em algumas alternativas, o éter fosfolipídico compreende uma fração alvo e o CAR é unido ao referido éter fosfolipídico através de uma interação com a referida fração alvo. Em algumas alternativas, o éter fosfolipídico compreende um grupo de cabeça polar e uma cadeia alquila de carbono.

[0089] “Câncer”, como descrito aqui, é um grupo de doenças envolvendo crescimento anormal de células com o potencial de invadir ou se espalhar para outras partes do corpo. Indivíduos que podem ser tratados usando os métodos

aqui descritos incluem indivíduos identificados ou selecionados como tendo câncer, incluindo, mas não limitados a, câncer de cólon, pulmão, fígado, mama, renal, próstata, ovário, pele (incluindo melanoma), osso, leucemia, mieloma múltiplo ou cerebral, etc. Tal identificação e/ou seleção pode ser feita por avaliação clínica ou diagnostica. Em algumas alternativas, os antígenos ou moléculas associadas ao tumor são conhecidos, tais como melanoma, câncer de mama, câncer cerebral, carcinoma de células escamosas, câncer de cólon, leucemia, mieloma ou câncer de próstata. Exemplos incluem, mas não estão limitados a linfoma de célula B, câncer de mama, câncer cerebral, câncer de próstata e/ou leucemia. Em algumas alternativas, um ou mais polipeptídios oncogênicos são associados com rim, uterino, cólon, pulmão, fígado, mama, renal, próstata, ovário, pele (incluindo melanoma), osso, câncer cerebral, adenocarcinoma, câncer pancreático, leucemia mielógena crónica ou leucemia. Em algumas alternativas, é fornecido um método de tratamento, melhoria ou inibição de um câncer em um indivíduo. Em algumas alternativas, o câncer é câncer de mama, ovário, pulmão, pancreático, próstata, melanoma, renal, pancreático, glioblastoma, neuroblastoma, meduloblastoma, sarcoma, fígado, cólon, pele (incluindo melanoma), osso ou cérebro. Em algumas alternativas, o indivíduo que recebe uma das terapias aqui descritas é também selecionado para receber

uma terapia de câncer adicional, que pode incluir uma terapia de câncer, radiação, quimioterapia ou um fármaco para terapia de câncer. Em algumas alternativas, o fármaco para terapia de câncer fornecido compreende Abiraterona, Alentuzumabe, Anastrozol, Aprepitanto, Trióxido arsénico, Atezolizumabe, Azacitidina, Bevacizumabe, Bleomicina, Bortezomibe, Cabazitaxel, Capecitabina, Carboplatina, Cetuximabe, combinações de fármacos de Quimioterapia, Cisplatina, Crizotinib, Ciclofosfamida, Citarabina, Denosumabe, Docetaxel, Doxorrubicina, Eribulina, Erlotinibe, Etoposida, Everolimus, Exemestano, Filgrastim, Flourouracil, Fulvestranto, Gencitabina, Imatinibe, Imiquimode, Ipilimumabe, Ixabepilona, Lapatinib, Lenalidomida, Letrozol, Leuprolide, Mesna, Metrotrexato, Nivolumabe, Oxaliplatina, Paclitaxel, Palonosetrona, Pembrolizumabe, Pemetrexede, Prednisona, Rádio-223, Rituximabe, Sipuleucel-T, Sorafenibe, Sunitinibe, Talco Intrapleural, Tamoxifeno, Temozolomida, Tensirolimo, Talidomida, Trastuzumabe, Vinorrelbina ou ácido zoledrônico.

[0090] “Microambiente tumoral”, conforme descrito aqui, é um ambiente celular, em que existe um tumor. Sem ser limitante, o microambiente tumoral pode incluir vasos sanguíneos circundantes, células imunes, fibroblastos, células inflamatórias derivadas da medula óssea, linfócitos, moléculas de sinalização ou a matriz extracelular (ECM).

[0091] Em algumas modalidades, o método inclui terapia de tumor humano em que os pacientes recebem infusões de FL-PLE ou seus derivados em combinação com infusões de células T CAR específicas de FL. Neste cenário, este sistema representa um antígeno alvo universal utilizado em combinação com um CAR universal e/ou um CAR universal que expressa células efetoras antitumorais. Em algumas modalidades, um PLE (cadeia de alquila 18C) tendo um elemento de reconhecimento do CAR anexado a FL, que é anexado à colina do grupo de cabeça polar através de três espaçadores PEG repetidos, é fornecida. Uma biblioteca CAR antiFL pode ser gerada com diferentes fragmentos variáveis de cadeia simples (scFvs), tais como 6 ou mais scFvs diferentes, com constantes de dissociação variando de 200 fM a 10 nM, tal como 200 fM, 210 fM, 220 fM, 230 fM, 240 fM, 250 fM, 260 fM, 270 fM, 280 fM, 290 fM, 300 fM, 400 fM, 500 fM, 600 fM, 700 fM, 800 fM, 900 fM, 1 pM, 100 pM, 200 pM, 300 pM, 400 pM, 500 pM, 600 pM, 700 pM, 800 pM, 900 pM, 1 nM, 2 nM, 3 nM, 4 nM, 5 nM, 6 nM, 7 nM, 8 nM, 9 nM, ou 10 nm, ou uma quantidade dentro de uma faixa definida por quaisquer dois dos valores mencionados acima, que conectam o scFv ao elemento de espaçamento do CAR. Cada scFv se liga a FL de uma maneira ligeiramente diferente. Sem se ater à teoria, a ligação de scFv em FL é parcialmente devido à diferença nas afinidades de ligação através de mutações no local de ligação e devido ao fato de

que alguns scFvs foram derivados da exposição de fagos em comparação com a exposição de leveduras. Em algumas modalidades, três espaçadores diferentes (todos derivados de componentes de anticorpos) podem ser utilizados, incluindo, por exemplo: longo, dobradiça de lgG4 conectada a um domínio CH2 a um domínio CH3; médio, dobradiça de lgG4 conectada a um domínio CH3; e curto, apenas dobradiça de lgG4. Em algumas modalidades, somente células T CAR scFv específicas de FL com a orientação correta e comprimento espaçador exibem função antitumoral redirecionada tanto em tumores *in vitro* quanto *in vivo* carregados com FL PLE-CTCTs. Além disso, o formato e o tamanho do local de ligação do scFv podem desempenhar um papel em quão bem o CAR pode ativar.

[0092] Algumas modalidades aqui fornecidas se referem a uma célula T CAR específica de FL que compreende um domínio de direcionamento e reconhecimento apresentado em uma orientação correta com espaçamento e uma afinidade de ligação selecionada para criar uma resposta de células T desejada. Em algumas modalidades, o espaçamento é selecionado para gerar uma resposta de célula T nas células específicas de interesse. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação é selecionada para gerar uma resposta de célula T nas células específicas de interesse. Em algumas modalidades, diferentes tumores ou células se beneficiam da orientação diferente, diferentes comprimentos espaçadores e afinidades de células

T CAR para permitir respostas de células T CAR desejadas. Portanto, algumas modalidades aqui fornecidas, se referem à geração de uma combinação desejada ou selecionada de orientação, comprimento espaçador e afinidade de ligação para uma terapia selecionada.

[0093] Em algumas modalidades, uma indicação ou medida de células T CAR de sucesso *in vitro* incluem a lise celular e a produção de citocinas. Como descrito aqui em maiores detalhes, CARs de espaçadores curtos tipicamente não produzem citocinas; enquanto os CARs de espaçadores longos produzem uma grande quantidade de citocinas.

[0094] Em algumas modalidades, um antiFL(4D5Flu) CAR, que compreende a SEQ ID NO: 4 e que não é capaz de produzir citocinas com FL-PLE, é fornecido; ao passo que, quando células são marcadas com FL por outra abordagem, o antiFL(4D5Flu) CAR produz citocinas, destacando que a orientação do scFv para a fração FL de FL-PLE é uma variável importante e previamente irreconhecível na atividade da célula T. Em algumas modalidades, a redução da constante de dissociação, tal como a melhoria da afinidade de ligação, não melhora necessariamente a ativação do CAR. Em algumas modalidades, reatividade antitumoral de células T assimétricas não se correlaciona com o scFv KD. Em algumas modalidades, reatividade antitumoral de células T assimétricas pode ser dependente do comprimento espaçador.

Em algumas modalidades, um antiFL(FITC-E2 Mut2) CAR, que compreende a SEQ ID NO: 1, é um CAR robusto, que não pode ter sido previsto de qualquer conhecimento prévio da função da estrutura do CAR ou estudos de scFv. Em contraste, o campo ensina que a maior afinidade de scFv resulta no melhor CAR.

[0095] Em algumas modalidades, FL-PLE administrado a mamíferos portando tumor serve como um agente de direcionamento tumoral genérico que é retido na membrana plasmática da célula tumoral para reconhecimento pelas células T CAR específicas de FL. É fornecido aqui a identificação de um CAR específico de FL com robustez de sinalização de células T inesperada quando do acoplamento de células tumorais carregadas com FL-PLE. A presente descrição refere-se, em algumas modalidades, ao desenvolvimento completo de um FL-PLE de grau farmacêutico para ser utilizado em conjunto com um produto de células T CAR, incluindo em um kit. Outros haptenos poderiam substituir a FL com o CAR projetado para reagir com estes PLEs.

[0096] A TABELA 1 lista certas sequências de exemplo úteis com as modalidades aqui fornecidas.

TABELA 1

SEQ ID NO. (descrição)	SEQUÊNCIA
SEQ ID NO: 01 (scFv de antiFL(FITC-E2 Mut2 CAR)	SVLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAPKLMI YDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYCAAWDDSLS EFLFGTGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGNLVQPGGSLR LSCAASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGLEWVAGLSARSSLTHYADSVKGR FTISRDNAKNSVYLQMNSLRVEDTAVYYCARRSYDSSGYWGHFASYMD VWGQGTLVTVS
SEQ ID NO: 02 (CAR antiFL(4M5.3))	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQS PKVLIYKVSNRVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYFCSQS THVPWTFGGGTKLEIKSSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGGVKLDET GGGLVQPGGAMKLSCVTSGFTFGHYWMNWVRQSPEKGLEWVAQFRNKP YNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDTGIYYCTGASY GMEYLGQGTSVTVS
SEQ ID NO: 03 (scFv de antiFL(4420) CAR)	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSQGNTYLRWYLQKPGQS PKVLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQS THVPWTFGGGTKLEIGGGGSGGGGSGGGGSEVKLDETGGGLVQPGRPM KLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSV KGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSV TVSS
SEQ ID NO: 04 (scFv de antiFL(4D5Flu) CAR)	DYKDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSLVHSQGNTYLRWYQQKP GKAPKVLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSTHVPWTFGQGTKVELKRAGGGGSGGGGSGGGGSSGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMNWVRQAPGKGL EWVAQIRNKPYNYETYYADSVKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT AVYYCTGSYYGMDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 05 (scFv de CAR antiFL(FITCE2))	SVLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAPKLMI YDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYCAAWDDSLS EFLFGTGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGNLVQPGGSLR LSCAASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGLEWVAGLSARSSLTHYADSVKGR FTISRDNAKNSVYLQMNSLRVEDTAVYYCARRSYDSSGYWGHFYSYMD VWGQGTLVTVS
SEQ ID NO: 06 (scFv de antiFL(FITCE2 HisH131Ala))	SVLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAPKLMI YDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYCAAWDDSLS EFLFGTGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGNLVQPGGSLR LSCAASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGLEWVAGLSARSSLTHYADSVKGR FTISRDNAKNSVYLQMNSLRVEDTAVYYCARRSYDSSGYWGAFYSYMD VWGQGTLVTVS
SEQ ID NO: 07 (dobradiça de lgG4 conectada a domínio CH2 a um espaçador de domínio CH3)	ESKYGPPCPPCPAPEFDGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
SEQ ID NO: 08 (dobradiça de lgG4 conectada a um espaçador de domínio CH3)	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO. (descrição)	SEQUÊNCIA
SEQ ID NO: 09 (espaçador da dobradiça de lgG4 apenas)	ESKYGPPCPPCP
SEQ ID NO: 10 (sequência de ácido nucleico CAR do fragmento de anticorpo antifluoresceína de E2)	ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCA GCATTCCTCCTGATCCCAAGCGTGCTGACACAGCCTAGCTCCGTGTCT GCCGCCCCTGGCCAGAAAGTGACCATCAGCTGTAGCGGCAGCACCAGC AACATCGGCAACAACTACGTGTCCTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAG GCCCCCAAGCTGATGATCTACGACGTGTCCAAGCGGCCCAGCGGCGTG CCCGATAGATTTTCCGGCAGCAAGAGCGGCAACAGCGCCAGCCTGGAT ATCAGCGGCCTGCAGTCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCC TGGGACGATAGCCTGAGCGAGTTCCTGTTTGGCACCGGCACCAAGCTG ACAGTGCTGGGCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGAAGTGGCGGA GGGGGATCTCAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCAACCTGGTGCAG CCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTC GGCAGCTTCAGCATGAGCTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGGGGAGGACTG GAATGGGTGGCAGGACTGAGCGCCAGAAGCAGCCTGACCCACTACGCC GATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAC AGCGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGTGGAAGATACCGCCGTG TACTACTGCGCCAGACGGTCCTACGACAGCAGCGGCTACTGGGGCCAC TTCTACAGCTACATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACAGTG TCTGAGAGCAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAG TTCGACGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGAC ACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGC GTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCCAG AGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG CTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCC AGCAGCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAG CCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCAGGAAGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACC ACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGG CTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTG AGCCTGTCCCTGGGCAAGATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGG GTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTT TGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA TTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGC CGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGGGTGAAGTTC AGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTG TACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGGAT AAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAG AACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCC GAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAG GGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACC TACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGGCTCGAGGGCGGC GGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAAT CCCGGCCCTAGGATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAG TTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGA ATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAAT ATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATC CTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTG GATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGG

SEQ ID NO. (descrição)	SEQUÊNCIA
	TTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCC TTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAG TTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGC TCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAGGAAACAAA AATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACC TCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGC AAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGC TGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGA GGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGG GAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTG CCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACTGT ATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGC CCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCA GACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGA TGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATC CCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTG GTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGTGA
SEQ ID NO: 11 (sequência de aminoácidos CAR do fragmento de anticorpo antifluoresceína E2)	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPSVLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTS NIGNNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLD ISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSEFLFGTGTKLTVLGGGGGSGGGGSGG GGSQVQLVESGGNLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGL EWVAGLSARSSLTHYADSVKGRFTISRDNAKNSVYLQMNSLRVEDTAV YYCARRSYDSSGYWGHFYSYMDVWGQGTLVTVSESKYGPPCPPCPAPE FDGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF WVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPRLEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMLLLVTSLLLCE LPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHI LPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHA FENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNK NLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGC WGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECL PQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYA DAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLV VALGIGLFM
SEQ ID NO: 12 (sequência de aminoácidos 4M5.3-CAR)	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS QSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIYKVSNRVSGVPDRFSGSGSGT DFTLKINRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKSSADDAKKDA AKKDDAKKDDAKKDGGVKLDETGGGLVQPGGAMKLSCVTSGFTFGHYW MNWVRQSPEKGLEWVAQFRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSV YLQMNNLRVEDTGIYYCTGASYGMEYLGQGTSVTVSESKYGPPCPPCP APEFDGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAF IIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELR VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT

SEQ ID NO. (descrição)	SEQUÊNCIA
	KDTYDALHMQALPPRLEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMLLLVTSLL LCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGD LHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTD LHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIS GNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSP EGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHP ECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLL LLVVALGIGLFM
SEQ ID NO: 13 (sequência de nucleotídeo 4M5.3-CAR)	ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCA GCATTCCTCCTGATCCCAGACGTTGTAATGACCCAGACCCCTCTGTCT CTCCCCGTAAGCTTGGGCGACCAGGCGAGCATCTCTTGTCGGTCTTCC CAGTCCCTGGTCCATTCAAACGGCAATACTTACTTGCGGTGGTACTTG CAGAAGCCCGGTCAATCCCCAAAAGTGCTGATATACAAGGTTAGCAAT CGGGTCAGTGGAGTGCCCGACCGCTTCAGCGGAAGCGGATCCGGGACT GACTTCACTCTGAAGATCAACCGGGTAGAAGCTGAAGACCTGGGGGTG TACTTCTGCTCTCAGTCAACACACGTGCCATGGACCTTTGGAGGTGGC ACCAAGCTGGAAATCAAATCATCAGCGGACGATGCCAAAAAAGACGCG GCCAAGAAGGACGATGCCAAGAAGGATGATGCTAAAAAGGATGGCGGA GTCAAATTGGACGAGACAGGCGGGGGACTGGTGCAGCCCGGCGGTGCC ATGAAACTGTCTTGTGTGACCAGCGGCTTTACCTTCGGGCATTATTGG ATGAACTGGGTGCGACAGTCTCCAGAGAAAGGGCTCGAGTGGGTGGCC CAGTTTCGAAATAAACCGTACAATTATGAGACCTACTATTCAGATTCT GTGAAAGGGCGCTTCACTATTTCACGCGACGACAGCAAAAGTTCCGTC TACCTTCAGATGAACAACCTTAGAGTGGAGGATACCGGAATATACTAC TGCACGGGTGCCAGTTATGGCATGGAGTACTTGGGGCAGGGGACATCT GTGACCGTTTCTGAGAGCAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCT GCCCCCGAGTTCGACGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAG CCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTTCAATTGGTAC GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAA CAGTTCCAGAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCAC CAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG GGCCTGCCCAGCAGCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAG CCTCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCAGGAAGAGATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAAC TACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG TACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTC TTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATGTTCTGGGTGCTGGTGGTG GTGGGCGGGGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGACAGTGGCCTTC ATCATCTTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTC AAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGC TGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGG GTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAG AATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGAC GTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCT CGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGAC AAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGG CGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACC AAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGGCTC GAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTG GAGGAGAATCCCGGCCCTAGGATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTG CTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTG

SEQ ID NO. (descrição)	SEQUÊNCIA
	TGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAAT GCTACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGAT CTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACT CCTCCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAA ATCACAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGAC CTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAA CATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTG GGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCA GGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTG TTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAA AACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCC GAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAAT GTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGT GAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCA GAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCA GACAACTGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC AAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGG AAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGC ACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGG CCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTG CTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGTGA

Métodos de terapia

[0097] Algumas modalidades dos métodos e composições aqui fornecidas incluem métodos para tratar ou melhorar ou inibir um câncer em um indivíduo. Algumas dessas modalidades incluem a administração de uma quantidade eficaz ao indivíduo de uma composição compreendendo um lipídio conjugado a uma fração alvo, em que a fração alvo compreende uma fração de mascaramento; e a administração de uma célula, tal como uma população das células, ao indivíduo, em que a célula compreende um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de células T (TCR), que se liga especificamente à fração alvo na ausência da fração de mascaramento, em que o CAR ou TCR compreende: uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 95% de identidade com uma sequência selecionada

de SEQ ID NO: 01-06; e/ou um domínio espaçador compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em: uma dobradiça de lgG4 conectada a um domínio CH2 a um domínio CH3, tal como um espaçador longo tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 07 ou tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 07; uma dobradiça de lgG4 conectada a um domínio CH3, tal como um espaçador médio tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 08 ou tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 08; ou uma dobradiça de lgG4, tal como um espaçador curto tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 09 ou tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 09.

[0098] Em algumas modalidades, o CAR ou TCR compreende uma sequência de aminoácidos selecionada da SEQ ID NO: 1-6. Em algumas modalidades, o espaçador compreende um comprimento de 229 aminoácidos. Em algumas modalidades, o CAR ou TCR compreende um domínio scFv tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 (FITC-E2 Mut2); e um domínio espaçador que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 07 (um espaçador longo exemplar). Em algumas modalidades, o CAR ou TCR compreende um domínio scFv tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 (4M5.3); e um domínio espaçador que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 07 (um

espaçador longo exemplar). Em algumas modalidades, o CAR ou TCR compreende: um domínio scFv tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 5 (FITC-E2); e um domínio espaçador que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 07 (um espaçador longo exemplar).

[0099] Algumas modalidades dos métodos e composições aqui fornecidas incluem métodos método para tratar, melhorar ou inibir um câncer em um indivíduo compreendendo (a) introduzir, fornecer ou administrar a um indivíduo uma composição que compreende um lipídeo, que compreende uma fração alvo que está ligada a uma fração de mascaramento; (b) introduzir, fornecer ou administrar ao referido indivíduo uma célula compreendendo um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de célula T (TCR), que é específico para a fração alvo uma vez que a fração de mascaramento é removida da fração alvo, em que o CAR ou TCR compreende um domínio espaçador com um comprimento espaçador de 1 a 22 aminoácidos, 23 a 50 aminoácidos, 51 a 100 aminoácidos, 100 a 150 aminoácidos ou 151 a 250 aminoácidos, em que: o CAR ou TCR compreende uma sequência selecionada da SEQ ID NO: 01-06; e/ou o domínio espaçador compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em: uma dobradiça de IgG4 conectada a um domínio CH2 a um domínio CH3, tal como um espaçador longo tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 07 ou tendo

uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 07; uma dobradiça de IgG4 conectada a um domínio CH3, tal como um espaçador médio tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 08 ou tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 08; ou uma dobradiça de IgG4, tal como espaçador curto tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 9 ou tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 09; (c) remover a fração de mascaramento da fração alvo, permitindo assim que a fração alvo se ligue ao CAR presente na célula; e (d) opcionalmente, medir ou avaliar a ligação da célula compreendendo o CAR ao lipídeo, após as etapas a - c; e/ou (e) opcionalmente, medir ou avaliar o tratamento, melhoria ou inibição do referido câncer após as etapas a - d; e/ou (f) opcionalmente, identificar um indivíduo necessitado de uma terapia para câncer antes das etapas a - c.

[00100] Em algumas modalidades, a célula é fornecida ao indivíduo ao mesmo tempo ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 24, 36 ou 48 horas antes ou depois da administração da composição, ou a qualquer momento dentro de um intervalo definido por quaisquer dois valores mencionados acima. Em algumas modalidades, a célula é fornecida ao indivíduo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 24, 36 ou 48 horas antes da administração da composição, ou a qualquer momento dentro de um intervalo definido por

quaisquer dois valores mencionados acima. Em algumas modalidades, a célula é fornecida ao indivíduo dentro de segundos ou minutos, tal como menos de uma hora, para fornecer a composição ao indivíduo.

[00101] Em algumas modalidades, um impulso da célula e/ou da composição é fornecido ao indivíduo.

[00102] Em algumas modalidades, uma terapia adicional ao câncer é fornecida ao referido indivíduo, tal como uma molécula pequena, por exemplo, um composto químico, uma terapia de anticorpos, por exemplo, um anticorpo monoclonal humanizado com ou sem conjugação a um radionuclídeo, toxina ou fármaco, cirurgia e/ou radiação.

[00103] Em algumas modalidades, o câncer é um tumor sólido. Em algumas modalidades, o câncer é câncer de cólon, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer de próstata, melanoma, câncer de rim, câncer de pâncreas, câncer de cérebro, glioblastoma, neuroblastoma, meduloblastoma, sarcoma, câncer ósseo, câncer de bexiga, câncer de cabeça e pescoço ou câncer de fígado. Em algumas modalidades, o câncer é um tumor não sólido, tal como uma leucemia ou mieloma múltiplo. Exemplos de tumores sólidos incluem sarcomas, carcinomas e linfomas. Mais exemplos de cânceres, tais como tumores sólidos e não sólidos são listados em Amin, M.B., *et al.*,. (Eds.). AJCC Cancer Staging Manual (8ª edição). Springer International

Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017, que é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

[00104] Em algumas modalidades, a ligação da fração alvo ao CAR presente na célula induz a produção de pelo menos uma citocina. Em algumas modalidades, em que pelo menos uma citocina compreende IL-2, TNF-α e/ou INF-α.

[00105] Em algumas modalidades, o lipídeo compreende um grupo de cabeça polar e um grupo hidrofóbico. Em algumas modalidades, a cabeça polar compreende um grupo colina, fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfoetanolamina, um resíduo de oligossacarídeo, um resíduo de açúcar, fosfatidilserina ou fosfatidilinositol. Em alguns, o grupo de cabeça polar compreende fosfocolina, uma fração piperidina ou uma fração trimetilarseno-etil-fosfato. Em algumas modalidades, o grupo hidrofóbico é ácido graxo, tal como uma cadeia alifática. Em algumas modalidades, o ácido graxo é saturado ou insaturado. Em algumas modalidades, o grupo hidrofóbico compreende um grupo alquila, alquenila ou alquinila. Em algumas modalidades, o grupo hidrofóbico compreende um lipídio terpenoide, tal como um esteroide ou colesterol. Em algumas modalidades, o grupo hidrofóbico compreende uma ligação éter, em que a ligação éter está entre o grupo de cabeça polar e a cadeia alifática. Em algumas modalidades, o resíduo de açúcar é um glicerol ou um álcool de açúcar. Em algumas modalidades, o grupo hidrofóbico

compreende uma cadeia alquila de carbono, em que a cadeia alquila de carbono compreende 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 carbonos ou qualquer número que está dentro de um intervalo definido por quaisquer dois valores mencionados acima. Em algumas modalidades, a cadeia alquila de carbono compreende 18 carbonos. Em algumas modalidades, o lipídio é um éter fosfolipídico.

[00106] Em algumas modalidades, a fração alvo é biotina, digoxigenina, dinitrofenol ou fluoresceína, ou um derivado da mesma. Em algumas modalidades, a fração alvo é fluoresceína ou um derivado da mesma.

[00107] Em algumas modalidades, o espaçador compreende um espaçador de polietileno glicol (PEG), um espaçador Hapteno (2x) ou uma cadeia de alcano. Em algumas modalidades, o espaçador PEG compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 moléculas de PEG, ou qualquer quantidade de moléculas de PEG que estão dentro de um intervalo definido por quaisquer dois valores mencionados acima.

[00108] Em algumas modalidades, a célula é uma célula T precursora. Em algumas modalidades, a célula T precursora é uma célula-tronco hematopoiética. Em algumas modalidades, células T CD8+ ingênuas, células T CD8+ de memória central, células T CD8+ de memória efetora e células T CD8+ em massa. Em algumas modalidades, a célula é uma célula linfocitária

auxiliar T CD4+ que é selecionada a partir do grupo que consiste em células T CD4+ ingênuas, células CD4+ de memória central, células T CD4+ de memória efetora e células T CD4+ em massa.

Kits

[00109] Algumas modalidades dos métodos e composições aqui fornecidas incluem kits. Em algumas modalidades, um kit pode incluir um lipídio de grau farmacêutico conjugado com uma fração de direcionamento.

[00110] Em algumas modalidades, o lipídeo compreende um grupo de cabeça polar e um grupo hidrofóbico. Em algumas modalidades, a cabeça polar compreende um grupo colina, fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfoetanolamina, um resíduo de oligossacarídeo, um resíduo de açúcar, fosfatidilserina ou fosfatidilinositol. Em algumas modalidades, o grupo de cabeça polar compreende fosfocolina, uma fração piperidina ou uma fração trimetilarseno-etil-fosfato. Em algumas modalidades, o grupo hidrofóbico é ácido graxo, tal como uma cadeia alifática. Em algumas modalidades, o ácido graxo é saturado ou insaturado. Em algumas modalidades, o grupo hidrofóbico compreende um grupo alquila, alquenila ou alquinila. Em algumas modalidades, o grupo hidrofóbico compreende um lipídio terpenoide, tal como um esteroide ou colesterol. Em algumas modalidades, o grupo hidrofóbico compreende uma ligação éter, em que a ligação

éter está entre o grupo da cabeça polar e a cadeia alifática. Em algumas modalidades, o resíduo de açúcar é um glicerol ou um álcool de açúcar. Em algumas modalidades, o grupo hidrofóbico compreende uma cadeia alquila de carbono, em que a cadeia alquila de carbono compreende 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 carbonos ou qualquer número que está dentro de um intervalo definido por quaisquer dois valores mencionados acima. Em algumas modalidades, a cadeia alquila de carbono compreende 18 carbonos. Em algumas modalidades, o lipídio é um éter fosfolipídico.

[00111] Em algumas modalidades, a fração alvo é biotina, digoxigenina, dinitrofenol ou fluoresceína, ou um derivado da mesma. Em algumas modalidades, a fração alvo é fluoresceína ou um derivado da mesma.

[00112] Em algumas modalidades, o espaçador compreende um espaçador de polietileno glicol (PEG), um espaçador Hapteno (2x) ou uma cadeia de alcano. Em algumas modalidades, o espaçador PEG compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 moléculas de PEG, ou qualquer quantidade de moléculas de PEG que estão dentro de um intervalo definido por quaisquer dois valores mencionados acima.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Preparação de células T CAR

[00113] Células T foram isoladas a partir de “cones”

de redução de leucócitos que normalmente são descartados após a plaquetaférese. Especificamente, a centrifugação de densidade Ficoll foi usada para gerar as células T contendo a fração de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e as células T CD8+ e CD4+ foram sequencialmente purificadas utilizando os kits de enriquecimento magnético apropriados. Células T foram imediatamente colocadas na produção de CAR no mesmo dia do isolamento. Células T, variando de 0,5 - 5 milhões de células, foram estimuladas com esferas ativadoras de CD3/CD28 anti-humanas em uma proporção de 1:1 no Dia 0. Em algumas alternativas, as concentrações das células podem variar entre 0,5, 1, 2, 3, 4 ou 5 milhões de células que são produzidas para uso com as esferas ativadoras CD3/CD28 de anti-humanas.

[00114] Nos dias 1-3 de estimulação, células T foram transduzidas com CAR contendo lentivírus em uma multiplicidade de infecção (MOI) variando de 1 a 6 na presença de sulfato de protamina através de spinoculation. Trocas de meio pela metade ou por completo foram conduzidas a cada 2-3 dias para manter as culturas celulares em densidades celulares apropriadas e expandidas para recipientes de cultura maiores, conforme necessário. Em geral, células foram movidas para recipientes de cultura maiores quando as concentrações celulares atingem 1,5 - 2 milhões de células/mL ou quando as culturas parecem

visivelmente densas e o meio é amarelo. Começando no Dia 0 e para cada alimentação celular, células T CD4+ foram reconstituídas com rhIL-7 fresco e rhlL-15 em uma concentração final de 50 ng/mL e 0,5 ng/mL, respectivamente, e células T CD8+ foram reconstituídas com rhIL-2 fresco e rhIL-15 a uma concentração final de 50 U/mL e 0,5 ng/mL, respectivamente. Esferas ativadoras foram magneticamente removidas nos Dias 9-11 da estimulação.

[00115] Para células T CAR que não continham DHFRdm para seleção mediada por metotrexato de expressão CAR (tais como aquelas utilizadas nos exemplos ilustrados na Figura 8B, Figura 15A, Figura 15C, Figura 15D, Figura 15D, Figura 15E, Figura 18C, Figura 19b, Figura 19C, Figura 21A e Figura 21B), as células foram magneticamente classificadas com base na expressão de EGFRt repórter usando anticorpo biotinilado e microesferas anti-biotina durante os Dias 10-21 da cultura. Para as células T CAR que continham DHFRdm para enriquecimento mediado por metotrexato de expressão CAR (tais como aquelas utilizadas nos exemplos ilustrados na Figura 9, Figura 10, Figura 12, Figura 13, Figura 14A e Figura 14B), as células foram primeiramente tratadas nos Dias 7-14 da cultura com 50 nM de metotrexato, então aumentaram para 100 nM de metotrexato nos Dias 14-19 da cultura, e finalmente reduzidas de volta para 50 nM durante os Dias 19-21 da cultura. Para evitar que as culturas

quebrem devido à baixa viabilidade celular da seleção de metotrexato, células foram separadas em Ficoll no Dia 12 da cultura para remover células mortas e melhorar a viabilidade da cultura.

[00116] No Dia 14 ou 21 da cultura, 0,5 - 2 milhões de células T para cada CAR foram colocadas em um protocolo de expansão rápida (REP) com PBMCs de alimentação irradiada e células TM-LCL. Se PBMCs frescas, não congeladas foram utilizadas, 25 milhões de PBMCs e 5 milhões de células TM-LCL foram utilizadas em cada cultura REP. Se PBMCs congeladas foram utilizadas, estes números de células de alimentação foram duplicados. Células PBMCs e TM-LCL foram irradiadas a 3500 e 8000 rads, respectivamente, utilizando um irradiador de fonte de Césio. Além das citocinas normais mencionadas acima, células também foram suplementadas com anticorpo OKT3 a 30 ng/μL para os Dias 0-5 de REP para fornecer estimulação aguda de TCR. Células de alimentação irradiada desintegraram-se no Dia 5 de REP, e as células T CAR foram mantidas de forma semelhante às descritas aqui. Para células T CAR que continham DHFRdm para enriquecimento mediado por metotrexato de expressão CAR (tais como aquelas utilizadas nos exemplos ilustrados na Figura 9, Figura 10, Figura 12, Figura 13, Figura 14A e Figura 14B), 100 nM de metotrexato não foram introduzidos até o Dia 5 de REP e foram mantidos até o dia 12 de REP para enriquecer ainda mais células CAR-

positivas. No Dia 14 de REP, todas as células T CAR descritas aqui foram introduzidas em ensaios de citotoxicidade de liberação de cromo funcional (Células T CD8+ apenas) assim como em ensaios de liberação de citocina 3-plex funcional (células T CD4+ e CD8+).

Exemplo 2 - Ensaios de Citotoxicidade e liberação de cromo

[00117] Células alvo foram incubadas com ^{51}Cr durante a noite. Para células alvo que recebem os CTCT-PLEs, o CTCT-PLE também estava presente no meio durante a noite com o ^{51}Cr. No dia seguinte, as células alvo foram lavadas e semeadas em uma placa de 96 cavidades a uma concentração de 5000 células por cavidade. CD8+ antiFL e efetores de célula T simulada (usualmente no dia 8-16 de um protocolo de expansão rápida) foram lavados, semeados com as células alvo em triplicata em diversas proporções E:T (30:1, 10:1, 3:1, 1:1) e deixados para coincubar por 4 horas a 37° C. Além disso, para avaliar a liberação de ^{51}Cr controlada, cada linhagem de células alvo foi semeada com meios somente e para liberação máxima de ^{51}Cr, cada linhagem de célula alvo foi semeadas e lisadas com SDS a 2%. Grupos de controle foram feitos em sextuplicata. Após coincubação, o sobrenadante foi coletado, dispensado em placas LUMA e deixado secar durante a noite. As amostras do dia seguinte foram executadas no instrumento Top Count. A lise percentual-específica foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{(liberação experimental de } {}^{51}\text{Cr}) - \text{(liberação controlada de } {}^{51}\text{Cr})}{\text{(liberação máxima de } {}^{51}\text{Cr}) - \text{(liberação controlada de } {}^{51}\text{Cr})} \times 100$$

[00118] Ver, por exemplo, Gonzalez, S., Naranjo, A., Serrano, L. M., Chang, W.-C, Wright, C. L., & Jensen, M.C. (2004). Genetic engineering of cytolytic T lymphocytes for adoptive T-cell therapy of neuroblastoma. The Journal of Gene Medicine, 6(6), 704–711, aqui expressamente incorporado por referência em sua totalidade.

Exemplo 3 - Ensaio de liberação de citocina

[00119] Para células alvo que receberam os CTCT-PLEs, o CTCT-PLE foi incubado em meio durante a noite. No dia seguinte, todas as células alvo foram coletadas, lavadas e semeadas em uma placa de 96 cavidades a uma concentração de $5x10^4$ células por cavidade. CD8+ antiFL e efetores de célula T simulada (usualmente no dia 8-16 de um protocolo de expansão rápida) foram lavados e semeados ($lxlO^5$ células/cavidade) com as células alvo deixadas para coincubar por 24 horas a 37°C. Após 24 horas, o sobrenadante foi coletado e a concentração de IFN-gamma, TNF-alpha e IL-2 no sobrenadante foi medida utilizando-se um sistema Bio-Plex ® 200 (Bio-Rad).

Exemplo 4 - Análise FACS para expressão de EGFRt e CAR antiFL

[00120] Células T CD8+ contendo CARs antiFL foram coradas para ligação EGFRt ou antiFL. A Figura 6 ilustra a positividade celular das células T CD8+ antiFL(FITC-E2) CARs através da coloração para o marcador de seleção EGFRt. (a) antiFL(FITC-E2) CAR que compreendia a SEQ ID NO: 5 [96% positivo] (b) CAR antiFL(4M5.3) que compreendia a SEQ ID NO: 2 [80% positivo]. Para testar a capacidade de CARs antiFL de se ligar a FL, um anticorpo CD19-FITC de camundongo foi incubado com as células T e lavado. Anticorpo anti-camundongo-Fc-Alexa647 foi corado para o anticorpo FITC ligado (c) antiFL(FITC-E2) CAR [97% positivo] e (d) CAR antiFL(4M5.3) [79% positivo]. As duas diferentes colorações deram a mesma positividade confirmando a relação de um para um do CAR com marcador de superfície e que o CAR antiFL pode se ligar a FL. Os domínios de ligação dos CARs podem compreender uma sequência como apresentada na SEQ ID NO: 1-6, e os domínios espaçadores, que também podem fazer parte dos CARs, podem compreender uma sequência como apresentada na SEQ ID NO: 7-9.

Exemplo 5 - Reconhecimento de células T CAR e ativação através de FL-PLE *in vitro*

[00121] Células T contendo CARs antiFL foram testadas para ligação ao FL-PLE e ativação. A Figura 7A, Figura 7B e Figura 7C mostram o reconhecimento de células T CAR e ativação através de FL-PLE *in vitro*. Células K562 (leucemia)

foram incubadas com FL-PLE durante a noite. A integração celular de FL-PLE foi analisada por citometria de fluxo (Figura 7A). Houve um claro deslocamento do parental K562 de controle com o parental K562 incubado com FL-PLE 5 μM, ao passo que houve um deslocamento muito ligeiro com o parental K562 incubado com FL-PLE 0,5 μM. Este ligeiro deslocamento correspondeu a uma diferença na quantidade de FL exposta na superfície da célula para o reconhecimento de células T CAR. Além disso, as células K562 OKT3+ (uma linhagem celular criada para testar a ativação endógena de células T através do TCR) corresponderam exatamente ao parental K562. Estas células foram utilizadas em um ensaio de liberação de cromo (Figura 7B) e um ensaio de liberação de citocina (Figura 7C) para testar a ativação de células T CD8+ antiFL(FITC-E2) CAR em comparação com as células T CD8+ simuladas da Figura 6. A partir destes experimentos, as células T antiFL(FITC-E2) CAR reconheceram a fração FL do FL-PLE integrada na membrana plasmática e que as células foram ativadas. A quantidade da ativação foi associada com a quantidade de FL exposta na superfície da célula.

[00122] A Figura 8A e Figura 8B ilustram a universalidade da carga de FL-PLE em células tumorais e o reconhecimento da fração fluoresceína por células T CAR antiFL. Células K562 (leucemia), U87 (glioblastoma), 251T

(glioma), Be2 (neuroblastoma), MDA-MB-231 (adenocarcinoma), NIH OVCAR (adenocarcinoma) e 143B (osteossarcoma) foram incubadas com FL-PLE durante a noite. A integração celular de FL-PLE foi analisada por citometria de fluxo (Figura 8A). Houve um claro deslocamento das linhagens celulares parentais de controle com as linhagens celulares parentais incubadas com FL-PLE 5 μM correspondendo à quantidade de FL exposta na superfície da célula para o reconhecimento de células T CAR. Além disso, as células K562 OKT3+ (uma linhagem celular criada para testar a ativação endógena de células T através do TCR) corresponderam exatamente ao parental K562, como esperado. Estas células foram usadas em um ensaio de liberação de cromo (Figura 8B) para testar a resposta citotóxica de células T CD8+ antiFL(FITC-E2) CAR em comparação com células T CD8+ simuladas. Estes experimentos demonstraram que as células T antiFL(FITC-E2) CAR reconheceram a fração FL do FL-PLE integrada na membrana plasmática de múltiplos tipos diferentes de câncer e que as células T CAR são capazes de lisar os alvos.

Exemplo 6 – Seleção de metotrexato de células T CAR

[00123] Células T CAR foram selecionadas com metotrexato. A Figura 9 mostra células T CAR CD8+ antiFL selecionadas por metotrexato, um quimioterápico no qual os CARs antiFL incluem CARs com domínio scFv FITC-E2 e um espaçador longo, médio ou curto, e outros CARs tendo um

domínio antiFL scFv como marcado e um espaçador longo. Positividade do CAR de coloração de células T CAR CD8+ antiFL para o marcador de superfície EGFRt. Estes CARs antiFL também abrigavam um gene para um di-hidrofolato redutase mutante duplo (DHFRdm) que conferia resistência ao metotrexato para o enriquecimento mediado por metotrexato de células CAR-positivas. Toda linhagem celular, exceto as células EGFRt+ mínimas, foram diluídas com células T simuladas para fazer estoques equivalentes para uso em ensaios funcionais. Alvo: 18,1% EGFRt+. Real: cerca de 13-20% de EGFRt+.

[00124] A Figura 10 mostra outro exemplo no qual células T CAR CD4+ antiFL são selecionadas por metotrexato, um quimioterápico. Positividade do CAR de células T CAR CD4+ antiFL através da coloração para o marcador de superfície EGFRt. Estes CARs antiFL também abrigam um gene para um di-hidrofolato redutase mutante duplo (DHFRdm) que confere resistência ao metotrexato e, portanto, permite o enriquecimento mediado por metotrexato de células CAR-positivas. Toda linhagem celular, exceto as células EGFRt+ mínimas, foram diluídas com células T simuladas para fazer estoques equivalentes para uso em ensaios funcionais. Alvo: 18,1% EGFRt+. Real: cerca de 15-24% de EGFRt+.

Exemplo 7 – Marcação de células com FL-PLE

[00125] Células alvo foram marcadas com FL-PLE. A Figura 11 mostra a carga de células com FL-PLE. Células alvo

para ensaios funcionais foram feitas utilizando células K562 e células MDA-MB-231. Cada grupo celular foi marcado com FL-PLE. A integração celular de FL-PLE à membrana plasmática foi analisada por citometria de fluxo.

Exemplo 8 - Ensaios de citotoxicidade de células T CAR

[00126] Citotoxicidade das células T CAR foi testada. A Figura 12 mostra ensaios de citotoxicidade da célula T CAR CD8+ antiFL. Células MDA-MB-231 foram incubadas com FL-PLE. A integração celular de FL-PLE foi analisada por citometria de fluxo. Estas células e as células T CAR foram utilizadas em um ensaio de liberação de cromo. Os controles negativos (Parental K562 E MDA-MB-231) não mostraram morte e o controle positivo (células K562 OKT3+) mostrou lise celular, como esperado. Para as células MDA-MB-231 marcadas com FL-PLE, o CAR longo quase não superou o médio; ao passo que, apenas uma pequena morte foi vista com o CAR curto. Estes resultados demonstraram a importância do comprimento espaçador para a lise de célula T CAR de células alvo e o método de marcação do hapteno para uma célula foi útil para decidir sobre um comprimento espaçador.

[00127] A Figura 14A mostra ensaios de células T CAR CD8+ antiFL com diferentes scFv antiFL. Células MDA-MB-231 foram incubadas com FL-PLE. A integração celular de FL-PLE foi analisada por citometria de fluxo. Estas células e as células T CAR foram utilizadas em um ensaio de liberação de

cromo. Os controles negativos (Parental K562 E MDA-MB-231) não mostraram morte e o controle positivo (células K562 OKT3+) mostrou lise celular, como esperado (Figura 14A). Este ensaio de cromo testou quatro antiFL scFv diferentes no contexto de um CAR longo. Para células MDA-MB-231 marcadas com FL-PLE, três dos CARs antiFL mostraram lise equivalente; ao passo que, o antiFL(4D5Flu) que compreendia a SEQ ID NO: 4 exibiu quase nenhuma morte. AntiFL(4D5Flu) em outros experimentos mostrou a capacidade de lise de células marcadas com FL. Consequentemente, AntiFL(4D5Flu) não foi orientado na relação correta para reconhecer a fração FL no FL-PLE quando integrado em uma membrana celular.

Exemplo 9 - Ensaios de liberação de citocina de células T CAR

[00128] A liberação de citocina de células T CAR foi testada. A Figura 13 ilustra ensaios de liberação de citocina de células T CAR CD4+ antiFL. Células K562 e MDA-MB-231 foram incubadas com FL-PLE. A integração celular de FL-PLE foi analisada por citometria de fluxo. Estas células e as células T CAR antiFL foram utilizadas em um ensaio de liberação de citocina. Os controles negativos (Parental K562 E MDA-MB-231) não mostraram nenhuma produção de citocina e o controle positivo (células K562 OKT3+) mostrou a produção de todas as três citocinas para todas as linhagens celulares. Este ensaio foi projetado para estudar a relação entre o comprimento

espaçador do CAR e FL-PLE. Estes dados mostram que somente o CAR de espaçador longo, em relação com FL-PLE, foi capaz de produzir todas as três citocinas.

[00129] A Figura 14B ilustra ensaios de liberação de citocina de células T CAR CD4+ antiFL com diferentes antiFL scFv. Células K562 e MDA-MB-231 foram incubadas com FL-PLE. A integração celular de FL-PLE foi analisada por citometria de fluxo. Estas células e as células T CAR foram utilizadas em um ensaio de liberação de citocina. Os controles negativos (Parental K562 E MDA-MB-231) não mostraram nenhuma produção de citocina e o controle positivo (células K562 OKT3+) mostrou a produção de todas as três citocinas para todas as linhagens celulares. Este ensaio de liberação de citocina testou cinco antiFL scFv diferentes no contexto de um CAR longo. Das células K562 marcadas com FL-PLE 5 µM, somente quatro dos CARs antiFL mostraram ativação. Como a quantidade de FL-PLE foi reduzida para 500 nM nas células K562, antiFL(4M5.3) que compreendia a SEQ ID NO: 2 e antiFL(FITC-E2 Mut2) que compreendia a SEQ ID NO: 1 produziram a maioria das citocinas com apenas antiFL(FITC-E2 Mut2) que foi capaz de produzir IL2. Além disso, antiFL(4M5.3) e antiFL(FITC-E2 Mut2) produziram a maioria das citocinas com células MDA-MB-231 marcadas com FL-PLE 5 µM. AntiFL(4M5.3) e antiFL(FITC-E2 Mut2) mostraram a melhor ativação com FL-PLE e tinham constantes de dissociação vastamente diferentes, 270 fm e

3,1 nM respectivamente, mostrando que apenas a diminuição da constante de dissociação de um CAR não necessariamente contribuiu para o melhor CAR. O CAR que não funcionou em conjunto com FL-PLE foi antiFL(4D5Flu), que compreendia a SEQ ID NO: 4. AntiFL(4D5Flu) não exibiu nenhuma produção de citocina em qualquer linhagem celular marcada com FL-PLE 5 µM. Em outros experimentos, antiFL(4D5Flu) mostrou a capacidade de lise de células marcadas com FL. Consequentemente, antiFL(4D5Flu) não foi orientado na relação correta para reconhecer a fração FL no FL-PLE quando integrado em uma membrana celular.

[00130] Três CARs antiFL (4M5.3, FITC-E2 e FITC-E2 Mut2) com espaçador longo demonstraram rendimento funcional aprimorado foram testados posteriormente. Células T CAR foram preparadas com cada CARs antiFL. A Figura 15A mostra a população celular pura de células T CARs antiFL CD4+ e CD8+ através de coloração para o marcador de seleção EGFRt. Células K562 (leucemia) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma) foram incubadas com FL-PLE durante a noite e a integração celular de FL-PLE foi analisada por citometria de fluxo (Figura 15B). Houve um claro deslocamento das linhagens de células parentais de controle com as linhagens de células parentais incubadas com FL-PLE 5 µM correspondendo à quantidade de FL exposta na superfície da célula para o reconhecimento de células T CAR. As células T CAR preparadas foram testadas em

um ensaio de liberação de cromo (Figura 15C) e em um ensaio de liberação de citocina (Figura 15D e Figura 15E) para testar a ativação de células T CAR antiFL otimizadas em comparação entre si e células T simuladas. A partir destes experimentos, em termos de reconhecimento e ativação, as células T CAR antiFL(Mut2) tiveram a maior resposta seguidas por antiFL(FITC-E2) seguida por antiFL(4M5.3), tanto para a leucemia quanto para o adenocarcinoma.

Exemplo 10 - Direcionamento *in vivo* e integração de FL-PLE

[00131] O direcionamento *in vivo* e a integração de FL-PLE foram testados. A Figura 16 mostra o direcionamento *in vivo* e a integração de FL-PLE com a fração FL disponível para ligação. Depois que um tumor de glioblastoma (células U87) foi estabelecido em um grupo de camundongos por injeção intracraniana, os camundongos receberam uma injeção intravenosa de FL-PLE. Camundongos foram sacrificados e cérebros foram coletados em vários pontos do tempo após a injeção de FL-PLE. Especificamente, camundongos tendo um xenoenxerto de glioma ortotópico foram dosados intravenosamente com FL-PLE, e os cérebros foram avaliados durante um período de 14 dias. Às 48 horas, o cérebro foi preparado para histologia. DAPI também foi usada para corar o núcleo. Um anticorpo antifluoresceína foi utilizado para corar quanto à disponibilidade de moléculas de fluoresceína de FL-PLE que foram integradas na membrana das células. O

tumor de glioma exibiu retenção de FL-PLE em excesso comparado com um hemisfério contralateral livre de tumor de um indivíduo. A Figura 16, no canto superior esquerdo, mostra a imagem fluorescente de 10 X, o tumor era muito brilhante em comparação com o tecido normal saudável, marcado como N. Isto mostrou a integração seletiva de FL-PLE em membranas tumorais com a fração FL disponível para ligação. No canto inferior esquerdo: sinais brilhantes foram vistos ao olhar para a imagem contralateral do cérebro. A direita: Para quantificar isto, o MFI do tumor e o lado contralateral foram calculados individualmente. Esta análise foi então repetida em múltiplos pontos do tempo. Estes valores foram então plotados, gerando um gráfico de tempo de retenção de múltiplos dias para FL-PLE nesta dose de FL-PLE.

[00132] Resultados ilustrados na Figura 17 demonstram a universalidade do direcionamento *in vivo* e integração de FL-PLE. Aqui, as linhagens celulares de adenocarcinoma (MDA-MB-231), osteossarcoma (143B) e glioblastoma (U87) foram usadas para mostrar a universalidade. O adenocarcinoma e osteossarcoma receberam cada um, dois tumores de flanco em seus respectivos grupos e o glioblastoma recebeu somente um tumor de flanco. O quarto grupo tinha um tumor de adenocarcinoma em um flanco e um osteossarcoma no flanco oposto. Após os tumores terem sido estabelecidos nos grupos de camundongos por injeção subcutânea, os camundongos

receberam uma injeção intravenosa de FL-PLE. Camundongos foram sacrificados e tumores foram coletados em vários pontos de tempo após a injeção de FL-PLE. Os tumores foram removidos e imediatamente fluorescentemente imageados para a presença da molécula de fluoresceína no FL-PLE. Todos os gráficos da Figura 17 para os três tipos diferentes de câncer mostram um tempo de retenção de múltiplos dias com FL-PLE antes da fluorescência do tumor atingir os níveis de linha de base (tumor que nunca recebeu FL-PLE). O quarto grupo mostrou que FL-PLE simultaneamente direcionado a dois tipos diferentes de cânceres foram retidos por múltiplos dias.

Exemplo 11 - Bloqueio da ligação de células T CAR com ProFL-PLE a versão de pró-fármaco de FL-PLE (ProFL-PLE)

[00133] A atividade de FL-PLE mascarado (ProFL-PLE) para inibir a ligação da célula T CAR a células marcadas com ProFL-PLE foi testada. A Figura 18A e Figura 18B mostram a capacidade do ProFL-PLE de bloquear o reconhecimento da célula T até não mascarada. Células K562 (leucemia) foram incubadas com FL-PLE (doses altas e baixas) ou ProFL-PLE durante a noite. A integração celular de FL-PLE e ProFL-PLE foi analisada por citometria de fluxo (Figura 18A). Houve um claro deslocamento do parental K562 de controle com o parental K562 incubado com FL-PLE de alta dose, ao passo que houve um deslocamento menor com o parental K562 incubado com FL-PLE de baixa dose. Este ligeiro deslocamento correspondeu

a uma diferença na quantidade de FL exposta na superfície da célula para o reconhecimento da célula T CAR. ProFL-PLE não era fluorescente devido à presença do agente de mascaramento, um grupo hidroxila fenólico. Portanto, ProFL-PLE e os Parentais K562 tiveram quase o mesmo perfil observado por citometria de fluxo. Quando ProFL-PLE não foi mascarado, a fluorescência da fluoresceína foi revelada. O ProFL-PLE não mascarado tinha uma quantidade similar de FL exposta na superfície como o FL-PLE de baixa dose. A Figura 18B mostra células utilizadas em um ensaio de liberação de cromo para testar a ativação de células T CAR CD8+ antiFL em comparação com células T CD8+ simuladas. A partir destes experimentos, as células T CAR antiFL reconheceram a fração FL do FL-PLE integrada na membrana plasmática. O ProFL-PLE bloqueou completamente o reconhecimento dos CARs antiFL; ao passo que, uma vez que a proteção Pro foi desmascarada, a fração FL estava disponível para o reconhecimento dos CARs antiFL. A lise do ProFL-PLE não mascarado foi aproximadamente a mesma do FL-PLE de baixa dose, que é correlacionada com a quantidade de FL exposta na superfície das células k562.

[00134] As Figuras 18A e 18C mostram células utilizadas em um ensaio de liberação de citocina para demonstrar a ativação de células T CAR CD4+ antiFL em comparação com células T CD4+ simuladas. A integração celular de FL-PLE e ProFL-PLE foi analisada por citometria de fluxo

(Figura 18A). Conforme mostrado na Figura 18C, controles negativos (Parental K562) não mostraram nenhuma produção de citocina e o controle positivo (célula K562 OKT3+) mostrou produção de todas as três citocinas para todas as linhagens celulares. Células marcadas com FL-PLE foram capazes de gerar todas as três citocinas e eram dependentes da quantidade de FL exposta na superfície. Células ProFL-PLE marcadas com a fração pro ainda intacta não produziram nenhuma citocina, significando que as células T CAR antiFL não foram ativadas. Após desmascaramento, células marcadas com ProFL-PLE produziram todas as 3 citocinas mostrando que após a remoção da fração Pro a célula T CAR antiFL foi ativada através do ProFL-PLE integrado na superfície de uma célula cancerígena. Isto demonstrou que a marcação de células tumorais com um hapteno mascarado conjugado com um lipídio, tal como ProFL-PLE, desmascarando o hapteno para obter um hapteno não mascarado conjugado a um lipídio integrado em uma membrana de célula tumoral, e contatando o hapteno não mascarado com uma célula T anti-hapteno CAR, ativa a célula T pelo menos em um ambiente *in vitro*.

[00135] A Figura 19A, Figura 19B e Figura 19C ilustram ProFL-PLE bloqueando o reconhecimento de células T CAR até não mascaradas, após desmascarar a célula T CAR antiFL reconheceu-se que a fluoresceína recém-exposta na superfície foi então ativada. Células K562 (leucemia) foram incubadas

com FL-PLE ou ProFL-PLE durante a noite. A integração celular de FL-PLE e ProFL-PLE foi analisada por citometria de fluxo (Figura 19A). Houve um claro deslocamento do parental K562 de controle com o parental K562 incubado com FL-PLE correspondendo à quantidade de FL exposta na superfície da célula para o reconhecimento de células T CAR. ProFL-PLE não era fluorescente devido à presença do agente de mascaramento, um grupo hidroxila fenólico. Portanto, K562 incubado com ProFL-PLE em FBS e Parentais K562 tinham quase o mesmo perfil como observado por citometria de fluxo, isto é, a fração Pro ainda estava intacta. Quando ProFL-PLE foi desmascarado (incubação durante a noite em meio sem FBS), a fluorescência da fluoresceína foi revelada. O ProFL-PLE não mascarado tinha uma quantidade similar de FL exposta na superfície como as células K562 incubadas com FL-PLE. A Figura 19B mostra as células utilizadas em um ensaio de liberação de citocina para continuar a provar a ativação de células T CD4+ e CAR CD8+ antiFL em comparação com células T CD4+ e CD8+ simuladas. Os controles negativos (Parental K562) não mostraram nenhuma produção de citocina e o controle positivo (células K562 OKT3+) mostrou a produção de todas as três citocinas para todas as linhagens celulares. Como esperado, células marcadas com FL-PLE foram capazes de gerar todas as três citocinas. Células ProFL-PLE marcadas com a fração pro ainda intactas não produziram nenhuma citocina significando

que as células T CAR antiFL não foram ativadas como projetadas. Após o desmascaramento, células marcadas com ProFL-PLE produziram todas as 3 citocinas mostrando que, após a remoção da fração pro, a célula T CAR antiFL foi ativada através do ProFL-PLE não mascarado integrado na superfície da célula cancerígena. Isto mostra que o projeto do ProFL-PLE trabalha em um ambiente *in vitro*. A Figura 19C ilustra os resultados da coloração das células da cocultura do ensaio de liberação de citocina para investigar a regulação positiva dos marcadores de ativação (LAG3, 41BB e PD-1) nas células T CAR após 24 horas. As células T CAR CD8+ antiFL(FITC-E2)de espaçador longo são mostradas. Como esperado, a cocultura de controle negativo com Parental k562 não revelou regulação dos marcadores de ativação e o controle positivo (células k562 OKT3+) revelou regulação de todos os três marcadores de ativação. As células k562 com ProFL-PLE mostraram apenas quantidades ligeiramente elevadas dos marcadores de ativação significando que a fração Pro intacta estava bloqueando o reconhecimento e a ativação de células T CAR antiFL. Células K562 com FL-PLE ou ProFL-PLE não mascarados tiveram níveis similares de ativação conforme o controle positivo, mostrando que as células T CAR antiFL foram ativadas similarmente através de FL-PLE e ProFL-PLE não mascarado.

Exemplo 12 - Atividade *in vivo* de células T CAR antiFL

[00136] Camundongos possuindo um tumor cerebral foram administrados com FL-PLE mascarados ou não mascarados, em combinação com uma célula T CAR antiFL. A Figura 20 mostra a terapia inicial de FL-PLE e ProFL-PLE *in vivo*. Após um tumor de neuroblastoma (Be2) ter sido estabelecido em 3 grupos de camundongos por injeção intracraniana, os camundongos receberam uma injeção intracraniana de células T compreendendo um CAR antiFL(FITCE2) de espaçador longo, que compreendia a SEQ ID NO: 5. O grupo de controle recebeu somente as células T CAR antiFL(FITCE2) de espaçador longo e o tumor progrediu normalmente (barra preta). O segundo grupo recebe uma única injeção intravenosa de FL-PLE antes da injeção de células T. Este grupo viveu ~20% a mais do que o grupo de controle. O terceiro grupo recebeu 3 doses programadas de ProFL-PLE por meio de injeção intravenosa (uma antes da injeção de células T e duas após a injeção de células T), que levou a expectativa de vida ~20% mais longa para os camundongos. Estes resultados confirmaram adicionalmente que o ProFL-PLE foi seguro para redosagem.

Exemplo 13 - Atividade *in vivo* de células T CAR antiFL com FL-PLE mascarado

[00137] A administração de FL-PLE mascarado (ProFL-PLE) em combinação com células T CAR antiFL foi testada em camundongos com um modelo de células de câncer de mama. A Figura 21A e a Figura 21B mostram a terapia ProFL-PLE *in*

vivo para um modelo de tumor de flanco. Após tumores de adenocarcinoma (MDA-MB-231 eGFP:ffLuc IL2+) (2 tumores por camundongo) serem estabelecidos em três grupos de camundongos por injeção subcutânea, dois grupos de camundongos receberam injeção de ProFL-PLE por via intratumoral (Figura 21A) ou por via intravenosa (IV) (Figura 21B) e o grupo de controle não recebeu injeção de fármaco. Após a primeira injeção de fármaco, todos os três grupos receberam injeção IV de células contendo o CAR antiFL(FITC-E2) de espaçador longo. As linhas pontilhadas verticais cinzentas nos gráficos representam os dias de injeção. O grupo de controle morreu após 16 dias de carga tumoral. (Figura 21A) O grupo de ProFL-PLE intratumoralmente injetado recebeu 12 doses de ProFL-PLE durante 45 dias e o tumor regrediu aos níveis de linha de base no dia 40 para todos os 3 camundongos. Os camundongos viveram livres do tumor até o final do estudo no dia 90. (Figura 21B) O grupo injetado com ProFL-PLE IV recebeu 10 doses de ProFL-PLE durante 34 dias e o tumor regrediu aos níveis de linha de base no dia ~40 para 2 camundongos. Estes camundongos viveram livres do tumor até o final do estudo no dia 90. Um camundongo deste grupo morreu no dia 16 com os camundongos de controle. Estes resultados demonstram que o ProFL-PLE injetado intratumoralmente ou IV em combinação com células T CAR antiFL foi uma terapia viável.

[00138] As seguintes referências são, cada uma, expressamente incorporadas por referência em sua totalidade.

Referências

[00139] 1. Ma, J. S. *et al.* (2016). Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113(4), E450-E458.

[00140] 2. Kim, M. S. *et al.* (2015). Redirection of Genetically Engineered CAR-T Cells Using Bifunctional Small Molecules. Journal of the American Chemical Society, 137(8), 2832-2835.

[00141] 3. Urbanska, K. *et al.* (2012). A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. Cancer Research, 72(7), 1844-1852.

[00142] 4. Wu, C. Y. *et al.* (2015). Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. Science, 350(6258), aab4077-aab4077.

[00143] 5. Kranz *et al.* (1981). Partial elucidation of an anti-hapten repertoire in BALB/c mice: comparative characterization of several monoclonal antiFLuorescyl antibodies. Mol Immunol, 18(10), 889-898.

[00144] 6. Jung *et al.* (1997). Improving *in vivo*

folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting. Protein Engineering Design & Selection, 10(8), 956-966.

[00145] 7. Schwesinger *et al.* (2000). Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates. PNAS, 97(18), 9972-9977.

[00146] 8. Boder *et al.* (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. PNAS, 97(20), 10701-10705.

[00147] 9. Honegger *et al.* (2005). A mutation designed to alter crystal packing permits structural analysis of a tight-binding fluorescein-scFv complex. Prot Sci, 14(10), 2537-2549.

[00148] Entende-se que os exemplos e alternativas aqui descritos são apenas para fins ilustrativos e que várias modificações ou mudanças à luz dos mesmos serão sugeridas por indivíduos versados na técnica e devem ser incluídas no espírito e âmbito deste pedido e escopo de quaisquer reivindicações anexas.

[00149] Com relação ao uso de substancialmente quaisquer termos no plural e/ou singular aqui, aqueles versados na técnica podem traduzir do plural para o singular e/ou do singular para o plural conforme for apropriado para o contexto e/ou aplicação. As várias permutações singular/plural podem ser expressamente apresentadas neste

documento para fins de clareza.

[00150] Será entendido por aqueles versados na técnica que, em geral, os termos utilizados aqui, e especialmente nas reivindicações anexas (por exemplo, corpos das reivindicações anexas) são geralmente entendidos como termos “abertos” (por exemplo, o termo "incluindo" deve ser interpretado como "incluindo, mas não limitado a”, o termo “tendo” deve ser interpretado como “tendo pelo menos”, o termo "inclui" deve ser interpretada como “inclui, mas não está limitada a”, etc.). Será ainda compreendido por aqueles versados na técnica que se um número específico de uma recitação de reivindicação introduzida é pretendido, tal intenção será explicitamente recitada na reivindicação e, na ausência de tal recitação, tal intenção não está presente. Por exemplo, como um auxílio para a compreensão, as seguintes reivindicações anexas podem conter o uso das frases introdutórias “pelo menos um” e “um ou mais” para introduzir recitações de reivindicação. No entanto, o uso de tais frases não deve ser interpretado para implicar que a introdução de uma recitação de reivindicação pelos artigos indefinidos “um” ou “uma” limita qualquer reivindicação particular que contenha tal recitação de reivindicação introduzida em alternativas contendo apenas uma dessas recitação, mesmo quando a mesma reivindicação inclui as frases introdutivas “um ou mais” ou “pelo menos um” e artigos indefinidos como

“um” ou “uma” (por exemplo, ”um” e/ou “uma” deve ser interpretado como significando “pelo menos um” ou “um ou mais”); o mesmo se aplica ao uso de artigos definidos utilizados para introduzir as recitações de reivindicação. Além disso, mesmo se um número específico de uma recitação de reivindicação introduzida for explicitamente recitado, aqueles versados na técnica reconhecerão que tal recitação deve ser interpretada como significando pelo menos o número recitado (por exemplo, a simples recitação de “duas recitações”, sem outros modificadores, significa que pelo menos duas recitações ou duas ou mais recitações). Além disso, naqueles casos em que uma convenção análoga a “pelo menos um dentre A, B e C, etc.” é utilizado, em geral, tal construção é pretendida no sentido de que o versado na técnica compreenderia a convenção (por exemplo, “um sistema que tem pelo menos um dentre A, B e C” incluiria, mas não se limita a sistemas que têm A sozinho, B sozinho, C sozinho, A e B juntos, A e C juntos, B e C juntos e/ou A, B e C juntos, etc.). Naqueles casos, em que uma convenção análoga a “pelo menos um dentre A, B, ou C, etc.” é utilizada, em geral, tal construção é pretendida no sentido de que o versado na técnica compreenderia a convenção (por exemplo, “um sistema que tem pelo menos um dentre A, B ou C” incluiria, mas não se limita a sistemas que têm somente A sozinho, B sozinho, C sozinho, A e B juntos, A e C juntos, B e C juntos

e/ou A, B e C juntos, etc.). Será ainda entendido por aqueles versados na técnica que virtualmente qualquer palavra e/ou frase disjuntiva apresentando dois ou mais termos alternativos, seja na descrição, reivindicações ou desenhos, deve ser compreendida para contemplar as possibilidades de incluir um dos termos, qualquer um dos termos ou ambos os termos. Por exemplo, a frase "A ou B" será entendida como incluindo as possibilidades de “A” ou “B” ou “A e B”.

REIVINDICAÇÕES

1. Complexo compreendendo um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou um receptor de célula T (TCR), **caracterizado** pelo fato de que o CAR ou TCR é unido a um lipídeo, em que o lipídeo compreende uma fração alvo e o CAR é unido ao referido lipídeo através de uma interação com a referida fração alvo; em que o CAR ou o TCR compreende um domínio espaçador com um comprimento espaçador de 1 a 22 aminoácidos, 23 a 50 aminoácidos, 51 a 100 aminoácidos, 100 a 150 aminoácidos ou 151 a 250 aminoácidos, em que:

o CAR ou TCR compreende uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 95% de identidade com uma sequência selecionada de SEQ ID NO: 01-06; e/ou

o domínio espaçador compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em:

uma dobradiça de IgG4 conectada a um domínio CH2 a um domínio CH3, tal como um espaçador longo tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 07 ou tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 07;

uma dobradiça de IgG4 conectada a um domínio CH3, tal como um espaçador médio tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 08 ou tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 08; ou

uma dobradiça de IgG4, tal como espaçador curto tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 09 ou tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 09.

2. Complexo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o CAR ou TCR compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 01-06.

3. Complexo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o espaçador compreende um comprimento de 229 aminoácidos.

4. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que o CAR ou o TCR compreende um domínio scFv tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 (FITC-E2 Mut2); e um domínio espaçador com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 07 (espaçador longo).

5. Complexo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o CAR ou o TCR compreende um domínio scFv tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 (4M5.3); e um domínio espaçador tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 07 (espaçador longo).

6. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que o CAR ou o TCR compreende: um domínio scFv tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 5 (FITC-E2); e um domínio espaçador

tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 07 (espaçador longo).

7. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o lipídeo compreende um grupo de cabeça polar e um grupo hidrofóbico.

8. Complexo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que a cabeça polar compreende um grupo colina, fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfoetanolamina, um resíduo de oligossacarídeo, um resíduo de açúcar, fosfatidilserina ou fosfatidilinositol.

9. Complexo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o grupo de cabeça polar compreende fosfocolina, uma fração piperidina ou uma fração trimetilarseno-etil-fosfato.

10. Complexo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o grupo hidrofóbico é ácido graxo, tal como uma cadeia alifática.

11. Complexo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o ácido graxo é saturado ou insaturado.

12. Complexo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o grupo hidrofóbico compreende um grupo alquila, alquenila ou alquinila.

13. Complexo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o grupo hidrofóbico compreende um lipídio terpenoide, tal como um esteroide ou colesterol.

14. Complexo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o grupo hidrofóbico compreende uma ligação éter, em que a ligação éter está entre o grupo da cabeça polar e a cadeia alifática.

15. Complexo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o resíduo de açúcar é um glicerol ou álcool de açúcar.

16. Complexo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o grupo hidrofóbico compreende uma cadeia alquila de carbono, em que a cadeia alquila de carbono compreende 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 carbonos ou qualquer número que está dentro de um intervalo definido por quaisquer dois valores mencionados acima.

17. Complexo, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a cadeia alquila de carbono compreende 18 carbonos.

18. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, **caracterizado** pelo fato de que o lipídio é um éter fosfolipídico.

19. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, **caracterizado** pelo fato de que a

fração alvo é biotina, digoxigenina, dinitrofenol ou fluoresceína, ou um derivado da mesma.

20. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, **caracterizado** pelo fato de que a fração alvo é fluoresceína ou um derivado da mesma.

21. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, **caracterizado** pelo fato de que o espaçador compreende um espaçador de polietileno glicol (PEG), um espaçador Hapteno (2x) ou uma cadeia de alcano.

22. Complexo, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado** pelo fato de que o espaçador de PEG compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 moléculas de PEG, ou qualquer quantidade de moléculas de PEG que estão dentro de um intervalo definido por quaisquer dois valores acima mencionados.

23. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, **caracterizado** pelo fato de que o CAR ou o TCR é expresso por uma célula ou uma célula T.

24. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, **caracterizado** pelo fato de que o CAR ou o TCR está na superfície de uma célula ou célula T.

25. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 ou 24, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula T precursora.

26. Complexo, de acordo com a reivindicação 23 ou 24, **caracterizado** pelo fato de que a célula T precursora é uma célula-tronco hematopoiética.

27. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 26, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula linfocitária citotóxica T CD8+ selecionada do grupo que consiste em células T CD8+ ingênuas, células T CD8+ de memória central, células T CD8+ de memória efetora e células T CD8+ em massa.

28. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 27, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula linfocitária auxiliar T CD4+ selecionada do grupo que consiste em células T CD4+ ingênuas, células T CD4 de memória central, células T CD4+ de memória efetora e Células T CD4+ em massa.

29. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, **caracterizado** pelo fato de que o lipídeo é intercalado em uma bicamada lipídica de uma célula alvo.

30. Complexo, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado** pelo fato de que a célula alvo é uma célula tumoral.

31. Complexo, de acordo com a reivindicação 29 ou 30, **caracterizado** pelo fato de que a célula alvo é uma célula imune.

32. Complexo, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado** pelo fato de que a célula imune é uma célula T ou uma célula B.

33. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 32, **caracterizado** pelo fato de que a célula alvo está presente em um microambiente tumoral.

34. Célula compreendendo um complexo conforme definido com qualquer uma das reivindicações de 1 a 33, **caracterizada** pelo fato de que compreende um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de célula T (TCR), em que o CAR ou o TCR está ligado a um lipídio, em que o lipídeo compreende uma fração alvo e a célula que compreende o CAR está ligada ou interage com a fração alvo do lipídio.

35. Célula, de acordo com a reivindicação 34, **caracterizada** pelo fato de que a célula é uma célula T precursora.

36. Célula, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizada** pelo fato de que a célula T precursora é uma célula-tronco hematopoiética.

37. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 34 a 36, **caracterizada** pelo fato de que a célula é uma célula linfocitária citotóxica T CD8+ selecionada do grupo que consiste em células T CD8+ ingênuas, células T CD8+ de memória central, células T CD8+ de memória efetora e células T CD8+ em massa.

38. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 34 a 37, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula linfocitária auxiliar T CD4+ que é selecionada do grupo que consiste em células T CD4+ ingênuas, células T CD4+ de memória central, células T CD4+ de memória efetora e células T CD4+ em massa.

39. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 34 a 38, **caracterizado** pelo fato de que o lipídio é intercalado em uma bicamada lipídica de uma célula alvo.

40. Célula, de acordo com a reivindicação 39, **caracterizada** pelo fato de que a célula alvo é uma célula tumoral.

41. Célula, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, **caracterizada** pelo fato de que a célula alvo é uma célula imune.

42. Célula, de acordo com a reivindicação 41, **caracterizada** pelo fato de que a célula imune é uma célula T ou uma célula B.

43. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 40 a 42, **caracterizada** pelo fato de que a célula alvo está presente em um microambiente tumoral.

44. Método para tratar, inibir ou melhorar um câncer em um indivíduo, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

administrar ao indivíduo uma composição compreendendo um lipídeo conjugado a uma fração alvo, em que a fração alvo compreende uma fração de mascaramento; e

administrar uma célula ao indivíduo, em que a célula compreende um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de célula T (TCR), que se liga especificamente à fração alvo na ausência da fração de mascaramento, em que o CAR ou TCR compreende:

uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 95% de identidade com uma sequência selecionada de SEQ ID NO: 01-06; e/ou

um domínio espaçador que compreende, consiste essencialmente em ou consiste em: uma dobradiça de IgG4 conectada a um domínio CH2 a um domínio CH3, tal como um espaçador longo tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 07, ou tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 07; uma dobradiça de IgG4 conectada a um domínio CH3, tal como um espaçador médio tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 08 ou tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 08; ou uma dobradiça de IgG4, tal como espaçador curto tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 09 ou tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 09.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizado** pelo fato de que o CAR ou o TCR compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 1-6.

46. Método, de acordo com a reivindicação 44 ou 45, **caracterizado** pelo fato de que o espaçador compreende um comprimento de 229 aminoácidos.

47. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 46, **caracterizado** pelo fato de que o CAR ou TCR compreende um domínio scFv tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 (FITC-E2 Mut2); e um domínio espaçador com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 07 (espaçador longo).

48. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 46, **caracterizado** pelo fato de que o CAR ou TCR compreende um domínio scFv tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 (4M5.3); e um domínio espaçador tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 07 (espaçador longo).

49. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 46, **caracterizado** pelo fato de que o CAR ou TCR compreende: um domínio scFv tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 5 (FITC-E2); e um domínio espaçador tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 07 (espaçador longo).

50. Método para tratar, melhorar ou inibir um câncer em um indivíduo, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) introduzir, fornecer ou administrar a um indivíduo uma composição que compreende um lipídeo, que compreende uma fração alvo que está ligada a uma fração de mascaramento;

(b) introduzir, fornecer ou administrar ao referido indivíduo uma célula compreendendo um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de célula T (TCR), que é específico para a fração alvo uma vez que a fração de mascaramento é removida da fração alvo, em que o CAR ou TCR compreende um domínio espaçador com um comprimento espaçador de 1 a 22 aminoácidos, 23 a 50 aminoácidos, 51 a 100 aminoácidos, 100 a 150 aminoácidos ou 151 a 250 aminoácidos, em que:

o CAR ou TCR compreende uma sequência selecionada de SEQ ID NO: 01-06; e/ou

o domínio espaçador compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em:

uma dobradiça de IgG4 conectada a um domínio CH2 a um domínio CH3, tal como um espaçador longo tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 07 ou tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 07;

uma dobradiça de IgG4 conectada a um domínio CH3, tal como um espaçador médio tendo uma sequência de aminoácidos

com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 08 ou tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 08; ou

uma dobradiça de IgG4, tal como espaçador curto possuindo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 9 ou possuindo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 09;

(c) remover a fração de mascaramento da fração alvo, permitindo assim que a fração alvo se ligue ao CAR presente na célula; e

(d) opcionalmente, medir ou avaliar a ligação da célula compreendendo o CAR ao lipídeo, após as etapas (a) - (c); e/ou

(e) opcionalmente, medir ou avaliar o tratamento, melhoria ou inibição do referido câncer após as etapas (a) - (d); e/ou

(f) opcionalmente, identificar um indivíduo necessitado de uma terapia para câncer antes das etapas (a) - (c).

51. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 50, **caracterizado** pelo fato de que a célula é fornecida ao indivíduo ao mesmo tempo ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 24, 36 ou 48 horas antes ou depois da administração da composição, ou a qualquer momento dentro de um intervalo definido por quaisquer dois valores acima mencionados.

52. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 50, **caracterizado** pelo fato de que a célula é fornecida ao indivíduo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 24, 36 ou 48 horas antes da administração da composição, ou a qualquer momento dentro de um intervalo definido por quaisquer dois valores acima mencionados.

53. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 50, **caracterizado** pelo fato de que a célula é fornecida ao indivíduo dentro de segundos ou minutos, tal como menos de uma hora, para fornecer a composição ao indivíduo.

54. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 53, **caracterizado** pelo fato de que um impulso da célula e/ou da composição é fornecido ao indivíduo.

55. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 54, **caracterizado** pelo fato de que é fornecida uma terapia adicional ao câncer ao referido indivíduo, tal como uma molécula pequena, por exemplo, um composto químico, uma terapia de anticorpos, por exemplo, um anticorpo monoclonal humanizado com ou sem conjugação a um radionuclídeo, toxina ou fármaco, cirurgia e/ou radiação.

56. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 55, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um tumor sólido, tal como câncer de cólon, câncer

de mama, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer de próstata, melanoma, câncer de rim, câncer de pâncreas, cérebro câncer, glioblastoma, neuroblastoma, meduloblastoma, sarcoma, câncer ósseo ou câncer de fígado ou tumor não sólido, tal como leucemia ou mieloma múltiplo.

57. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 56, **caracterizado** pelo fato de que a ligação da fração alvo ao CAR presente na célula induz a produção de pelo menos uma citocina.

58. Método, de acordo com a reivindicação 57, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos uma citocina compreende IL-2, TNF-α e/ou INF-γ.

59. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 58, **caracterizado** pelo fato de que o lipídeo compreende um grupo de cabeça polar e um grupo hidrofóbico.

60. Método, de acordo com a reivindicação 59, **caracterizado** pelo fato de que a cabeça polar compreende um grupo colina, fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfoetanolamina, um resíduo de oligossacarídeo, um resíduo de açúcar, fosfatidilserina ou fosfatidilinositol.

61. Método, de acordo com a reivindicação 59, **caracterizado** pelo fato de que o grupo de cabeça polar compreende fosfocolina, uma fração piperidina ou uma fração trimetilarseno-etil-fosfato.

62. Método, de acordo com a reivindicação 59, **caracterizado** pelo fato de que o grupo hidrofóbico é ácido graxo, tal como uma cadeia alifática.

63. Método, de acordo com a reivindicação 62, **caracterizado** pelo fato de que o ácido graxo é saturado ou insaturado.

64. Método, de acordo com a reivindicação 59, **caracterizado** pelo fato de que o grupo hidrofóbico compreende um grupo alquila, alquenila ou alquinila.

65. Método, de acordo com a reivindicação 59, **caracterizado** pelo fato de que o grupo hidrofóbico compreende um lipídio terpenoide, tal como um esteroide ou colesterol.

66. Método, de acordo com a reivindicação 59, **caracterizado** pelo fato de que o grupo hidrofóbico compreende uma ligação éter, em que a ligação éter está entre o grupo da cabeça polar e a cadeia alifática.

67. Método, de acordo com a reivindicação 60, **caracterizado** pelo fato de que o resíduo de açúcar é um glicerol ou um álcool de açúcar.

68. Método, de acordo com a reivindicação 59, **caracterizado** pelo fato de que o grupo hidrofóbico compreende uma cadeia alquila de carbono, em que a cadeia alquila de carbono compreende 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 carbonos ou qualquer número que está dentro de um

intervalo definido por quaisquer dois valores mencionados acima.

69. Método, de acordo com a reivindicação 68, **caracterizado** pelo fato de que a cadeia alquila de carbono compreende 18 carbonos.

70. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 69, **caracterizado** pelo fato de que o lipídeo é um éter fosfolipídico.

71. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 70, **caracterizado** pelo fato de que a fração alvo é biotina, digoxigenina, dinitrofenol ou fluoresceína, ou um derivado da mesma.

72. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 71, **caracterizado** pelo fato de que a fração alvo é fluoresceína ou um derivado da mesma.

73. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 72, **caracterizado** pelo fato de que o espaçador compreende um espaçador de polietileno glicol (PEG), um espaçador Hapteno (2x) ou uma cadeia de alcano.

74. Método, de acordo com a reivindicação 73, **caracterizado** pelo fato de que o espaçador de PEG compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 moléculas de PEG, ou qualquer quantidade de moléculas de PEG que estão dentro de um intervalo definido por quaisquer dois valores acima mencionados.

75. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 74, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula T precursora.

76. Método, de acordo com a reivindicação 75, **caracterizado** pelo fato de que a célula T precursora é uma célula-tronco hematopoiética.

77. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 76, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula linfocitária citotóxica T CD8+ selecionada do grupo que consiste em células T CD8+ ingênuas, células T CD8+ de memória central, células T CD8+ de memória efetora e células T CD8+ em massa.

78. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 77, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula linfocitária auxiliar T CD4+ que é selecionada a partir do grupo que consiste em células T CD4+ ingênuas, células CD4+ de memória central, células T CD4+ de memória efetora e células T CD4+ em massa.

79. Kit **caracterizado** pelo fato de que compreende um FL-PLE de grau farmacêutico.

80. Kit, de acordo com a reivindicação 79, **caracterizado** pelo fato de que o FL-PLE de grau farmacêutico compreende um hapteno.

81. Kit, de acordo com a reivindicação 79 ou 80, **caracterizado** pelo fato de que o FL-PLE de grau farmacêutico compreende fluoresceína.

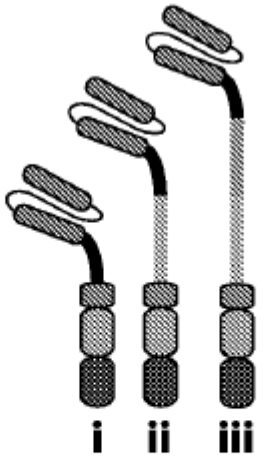


FIG. 1A

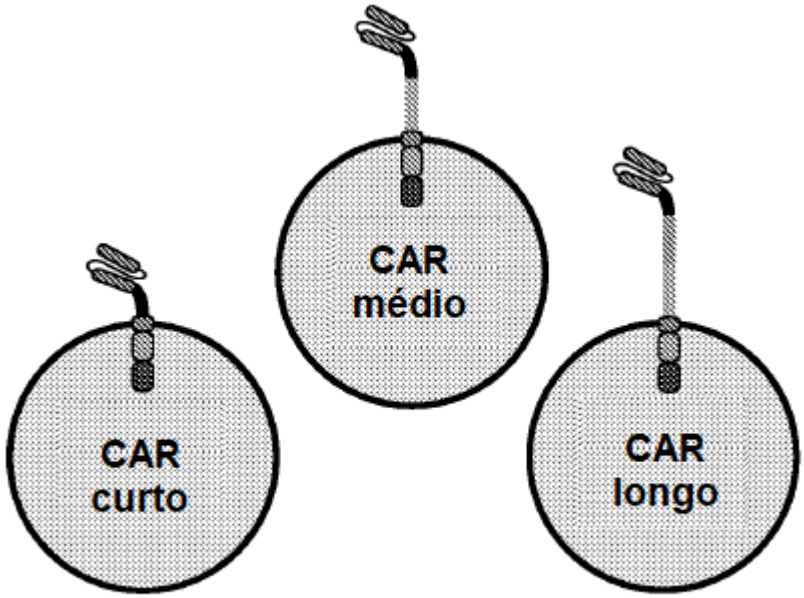


FIG. 1B

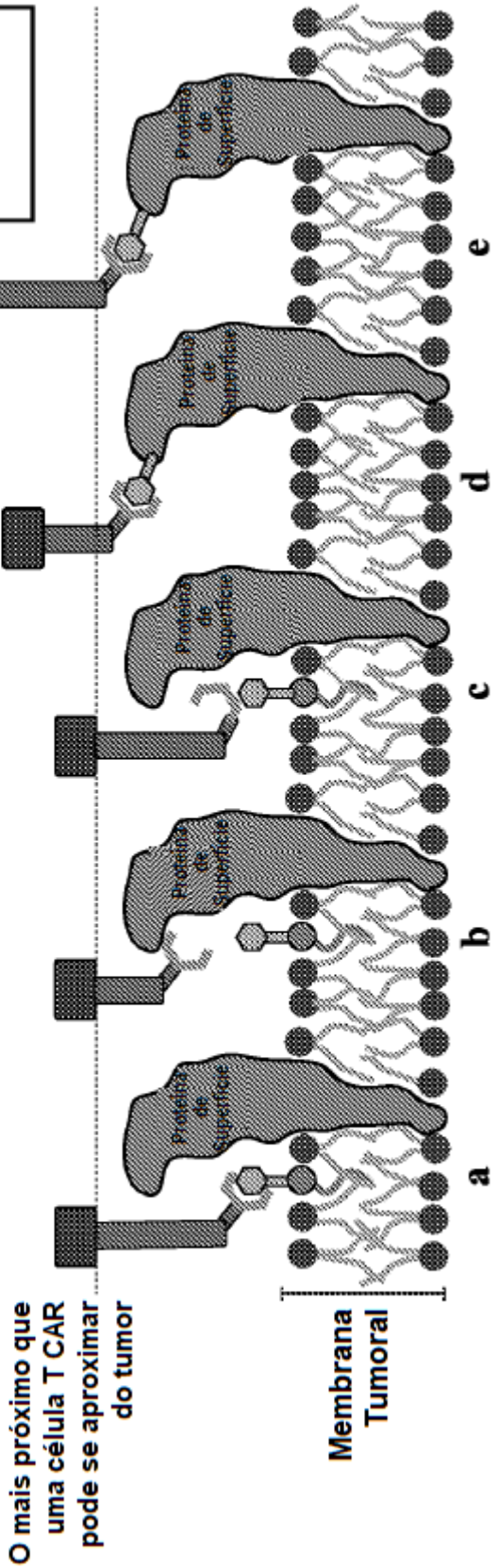

PLE
CTCT
Proteína de Superfície
a
b
c
d
e
Membrana Tumoral
O mais próximo que uma célula T CAR pode se aproximar do tumor

FIG. 2

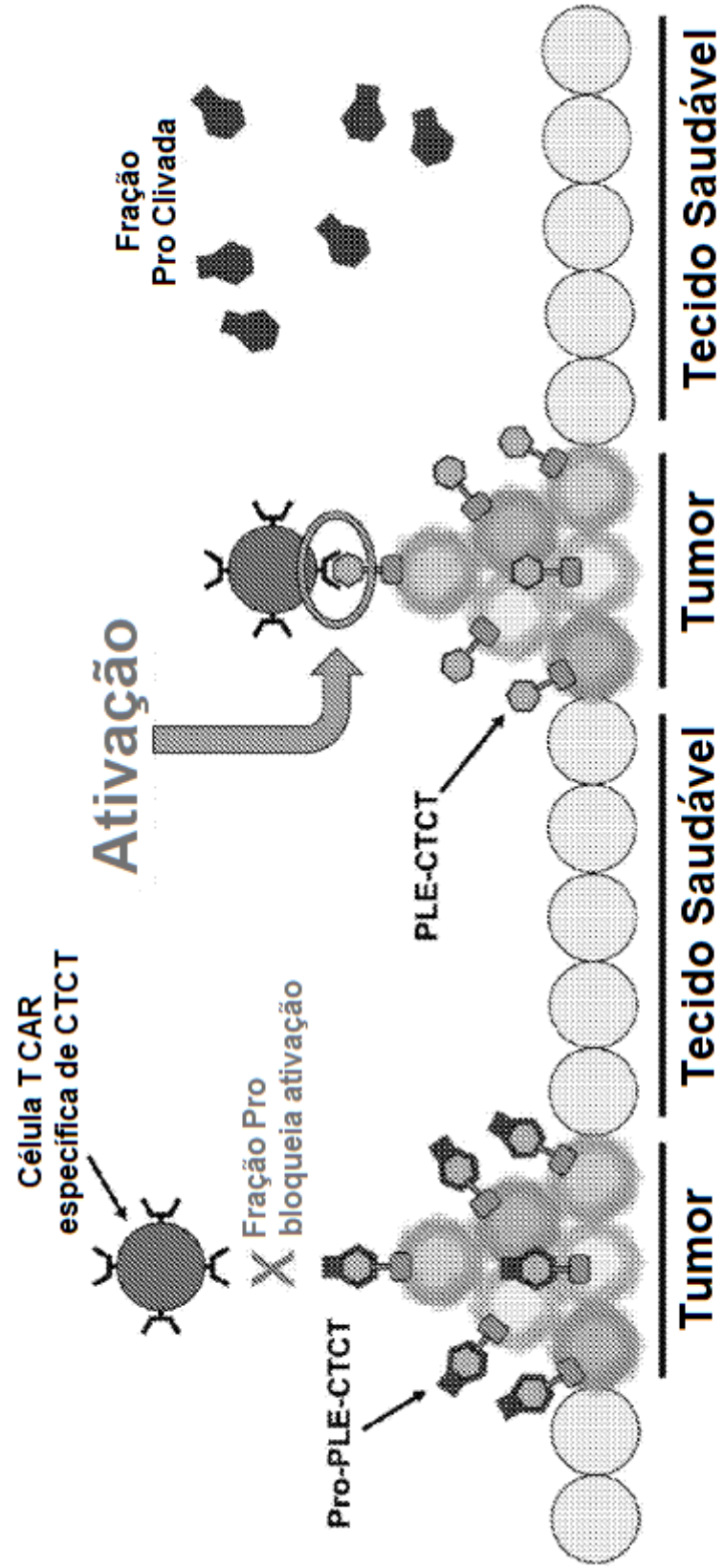

Célula T CAR
específica de CTCT
Fração Pro
bloqueia ativação
Ativação
Fração
Pro Clivada
Pro-PLE-CTCT
PLE-CTCT
Tumor
Tecido Saudável
Tumor
Tecido Saudável

FIG. 3

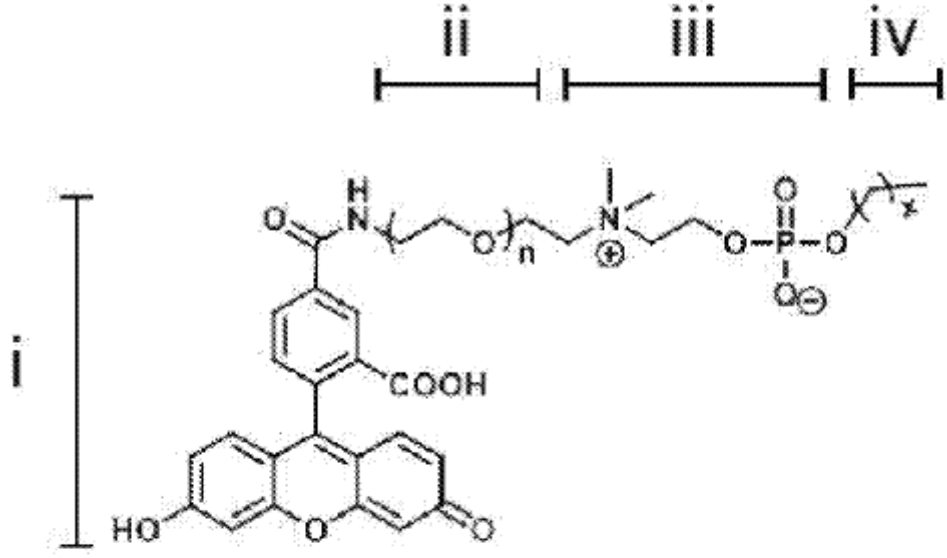


FIG. 4A

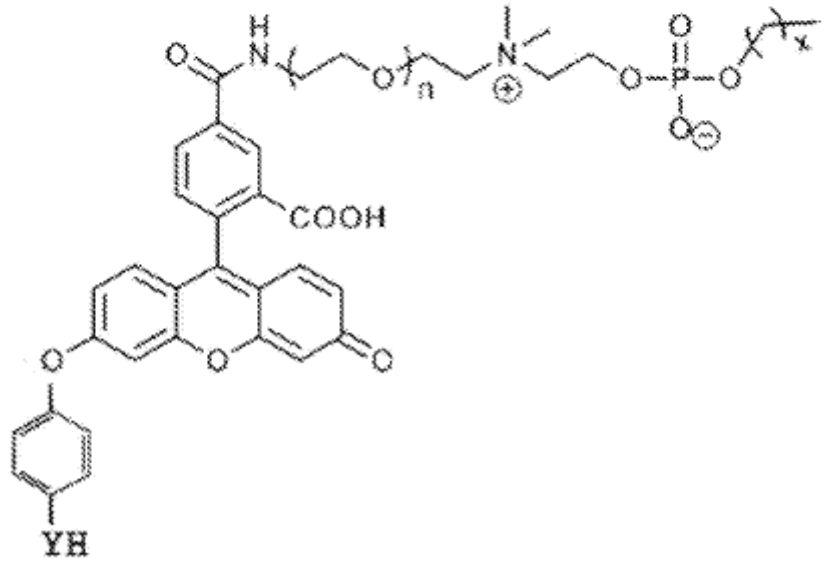


FIG. 4B

Petição 870200124890, de 02/10/2020, pág. 102/158

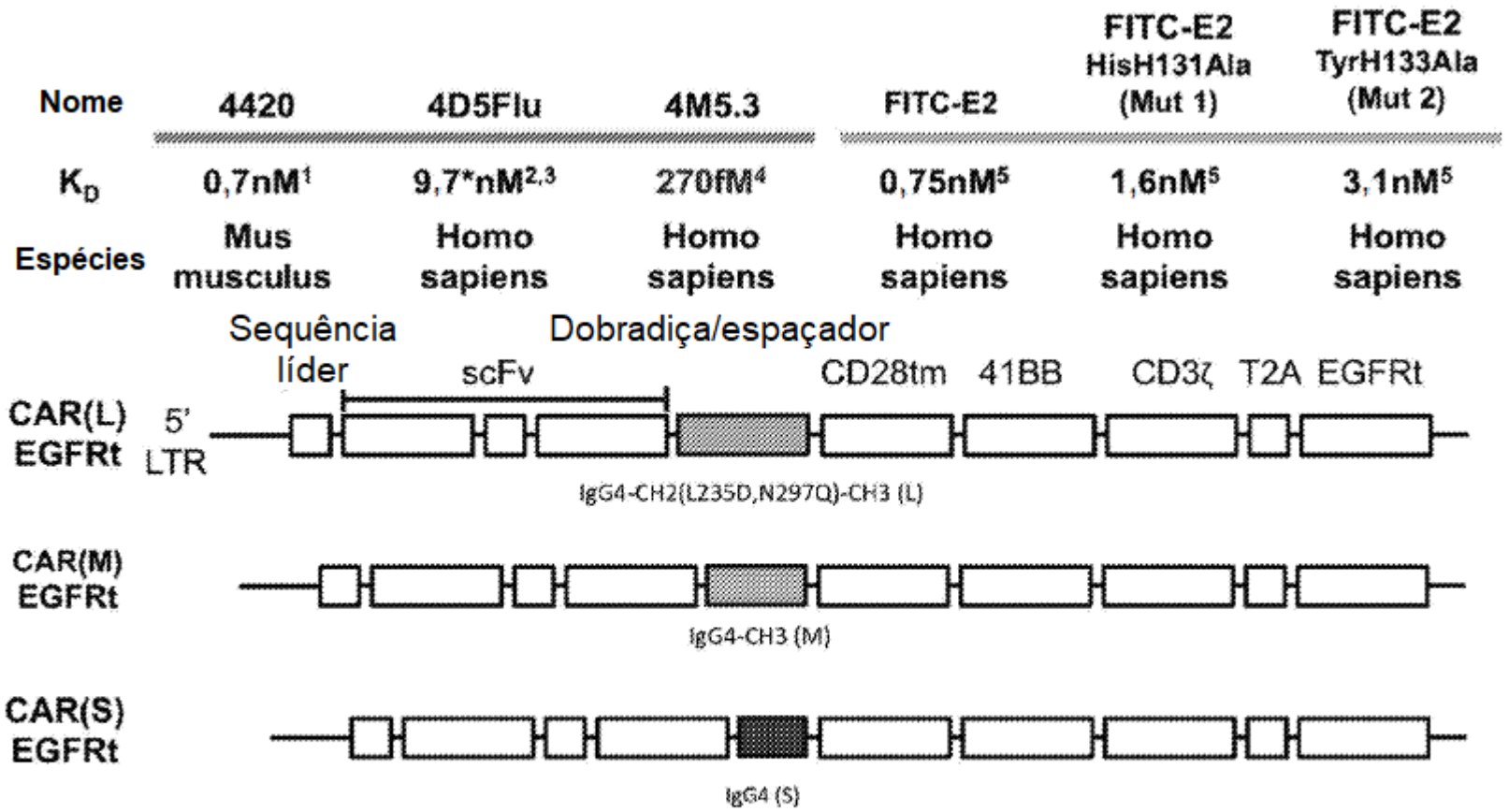


FIG. 5

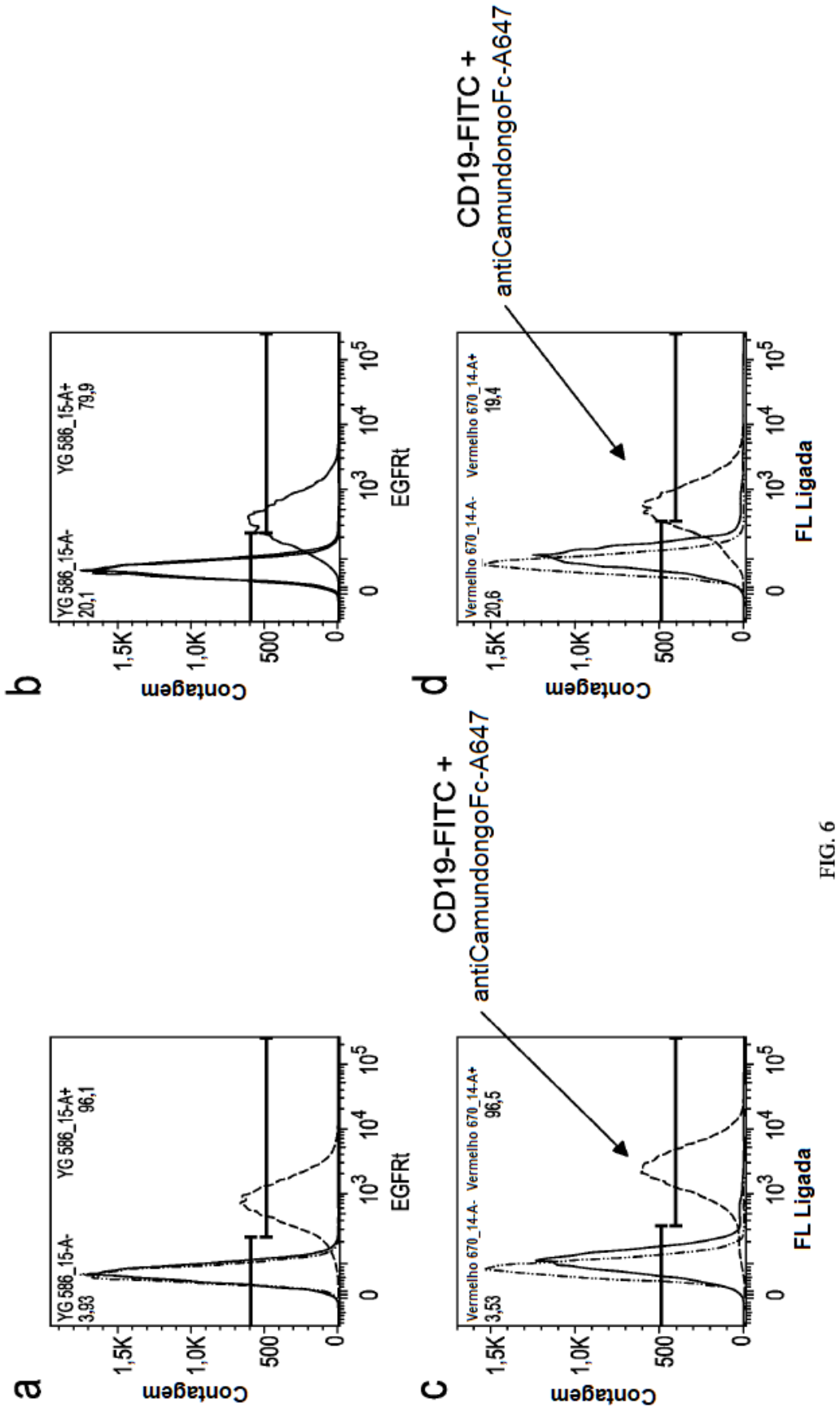

a
b
c
d
Contagem
EGFRt
FL Ligada
YG 586_15-A-
20,1
YG 586_15-A+
79,9
YG 586_15-A-
3,93
YG 586_15-A+
96,1
Vermelho 670_14-A-
20,6
Vermelho 670_14-A+
19,4
Vermelho 670_14-A-
3,53
Vermelho 670_14-A+
96,5
CD19-FITC +
antiCamundongoFc-A647
1,5K
1,0K
500
0
10^3
10^4
10^5

FIG. 6

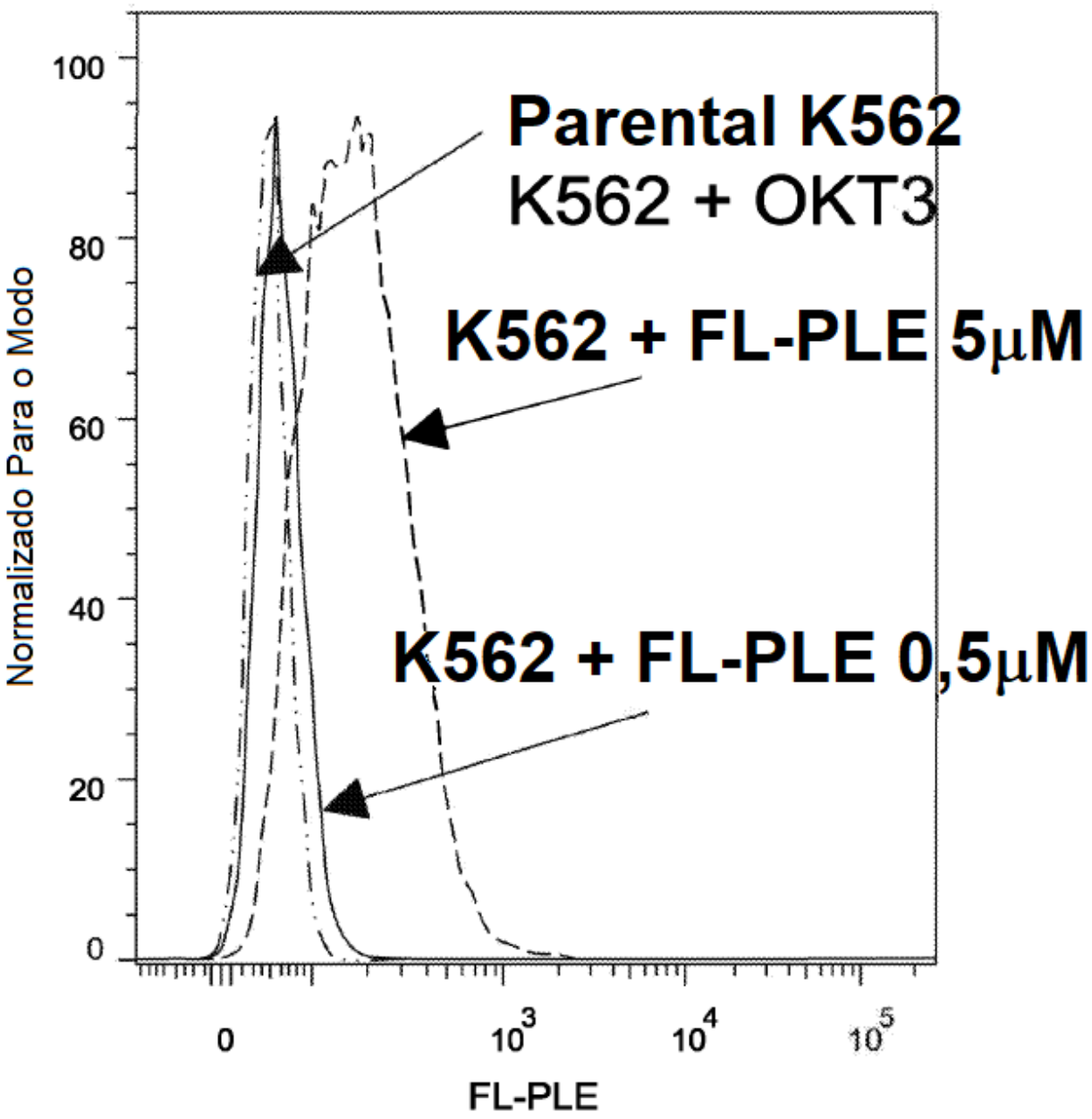

Parental K562
K562 + OKT3
K562 + FL-PLE 5μM
K562 + FL-PLE 0,5μM
Normalizado Para o Modo
100
80
60
40
20
0
0
10^3
10^4
10^5
FL-PLE

FIG. 7A

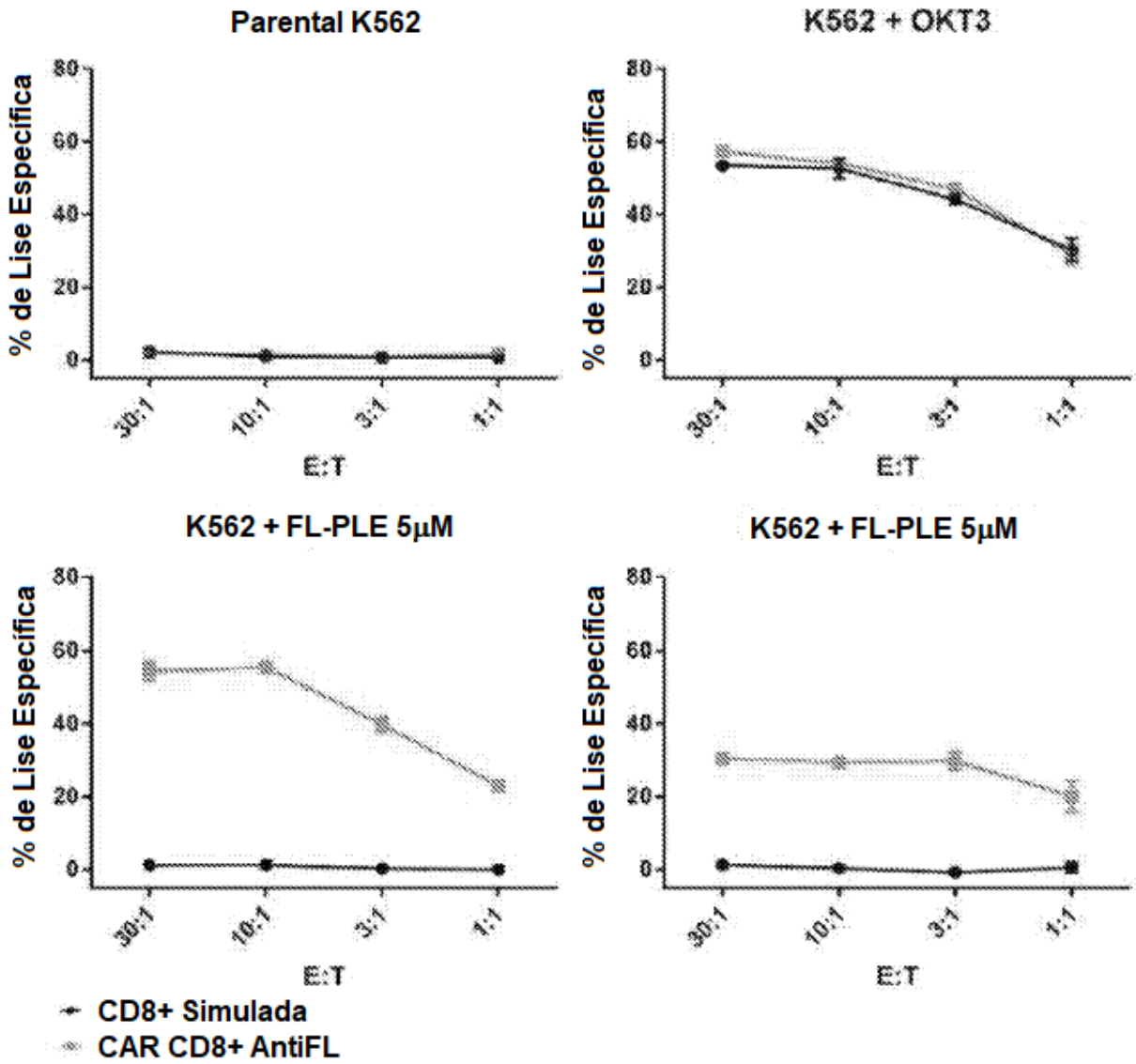

Parental K562
K562 + OKT3
K562 + FL-PLE 5µM
K562 + FL-PLE 5µM
% de Lise Específica
E:T
30:1
10:1
3:1
1:1
0
20
40
60
80
CD8+ Simulada
CAR CD8+ AntiFL

FIG. 7B

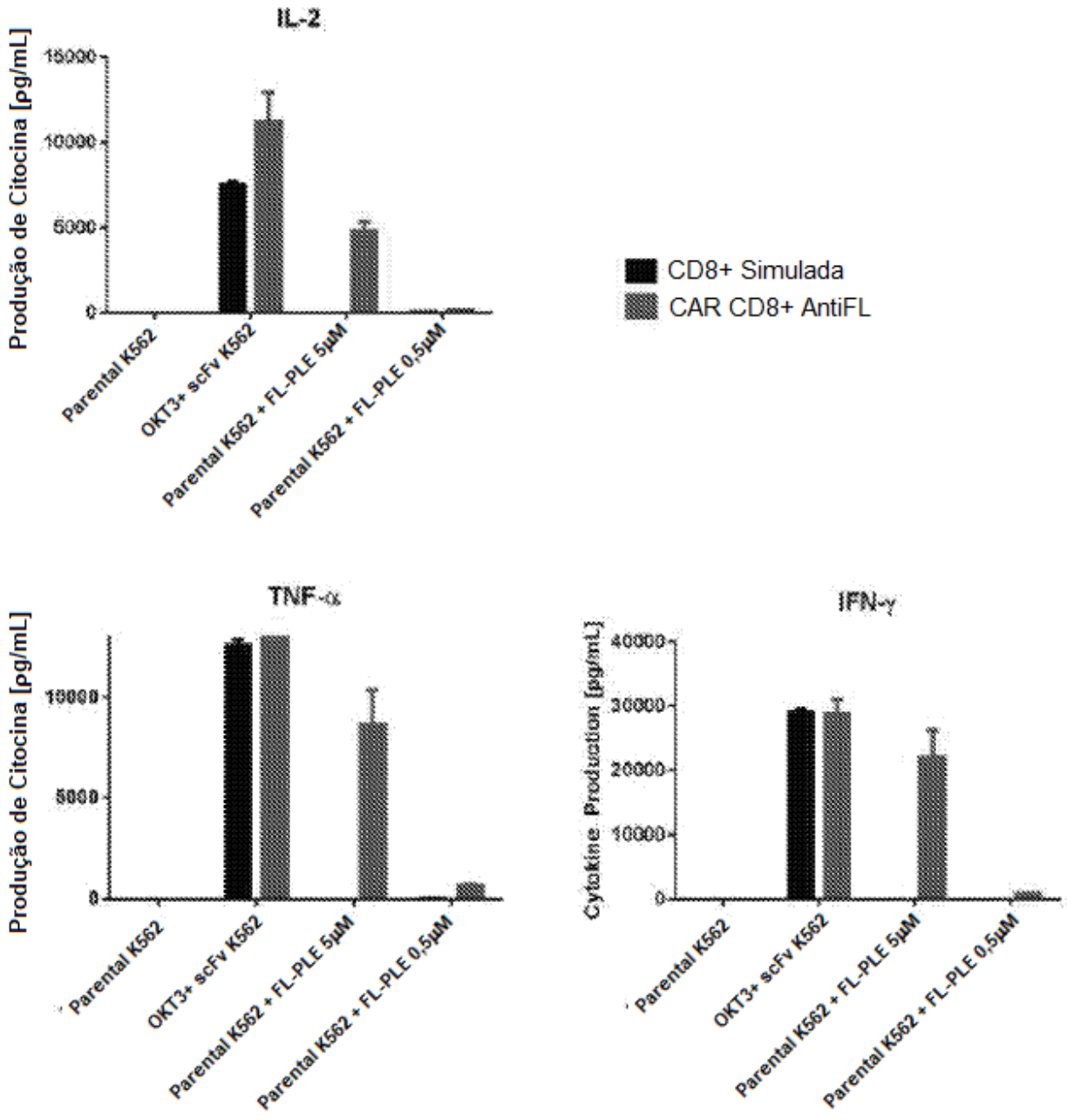

IL-2
Produção de Citocina [pg/mL]
15000
10000
5000
0
Parental K562
OKT3+ scFv K562
Parental K562 + FL-PLE 5µM
Parental K562 + FL-PLE 0,5µM
CD8+ Simulada
CAR CD8+ AntiFL
TNF-α
Produção de Citocina [pg/mL]
10000
5000
0
Parental K562
OKT3+ scFv K562
Parental K562 + FL-PLE 5µM
Parental K562 + FL-PLE 0,5µM
IFN-γ
Cytokine Production [pg/mL]
40000
30000
20000
10000
0
Parental K562
OKT3+ scFv K562
Parental K562 + FL-PLE 5µM
Parental K562 + FL-PLE 0,5µM

FIG. 7C

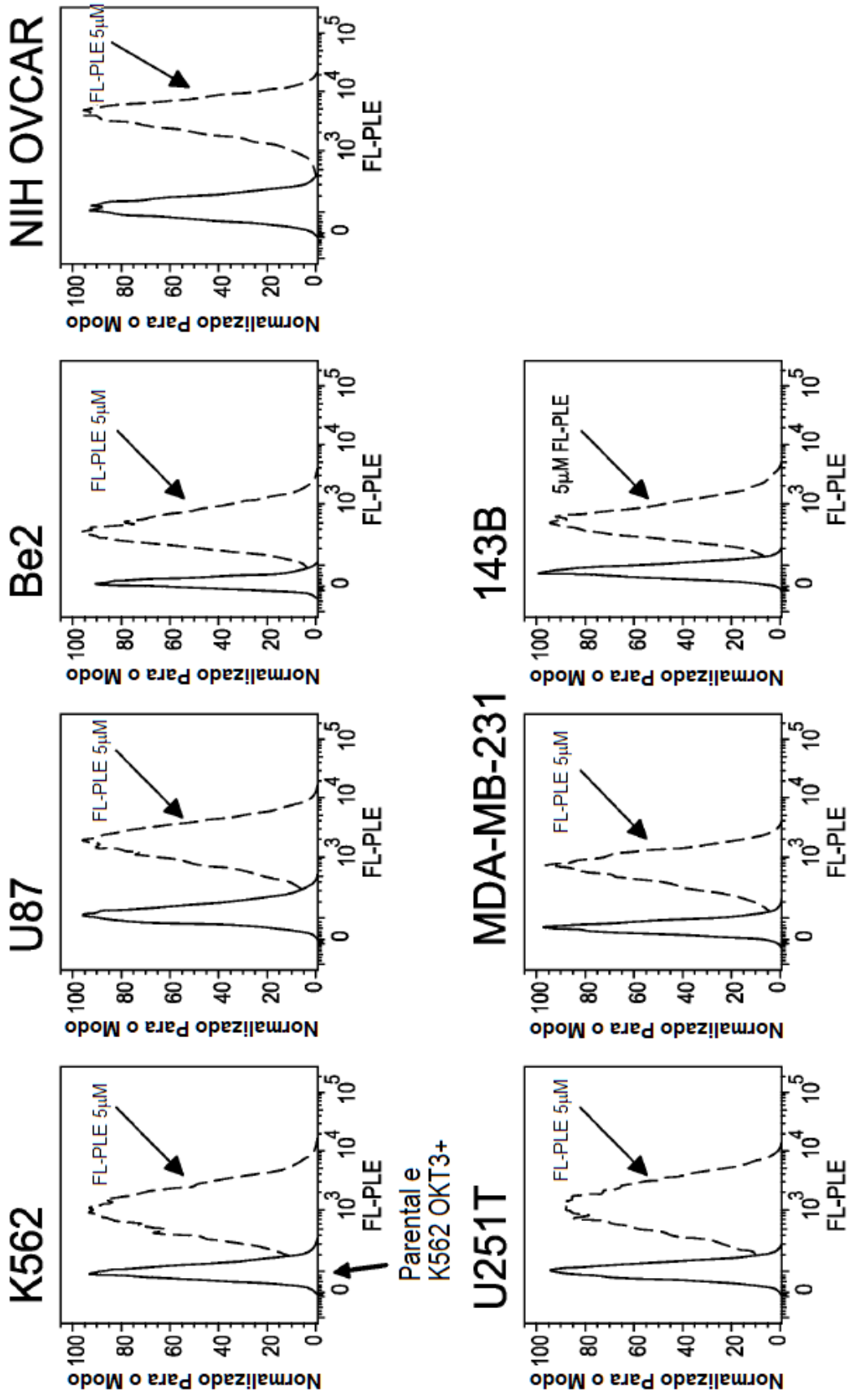

K562
U87
Be2
NIH OVCAR
U251T
MDA-MB-231
143B
FL-PLE 5μM
5μM FL-PLE
Normalizado Para o Modo
FL-PLE
Parental e
K562 OKT3+

FIG. 8A

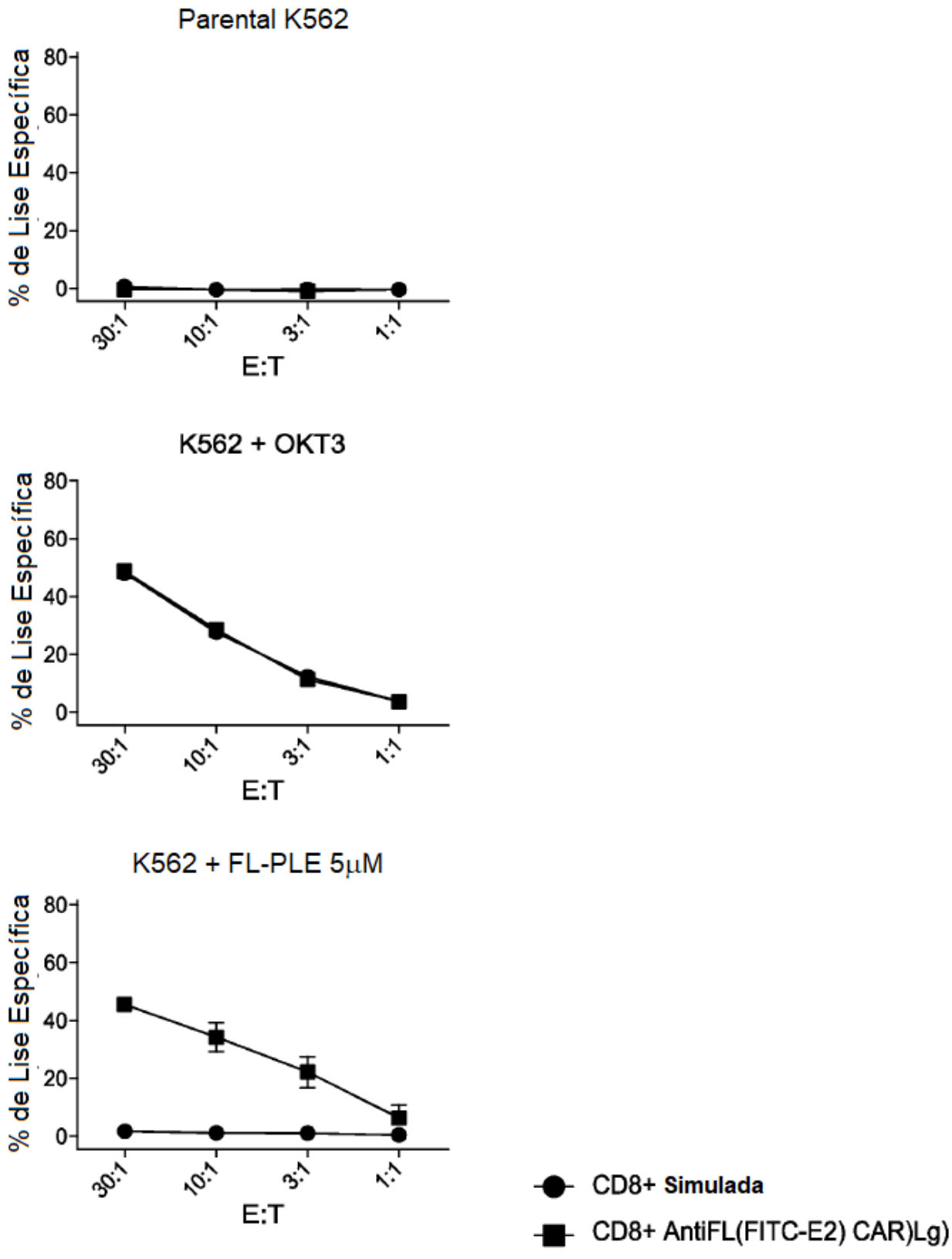

Parental K562
% de Lise Específica
80
60
40
20
0
30:1
10:1
3:1
1:1
E:T
K562 + OKT3
% de Lise Específica
80
60
40
20
0
30:1
10:1
3:1
1:1
E:T
K562 + FL-PLE 5μM
% de Lise Específica
80
60
40
20
0
30:1
10:1
3:1
1:1
E:T
CD8+ Simulada
CD8+ AntiFL(FITC-E2) CAR)Lg)

FIG. 8B

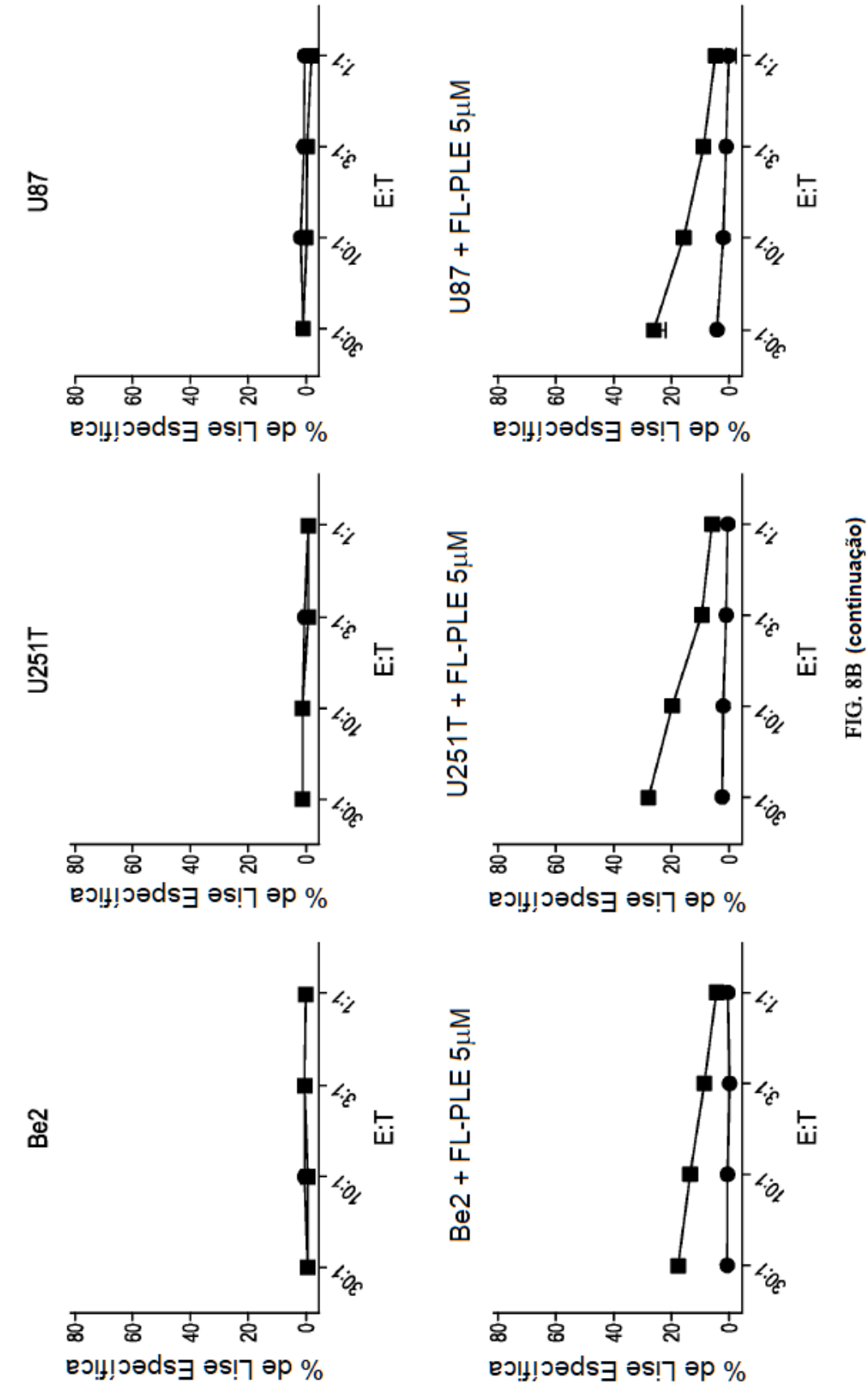


FIG. 8B (continuação)

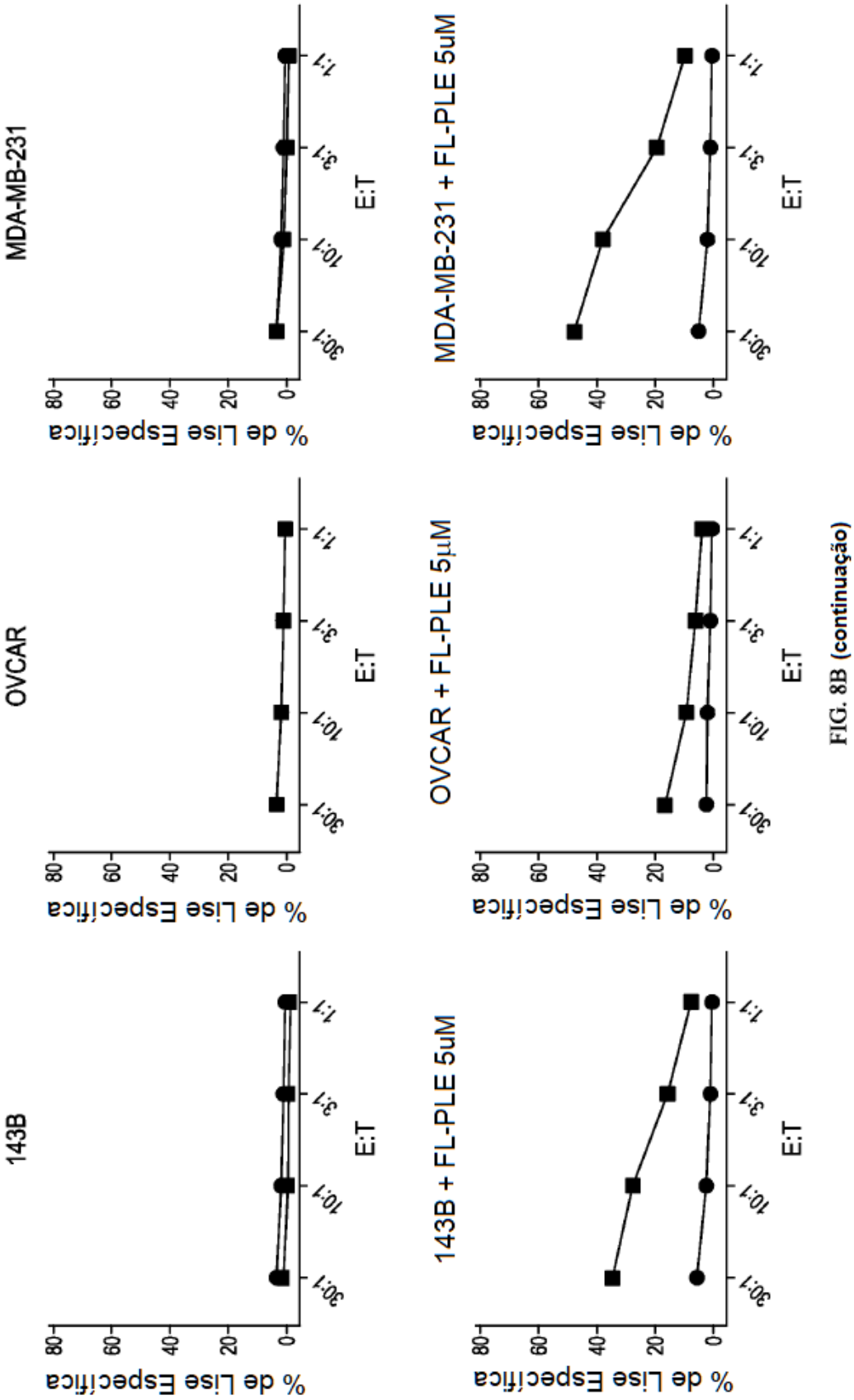


FIG. 8B (continuação)

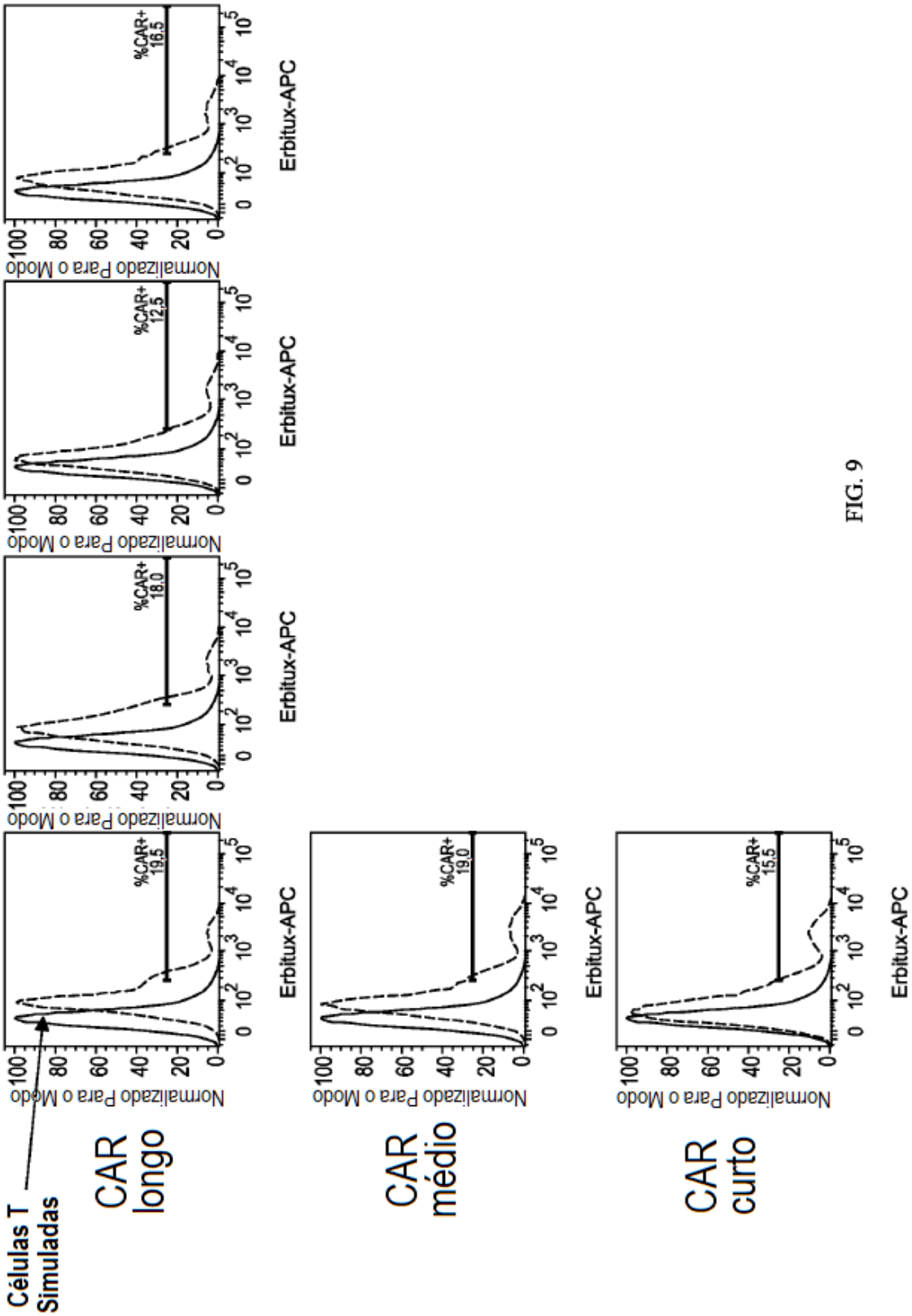

FITC-E2
FITC-E2 HisH131Ala
FITC-E2 TyH133Ala
4D5Flu
Células T Simuladas
CAR longo
CAR médio
CAR curto
Normalizado Para o Modo
Erbitux-APC
%CAR+ 19,5
%CAR+ 18,0
%CAR+ 12,5
%CAR+ 16,5
%CAR+ 19,0
%CAR+ 15,5

FIG. 9

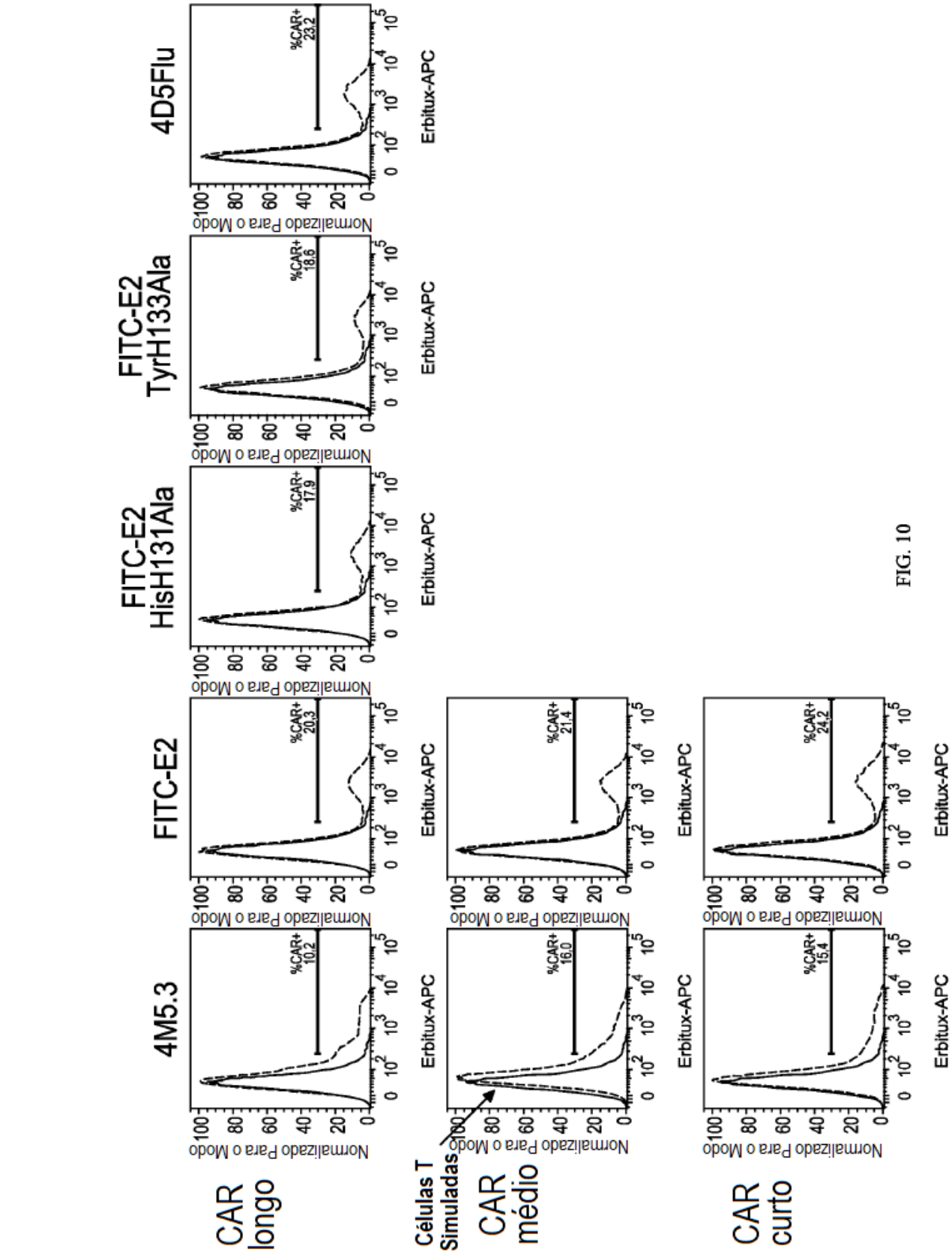

4M5.3
FITC-E2
FITC-E2 HisH131Ala
FITC-E2 TyrH133Ala
4D5Flu
CAR longo
CAR médio
CAR curto
Células T Simuladas
Normalizado Para o Modo
Erbitux-APC
%CAR+ 10,2
%CAR+ 20,3
%CAR+ 17,9
%CAR+ 18,6
%CAR+ 23,2
%CAR+ 16,0
%CAR+ 21,4
%CAR+ 15,4
%CAR+ 24,2

FIG. 10

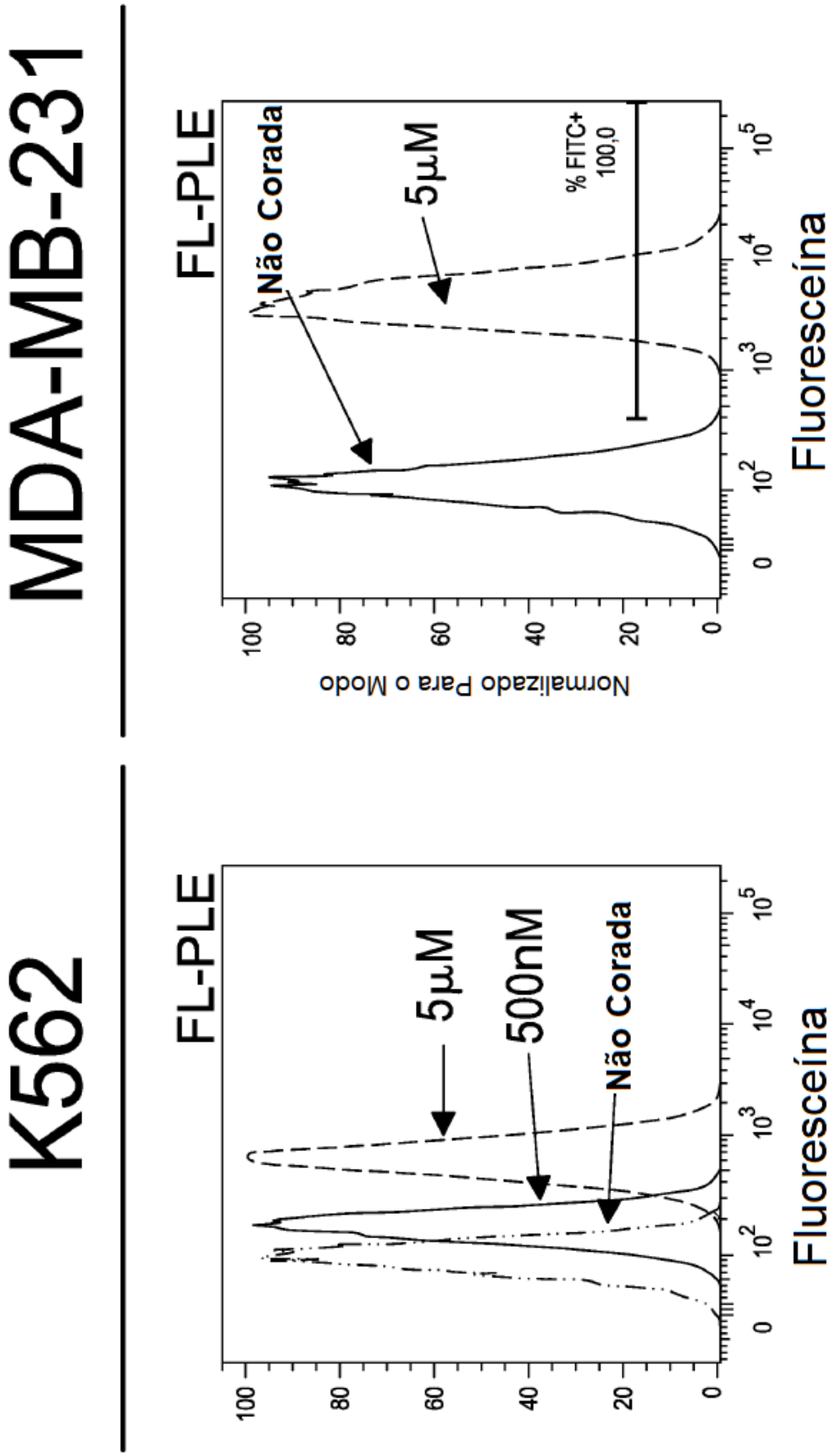

MDA-MB-231
K562
FL-PLE
Não Corada
5µM
% FITC+
100,0
Normalizado Para o Modo
Fluoresceína
FL-PLE
5µM
500nM
Não Corada
Fluoresceína

FIG. 11

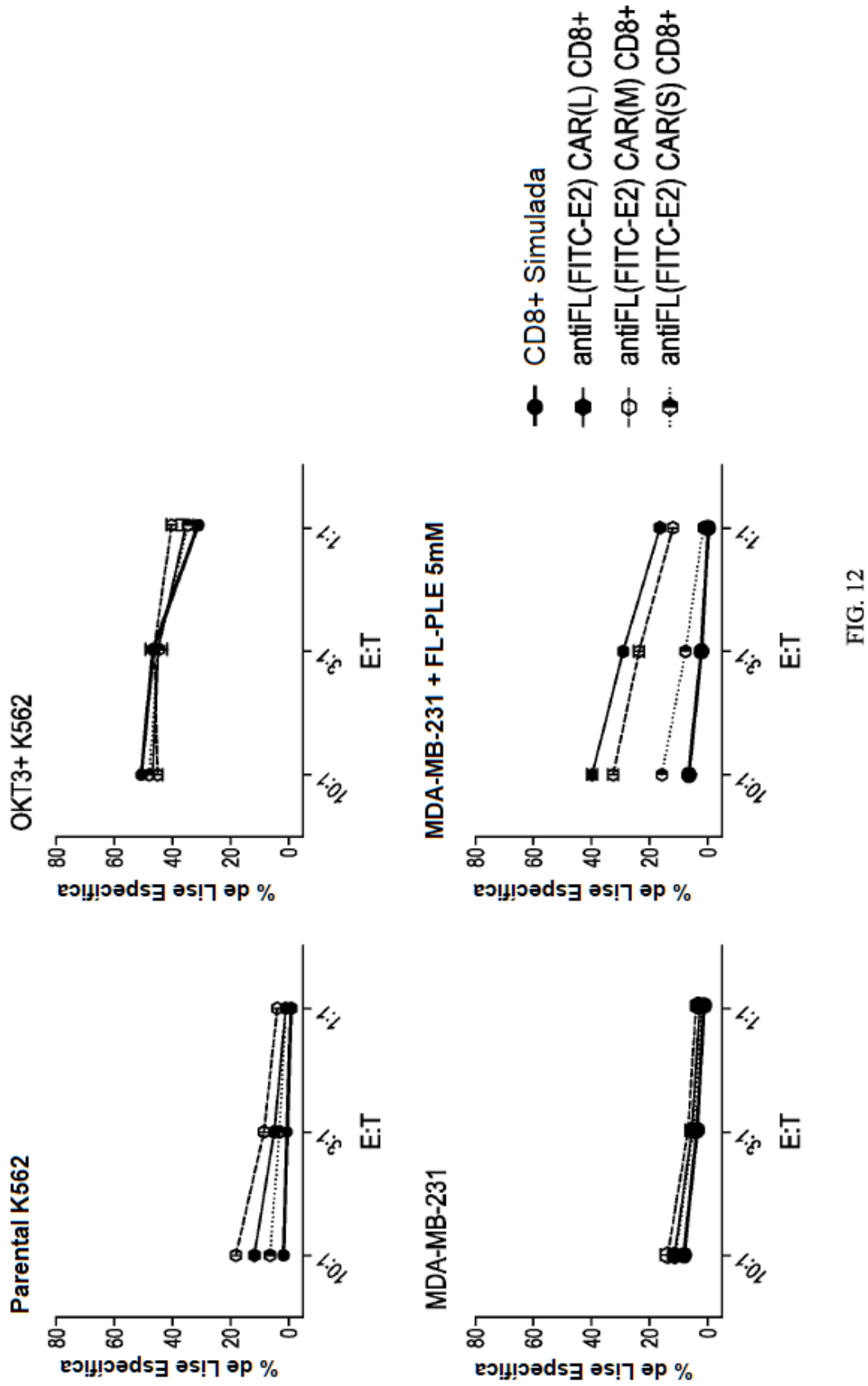

CD8+ Simulada
antiFL(FITC-E2) CAR(L) CD8+
antiFL(FITC-E2) CAR(M) CD8+
antiFL(FITC-E2) CAR(S) CD8+
OKT3+ K562
MDA-MB-231 + FL-PLE 5mM
Parental K562
MDA-MB-231
% de Lise Específica
E:T
1:1
3:1
10:1
0
20
40
60
80

FIG. 12

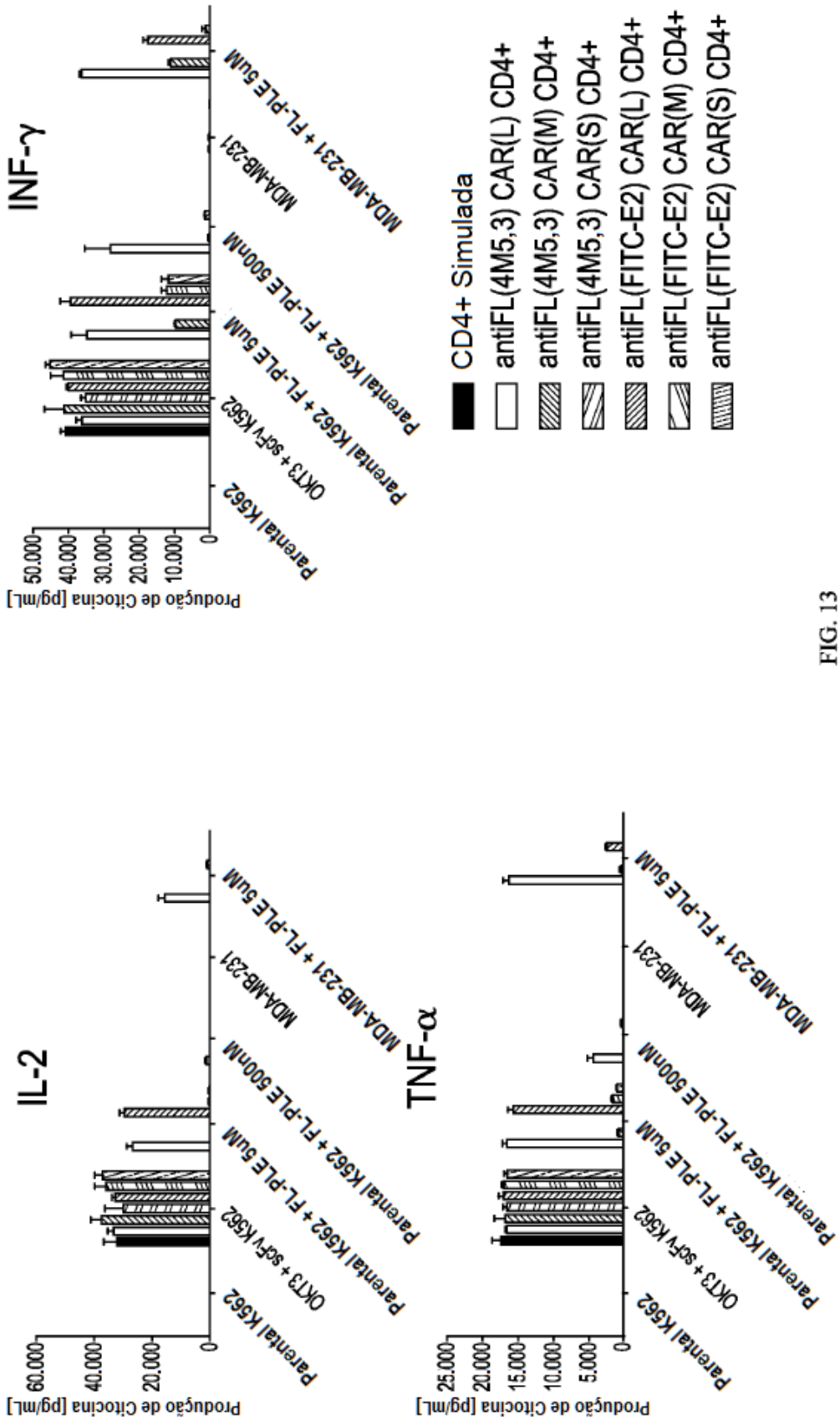

INF-γ
Produção de Citocina [pg/mL]
50.000
40.000
30.000
20.000
10.000
0
Parental K562
OKT3 + scFv K562
Parental K562 + FL-PLE 5uM
Parental K562 + FL-PLE 600nM
MDA-MB-231
MDA-MB-231 + FL-PLE 5uM
CD4+ Simulada
antiFL(4M5,3) CAR(L) CD4+
antiFL(4M5,3) CAR(M) CD4+
antiFL(4M5,3) CAR(S) CD4+
antiFL(FITC-E2) CAR(L) CD4+
antiFL(FITC-E2) CAR(M) CD4+
antiFL(FITC-E2) CAR(S) CD4+
IL-2
Produção de Citocina [pg/mL]
60.000
40.000
20.000
0
TNF-α
Produção de Citocina [pg/mL]
25.000
20.000
15.000
10.000
5.000
0

FIG. 13

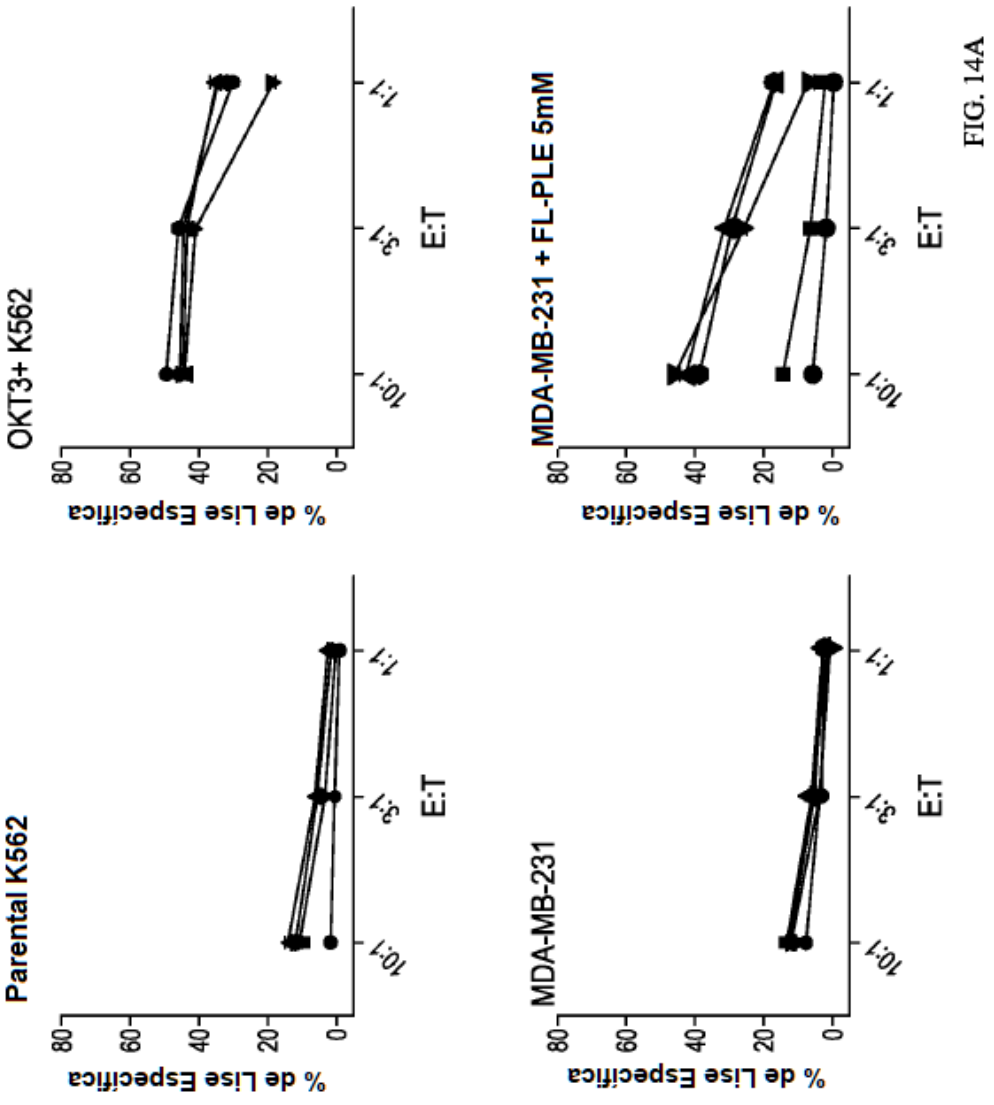

Parental K562
OKT3+ K562
MDA-MB-231
MDA-MB-231 + FL-PLE 5mM
% de Lise Específica
0
20
40
60
80
1:1
3:1
10:1
E:T
CD8+ Simulada
antiFL(4D5Flu) CAR(L) CD8+
antiFL(FITC-E2) CAR(L) CD8+
antiFL(FITC-E2 Mut1) CAR(L) CD8+
antiFL(FITC-E2 Mut2) CAR(L) CD8+

FIG. 14A

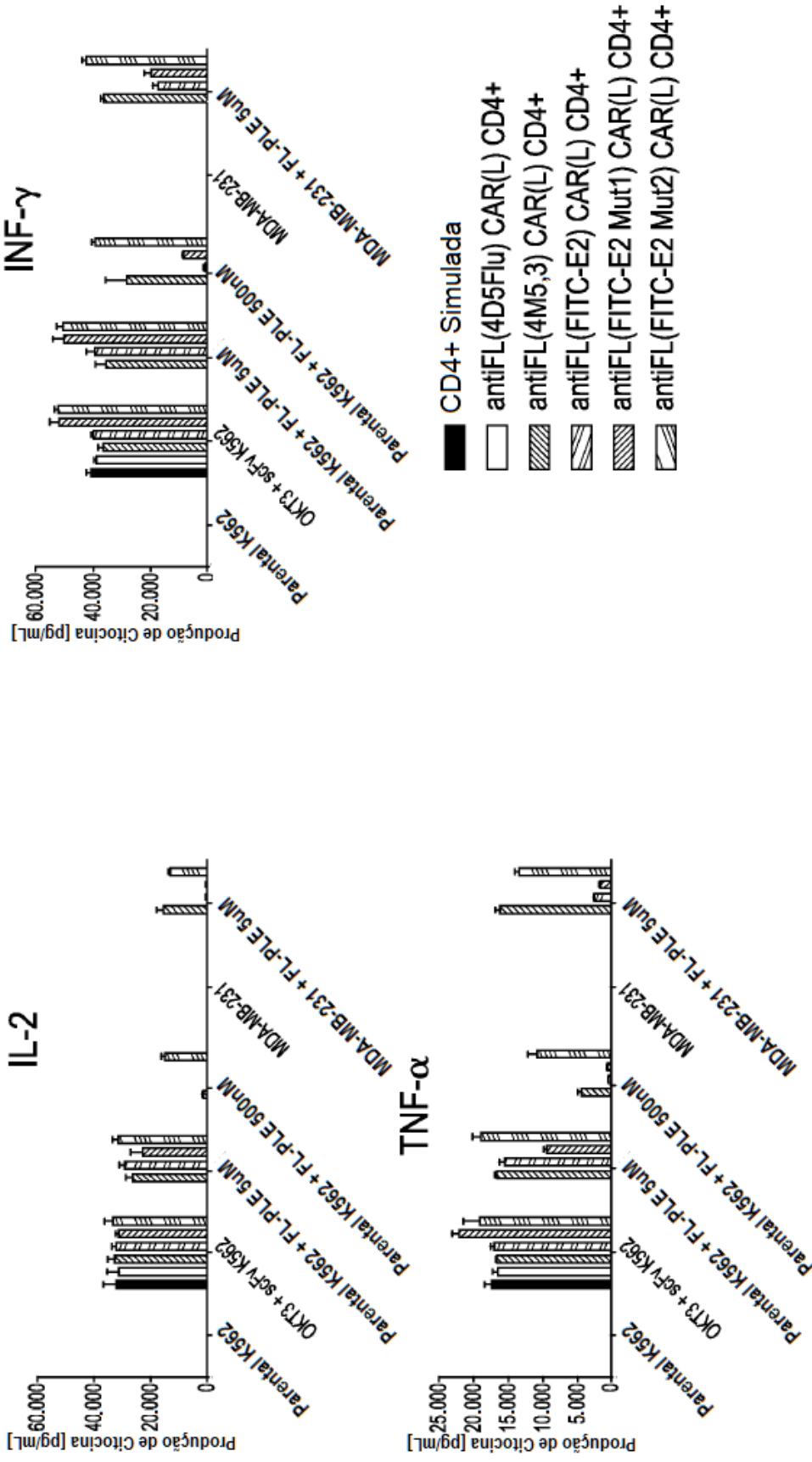

INF-γ
IL-2
TNF-α
Produção de Citocina [pg/mL]
60.000
40.000
20.000
0
25.000
20.000
15.000
10.000
5.000
Parental K562
OKT3 + scFv K562
Parental K562 + FL-PLE 5uM
Parental K562 + FL-PLE 500nM
MDA-MB-231
MDA-MB-231 + FL-PLE 5uM
CD4+ Simulada
antiFL(4D5Flu) CAR(L) CD4+
antiFL(4M5,3) CAR(L) CD4+
antiFL(FITC-E2) CAR(L) CD4+
antiFL(FITC-E2 Mut1) CAR(L) CD4+
antiFL(FITC-E2 Mut2) CAR(L) CD4+

FIG. 14B

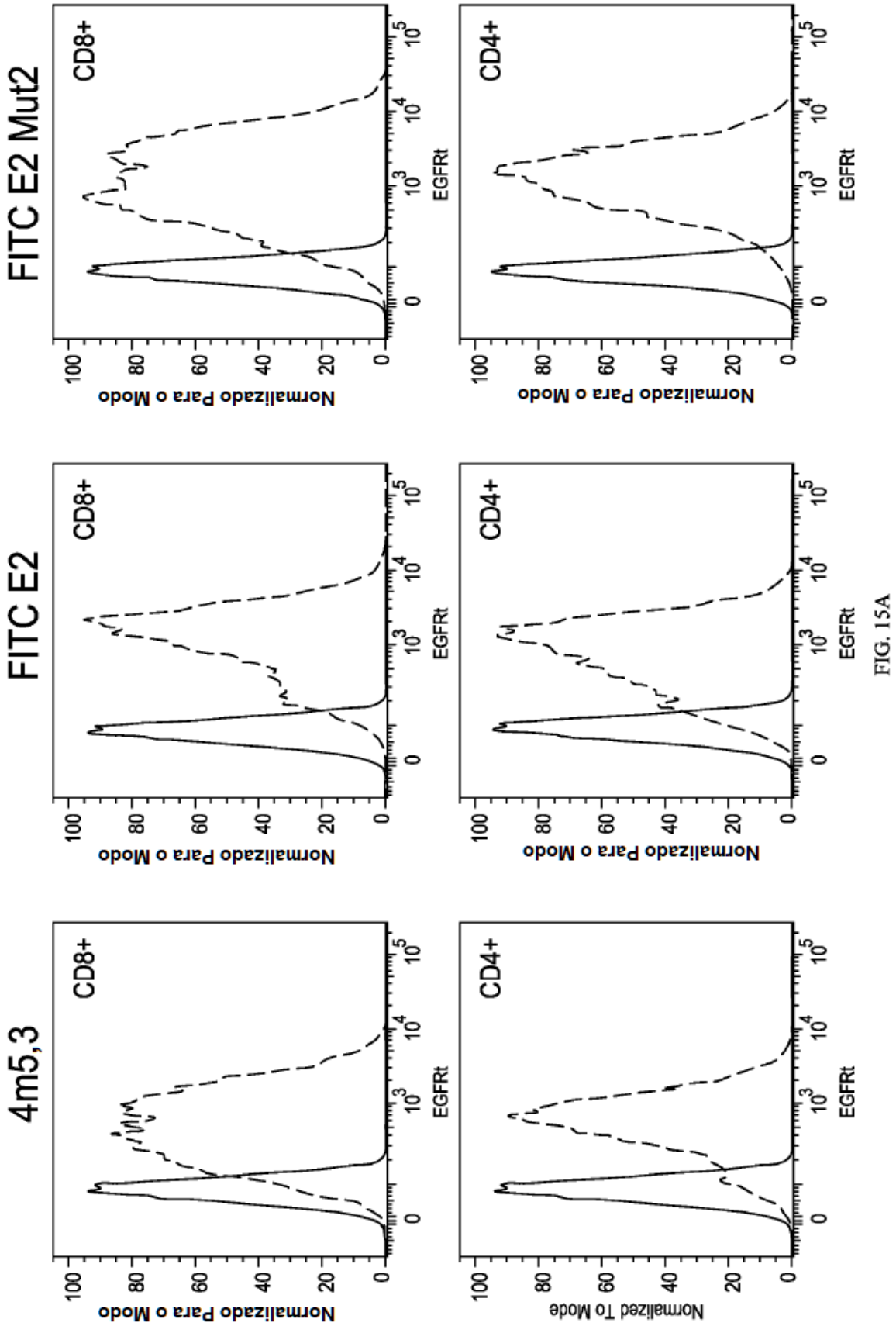

4m5,3
FITC E2
FITC E2 Mut2
CD8+
CD4+
EGFRt
Normalizado Para o Modo
Normalized To Mode
0
20
40
60
80
100
10^3
10^4
10^5

FIG. 15A

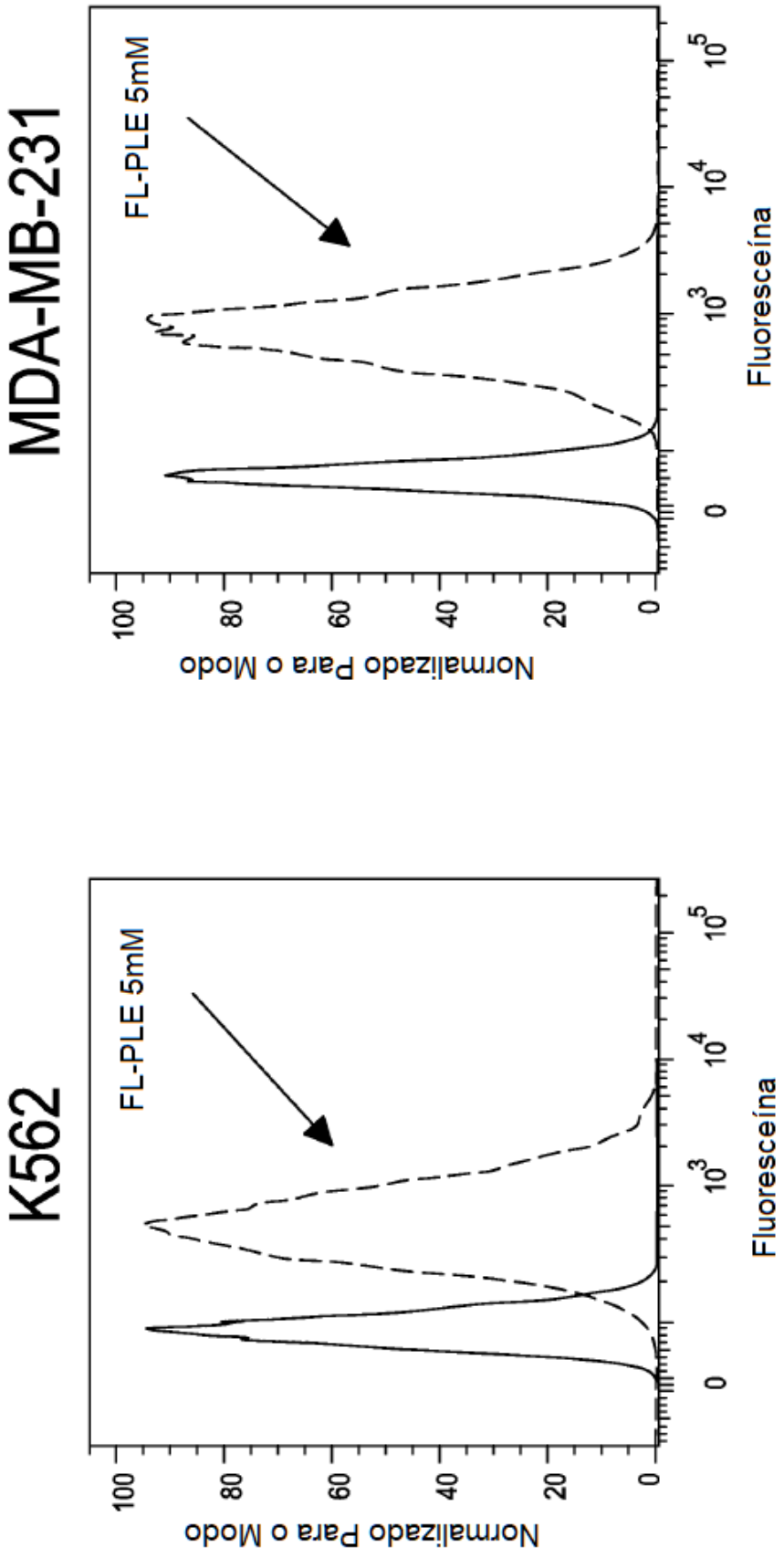

MDA-MB-231
FL-PLE 5mM
Normalizado Para o Modo
Fluoresceína
0
20
40
60
80
100
0
10^3
10^4
10^5
K562
FL-PLE 5mM
Normalizado Para o Modo
Fluoresceína
0
20
40
60
80
100
0
10^3
10^4
10^5

FIG. 15B

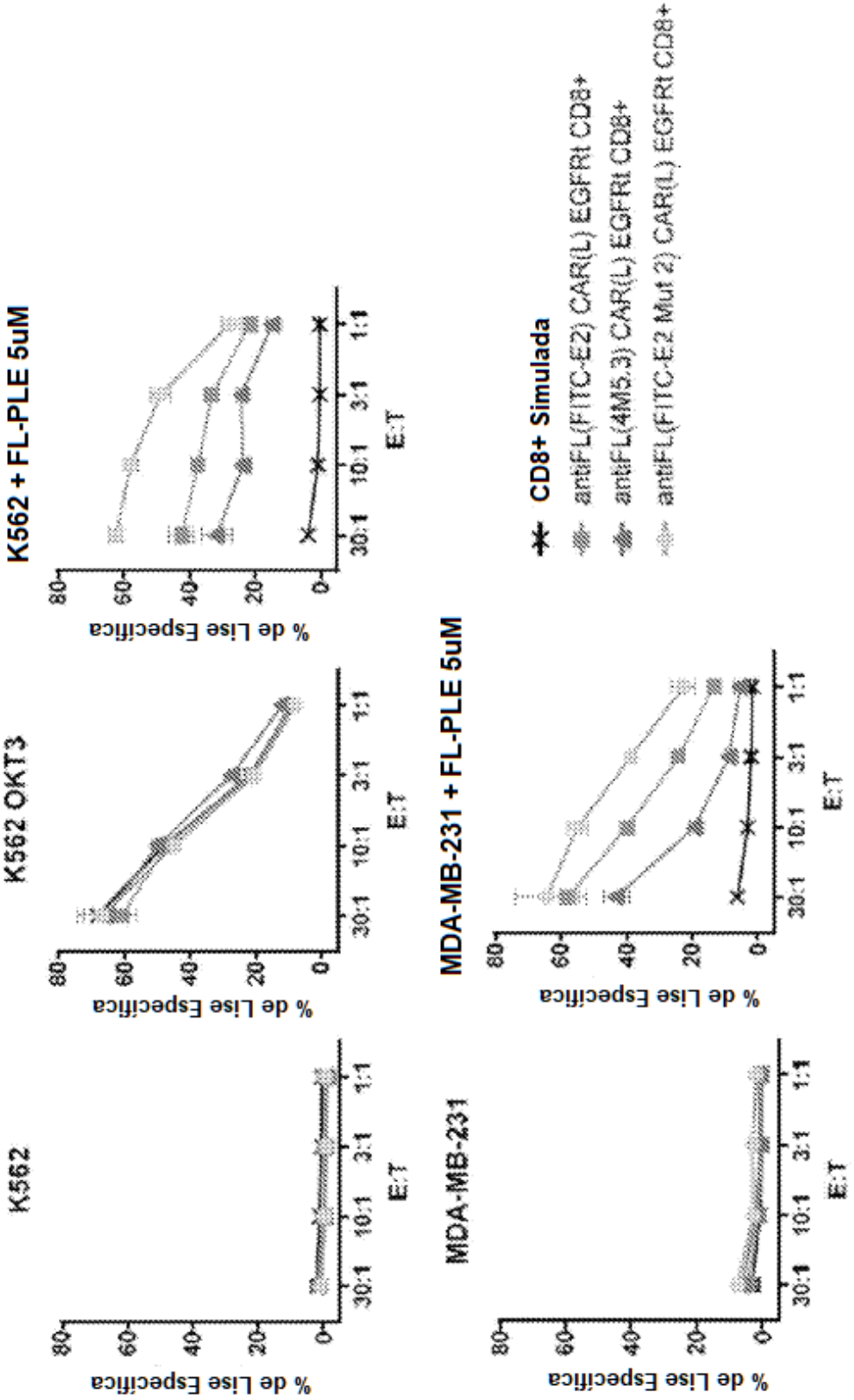

K562
K562 OKT3
K562 + FL-PLE 5uM
MDA-MB-231
MDA-MB-231 + FL-PLE 5uM
% de Lise Especifica
E:T
30:1
10:1
3:1
1:1
0
20
40
60
80
CD8+ Simulada
antiFL(FITC-E2) CAR(L) EGFRt CD8+
antiFL(4M5.3) CAR(L) EGFRt CD8+
antiFL(FITC-E2 Mut 2) CAR(L) EGFRt CD8+

FIG. 15C

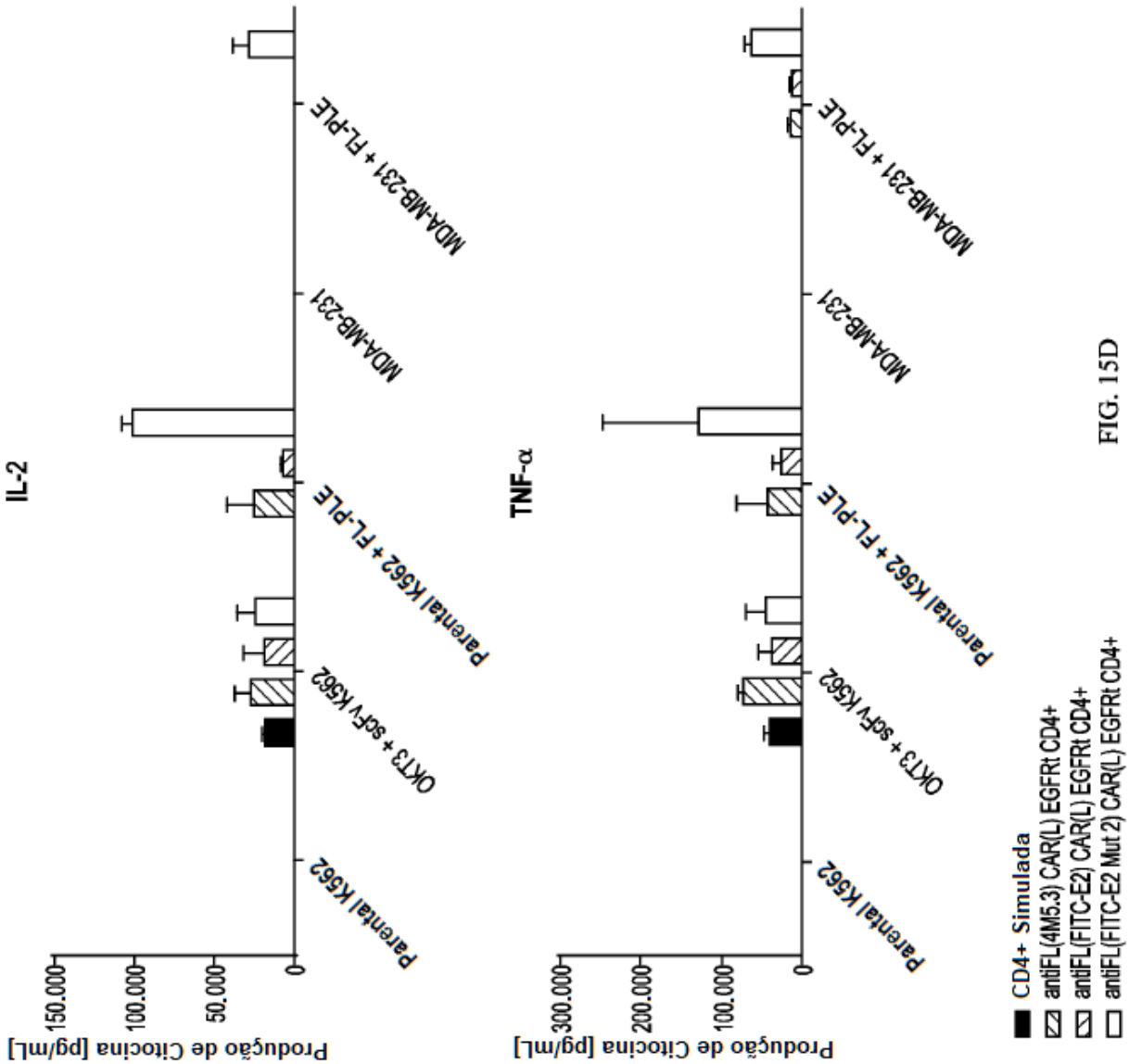

IL-2
Produção de Citocina [pg/mL]
150.000
100.000
50.000
0
Parental K562
OKT3 + scFv K562
Parental K562 + FL-PLE
MDA-MB-231
MDA-MB-231 + FL-PLE
TNF-α
Produção de Citocina [pg/mL]
300.000
200.000
100.000
0
Parental K562
OKT3 + scFv K562
Parental K562 + FL-PLE
MDA-MB-231
MDA-MB-231 + FL-PLE
CD4+ Simulada
antiFL(4M5.3) CAR(L) EGFRt CD4+
antiFL(FITC-E2) CAR(L) EGFRt CD4+
antiFL(FITC-E2 Mut 2) CAR(L) EGFRt CD4+

FIG. 15D

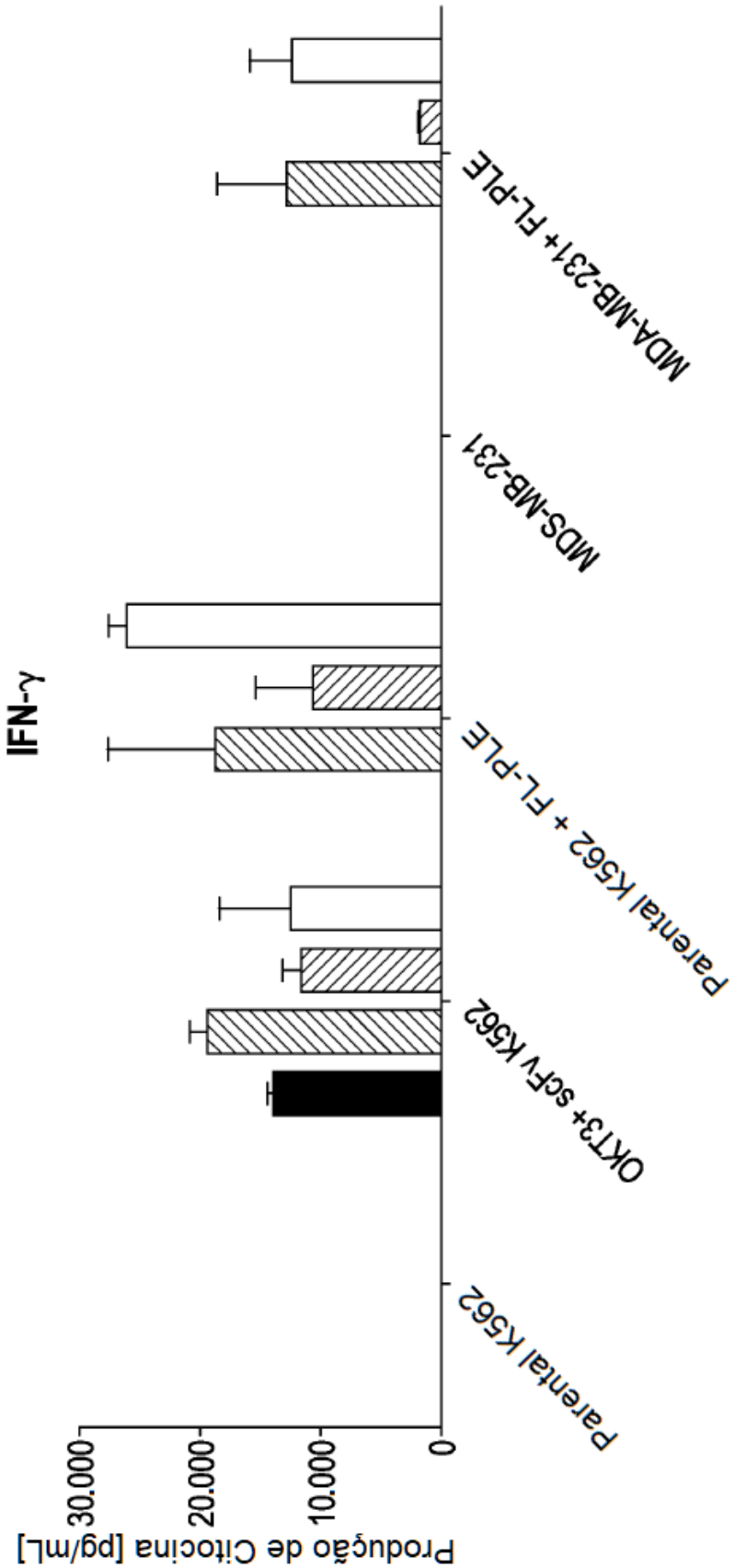


FIG. 15D (continuação)

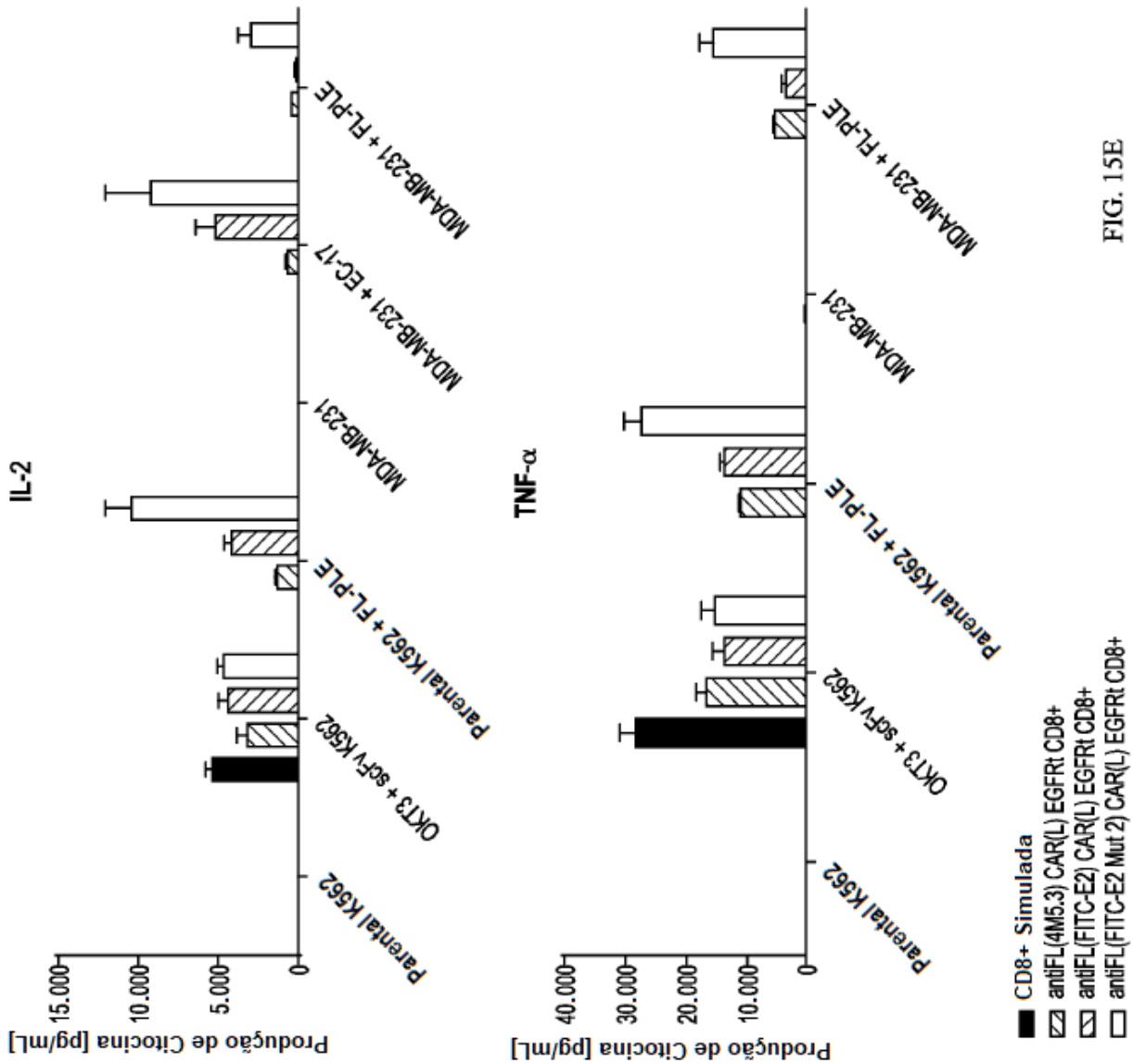

IL-2
Produção de Citocina [pg/mL]
15.000
10.000
5.000
0
Parental K562
OKT3 + scFv K562
Parental K562 + FL-PLE
MDA-MB-231
MDA-MB-231 + EC-17
MDA-MB-231 + FL-PLE
TNF-α
Produção de Citocina [pg/mL]
40.000
30.000
20.000
10.000
0
Parental K562
OKT3 + scFv K562
Parental K562 + FL-PLE
MDA-MB-231
MDA-MB-231 + FL-PLE
CD8+ Simulada
antiFL(4M5.3) CAR(L) EGFRt CD8+
antiFL(FITC-E2) CAR(L) EGFRt CD8+
antiFL(FITC-E2 Mut 2) CAR(L) EGFRt CD8+

FIG. 15E

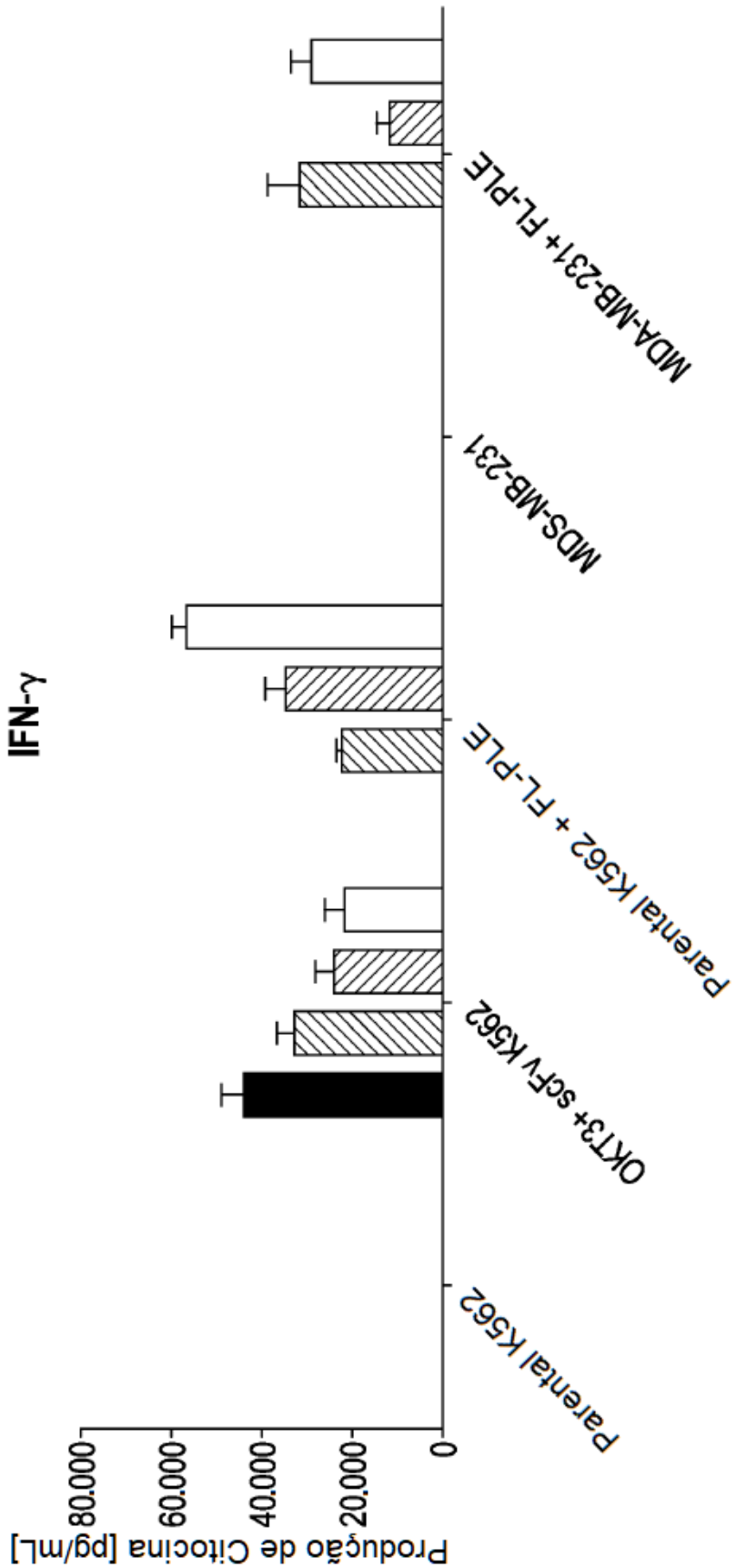


FIG. 15E (continuação)

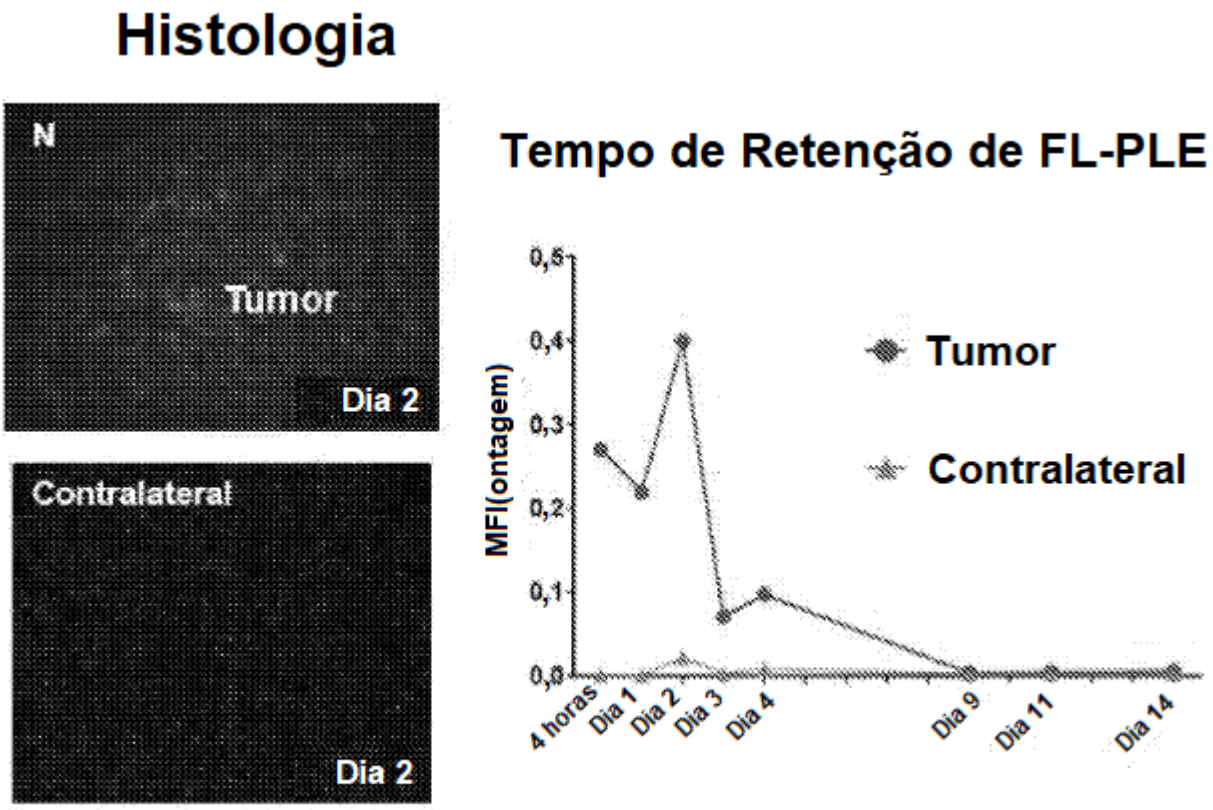

Histologia
N
Tumor
Dia 2
Contralateral
Dia 2
Tempo de Retenção de FL-PLE
MFI(ontagem)
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
4 horas
Dia 1
Dia 2
Dia 3
Dia 4
Dia 9
Dia 11
Dia 14
Tumor
Contralateral

FIG. 16

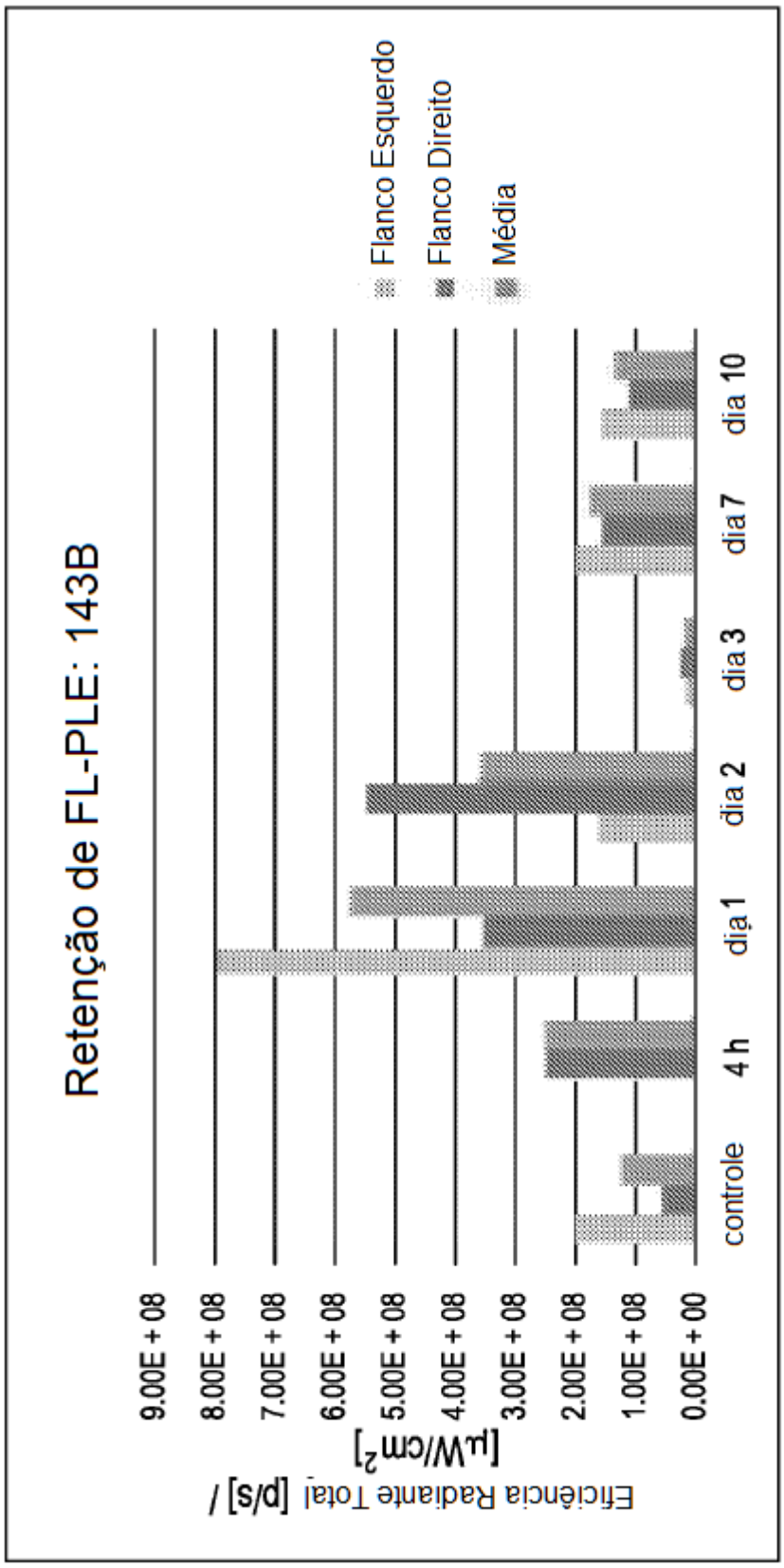

Retenção de FL-PLE: 143B
Flanco Esquerdo
Flanco Direito
Média
Eficiência Radiante Total [p/s] / [μW/cm²]
9.00E + 08
8.00E + 08
7.00E + 08
6.00E + 08
5.00E + 08
4.00E + 08
3.00E + 08
2.00E + 08
1.00E + 08
0.00E + 00
controle
4 h
dia 1
dia 2
dia 3
dia 7
dia 10

FIG. 17

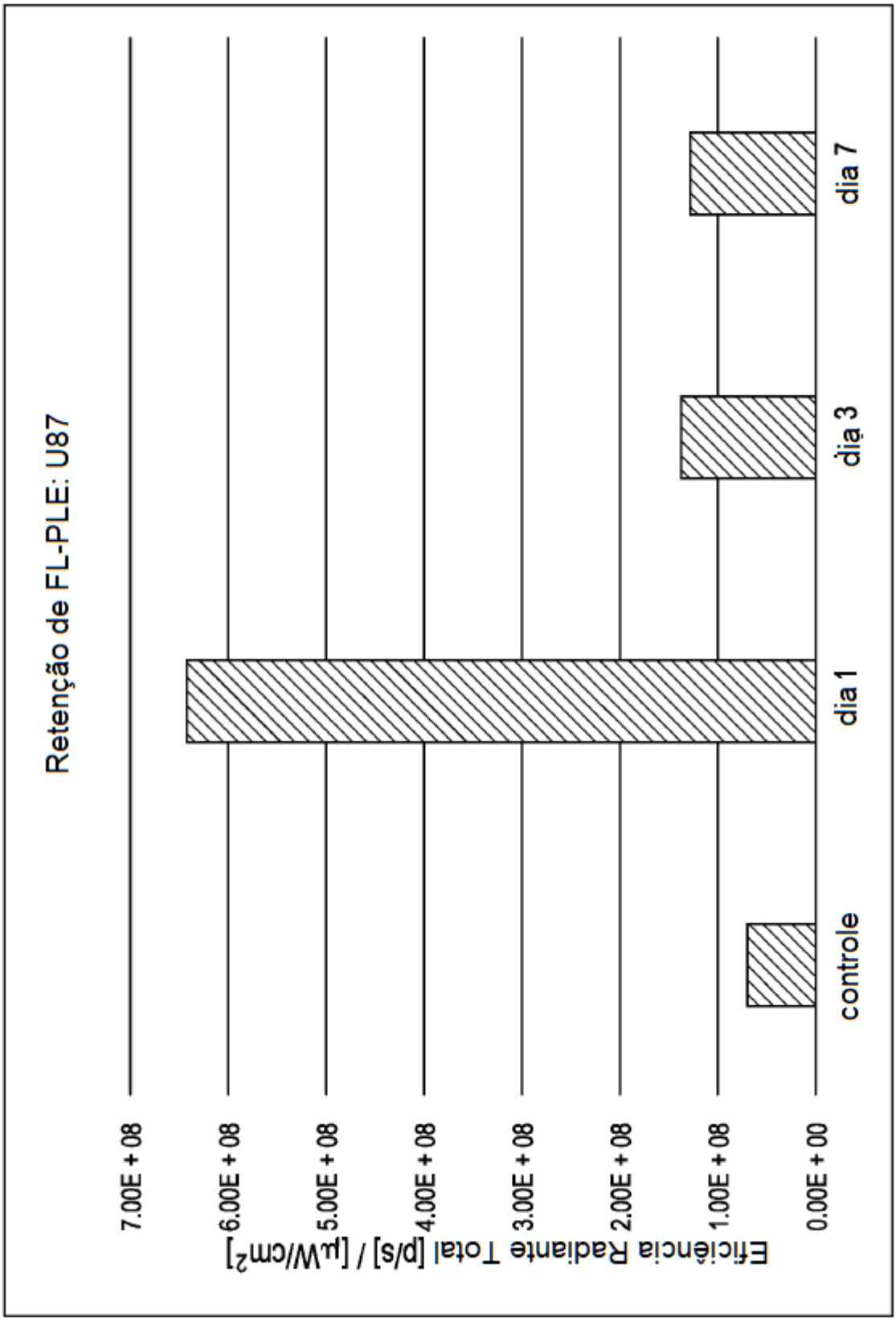


FIG. 17 (continuação)

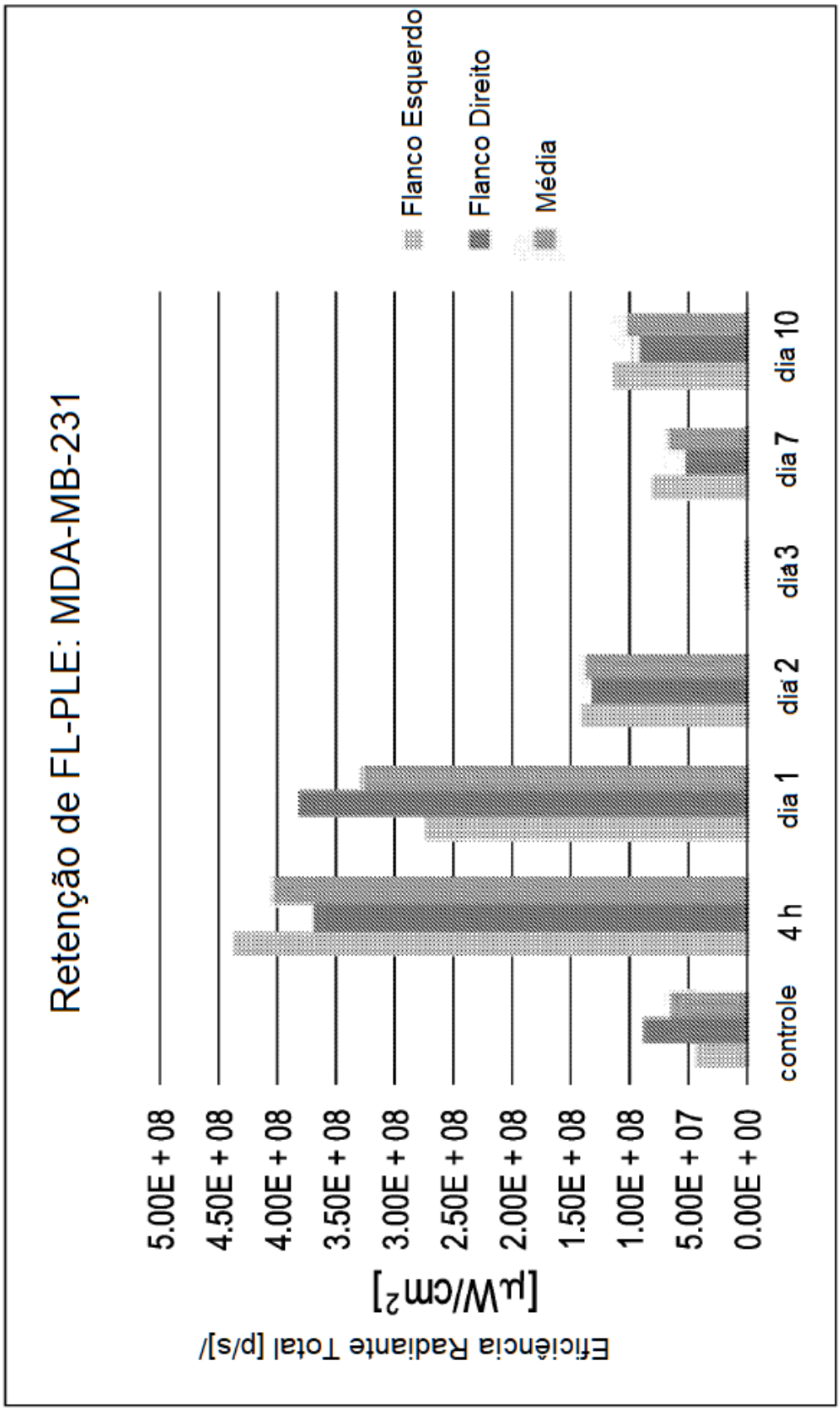


FIG. 17 (continuação)

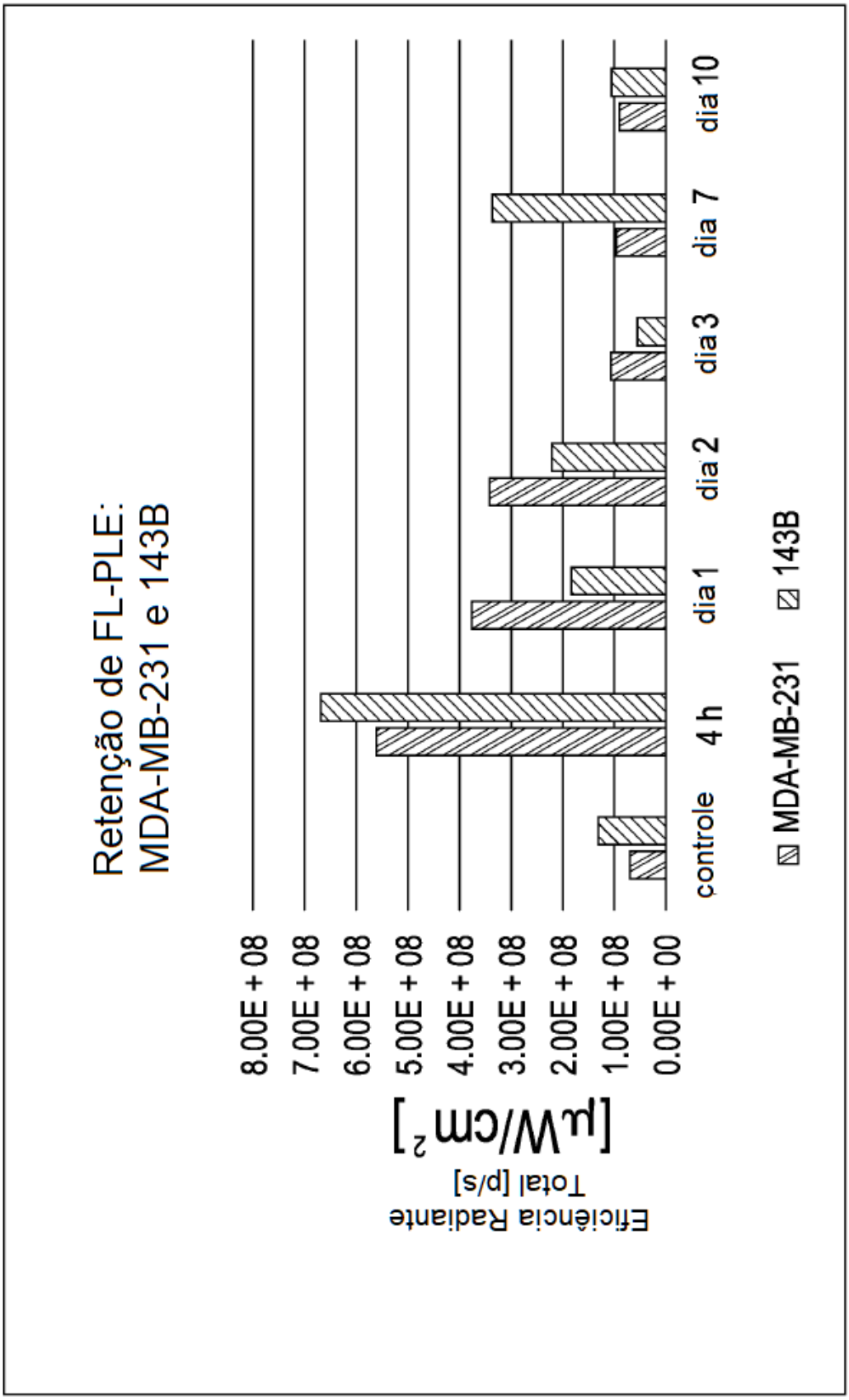


FIG. 17 (Continuação)

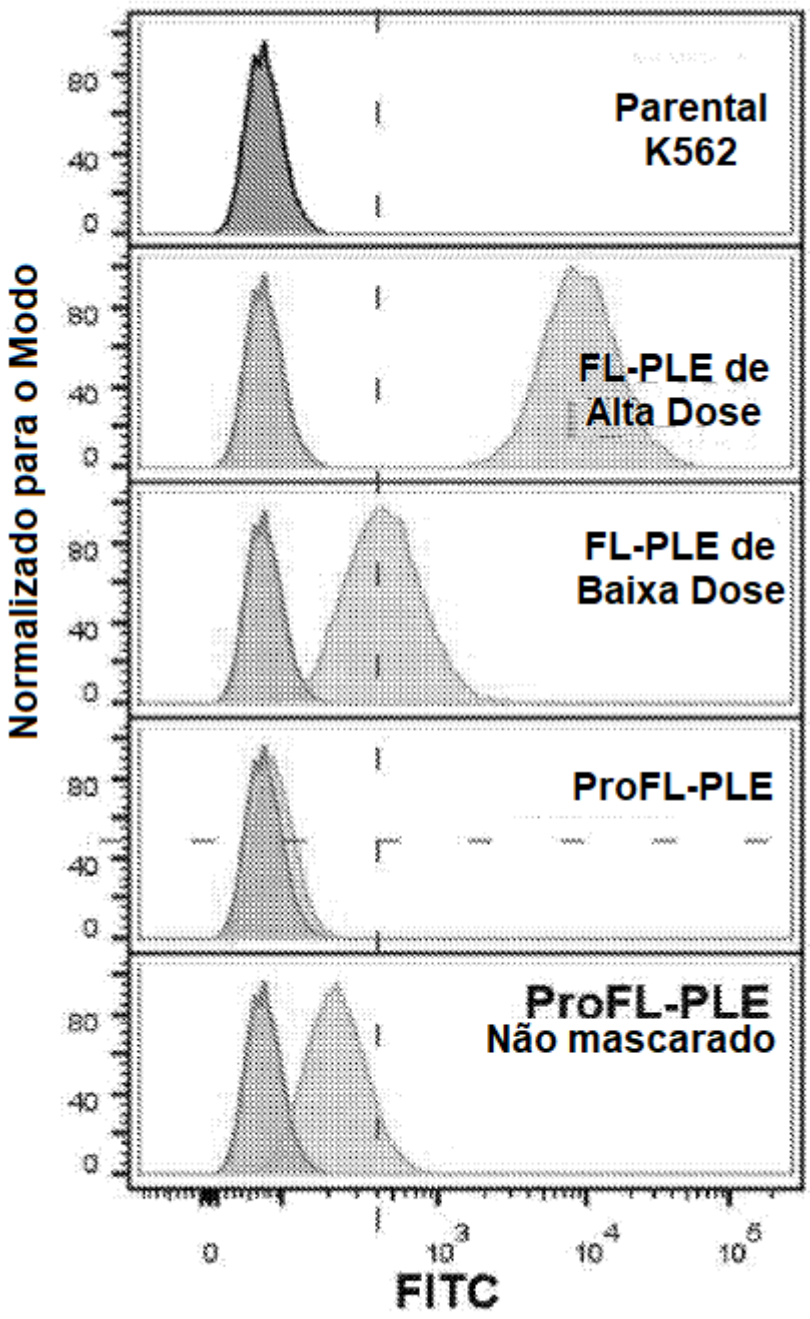

Normalizado para o Modo
Parental
K562
FL-PLE de
Alta Dose
FL-PLE de
Baixa Dose
ProFL-PLE
ProFL-PLE
Não mascarado
80
40
0
0
10^3
10^4
10^5
FITC

FIG. 18A

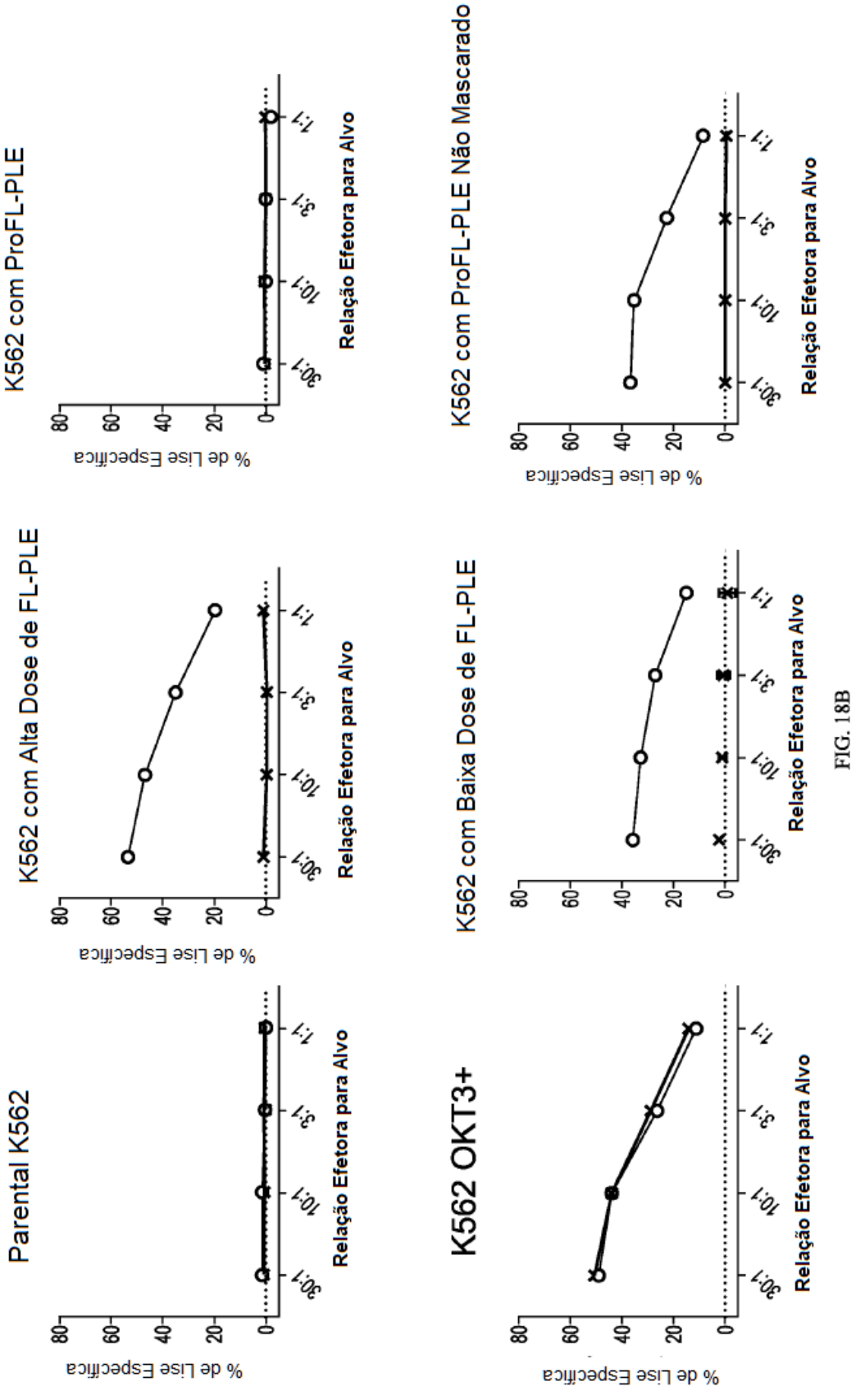

Parental K562
K562 com Alta Dose de FL-PLE
K562 com ProFL-PLE
K562 OKT3+
K562 com Baixa Dose de FL-PLE
K562 com ProFL-PLE Não Mascarado
% de Lise Específica
Relação Efetora para Alvo
0
20
40
60
80
1:1
3:1
10:1
30:1

FIG. 18B

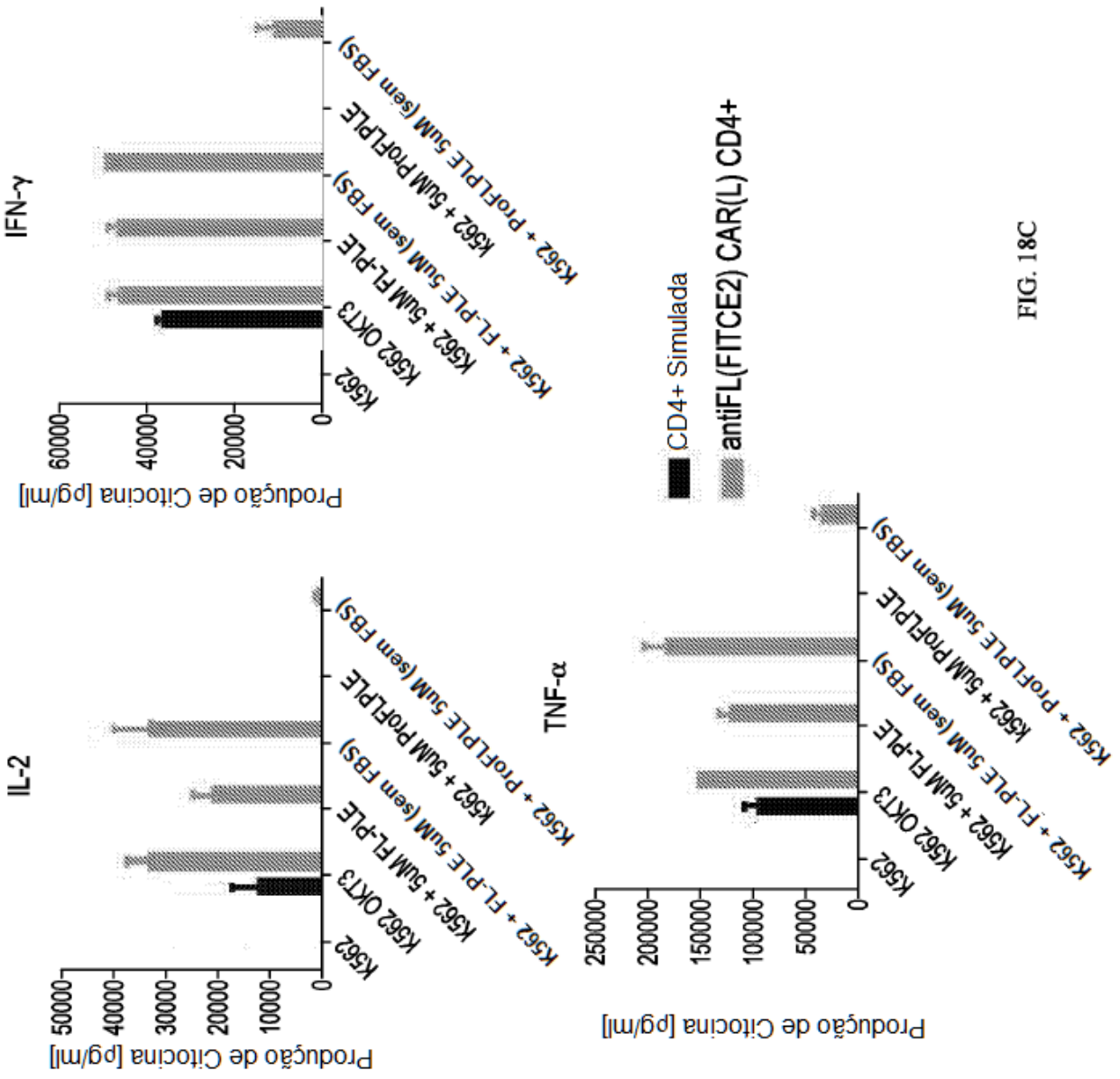

IFN-γ
Produção de Citocina [pg/ml]
60000
40000
20000
0
K562
K562 OKT3
K562 + 5uM FL-PLE
K562 + FL-PLE 5uM (sem FBS)
K562 + 5uM ProFLPLE
K562 + ProFLPLE 5uM (sem FBS)
IL-2
Produção de Citocina [pg/ml]
50000
40000
30000
20000
10000
0
K562
K562 OKT3
K562 + 5uM FL-PLE
K562 + FL-PLE 5uM (sem FBS)
K562 + 5uM ProFLPLE
K562 + ProFLPLE 5uM (sem FBS)
TNF-α
CD4+ Simulada
antiFL(FITCE2) CAR(L) CD4+
Produção de Citocina [pg/ml]
250000
200000
150000
100000
50000
0
K562
K562 OKT3
K562 + 5uM FL-PLE
K562 + FL-PLE 5uM (sem FBS)
K562 + 5uM ProFLPLE
K562 + ProFLPLE 5uM (sem FBS)

FIG. 18C

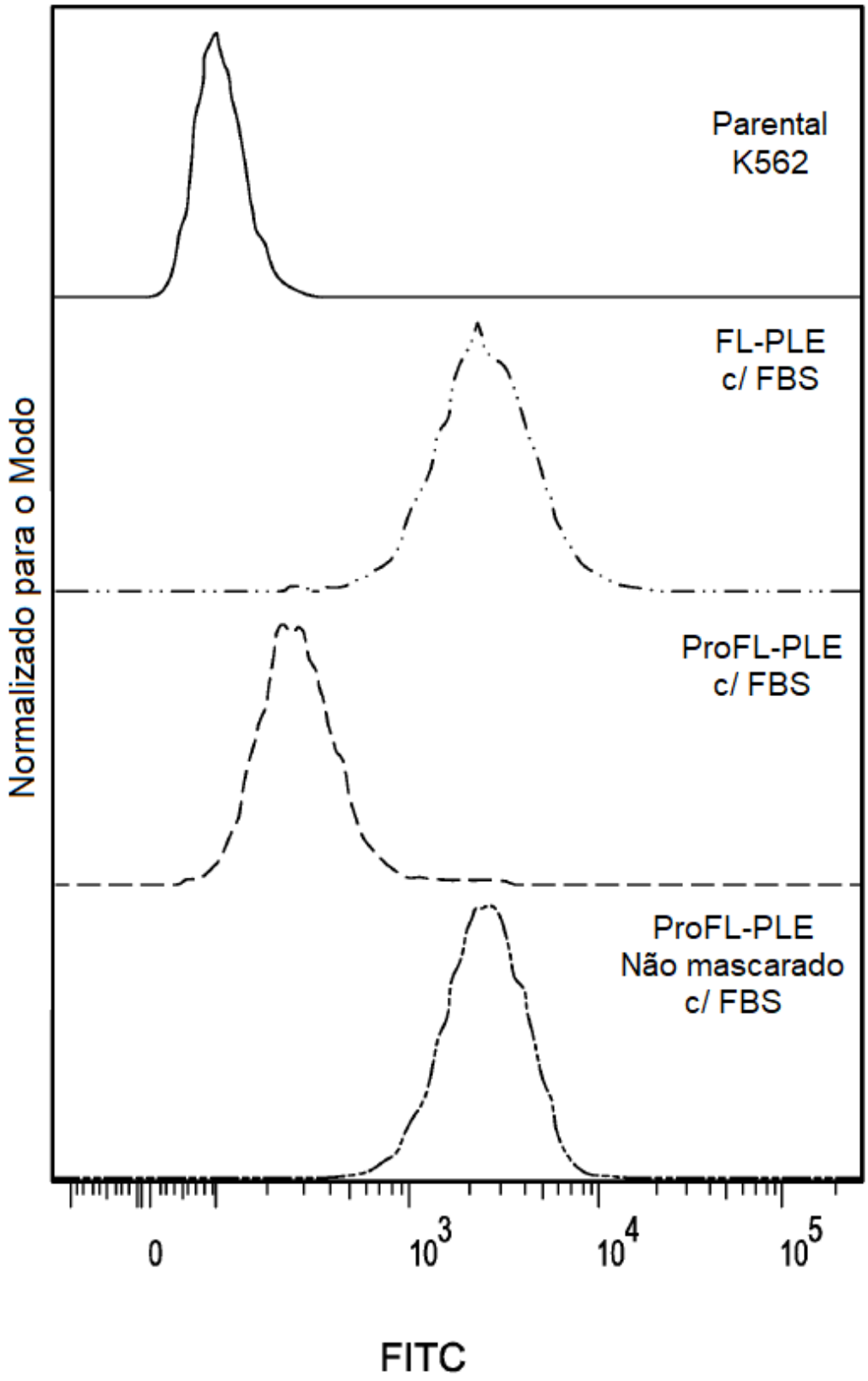

Parental
K562
FL-PLE
c/ FBS
ProFL-PLE
c/ FBS
ProFL-PLE
Não mascarado
c/ FBS
Normalizado para o Modo
0
10^3
10^4
10^5
FITC

FIG. 19A

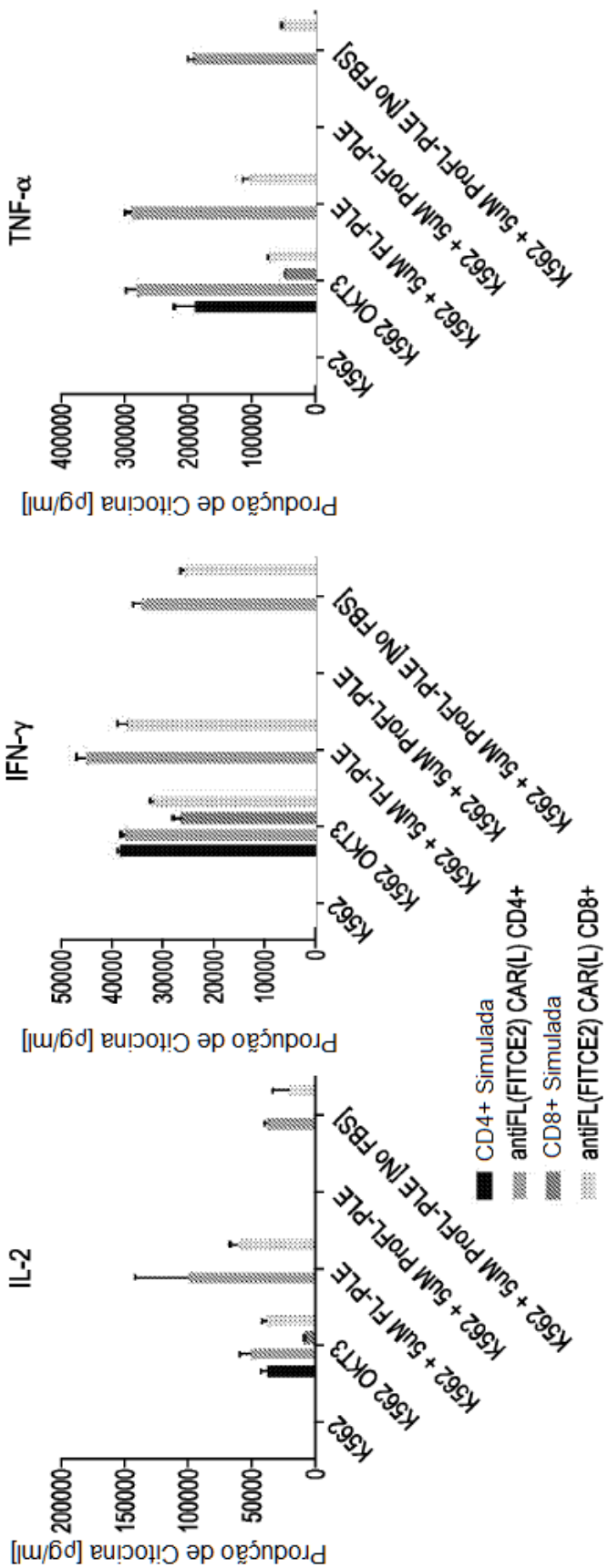

IL-2
IFN-γ
TNF-α
Produção de Citocina [pg/ml]
0
50000
100000
150000
200000
10000
20000
30000
40000
100000
200000
300000
400000
K562
K562 OKT3
K562 + 5uM FL-PLE
K562 + 5uM ProFL-PLE
K562 + 5uM ProFL-PLE [No FBS]
CD4+ Simulada
antiFL(FITCE2) CAR(L) CD4+
CD8+ Simulada
antiFL(FITCE2) CAR(L) CD8+

FIG. 19B

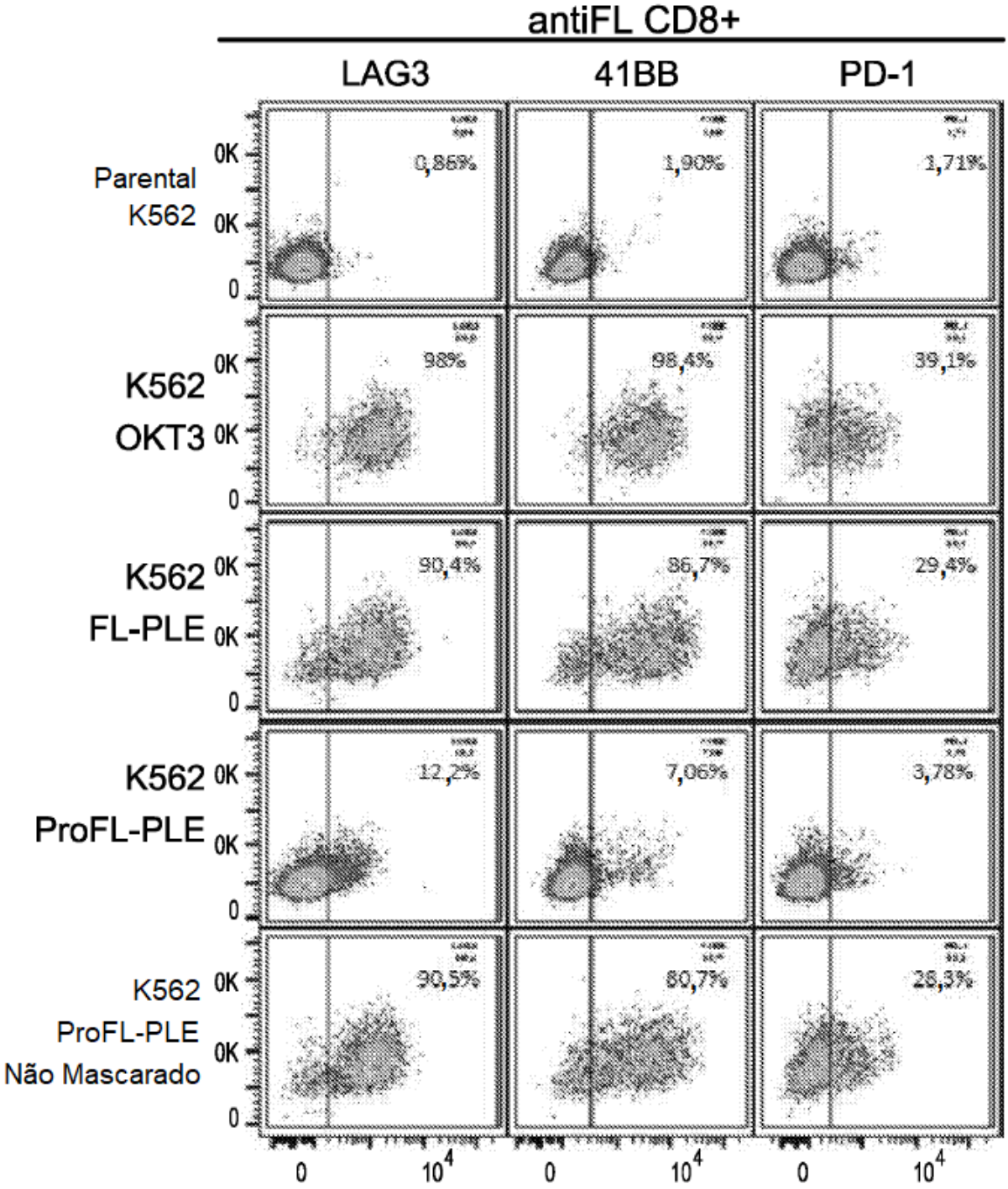

antiFL CD8+
LAG3
41BB
PD-1
Parental K562
K562 OKT3
K562 FL-PLE
K562 ProFL-PLE
K562 ProFL-PLE Não Mascarado
0,86%
1,90%
1,71%
98%
98,4%
39,1%
90,4%
86,7%
29,4%
12,2%
7,06%
3,78%
90,5%
80,7%
28,3%
0K
0
10^4

FIG. 19C

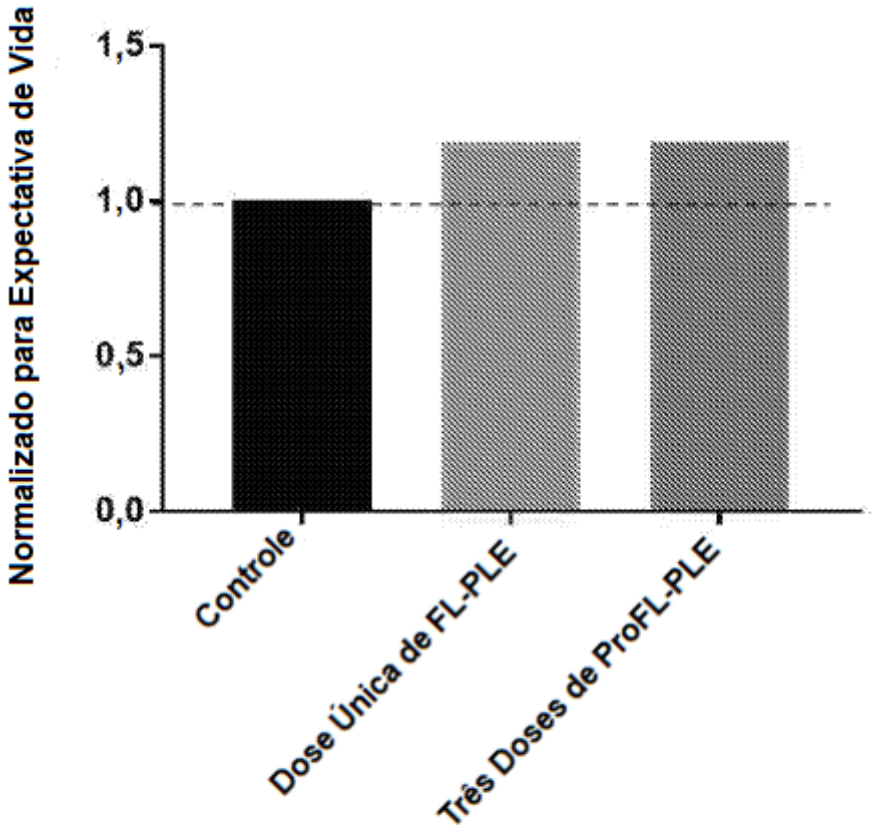

Normalizado para Expectativa de Vida
1,5
1,0
0,5
0,0
Controle
Dose Única de FL-PLE
Três Doses de ProFL-PLE

FIG. 20

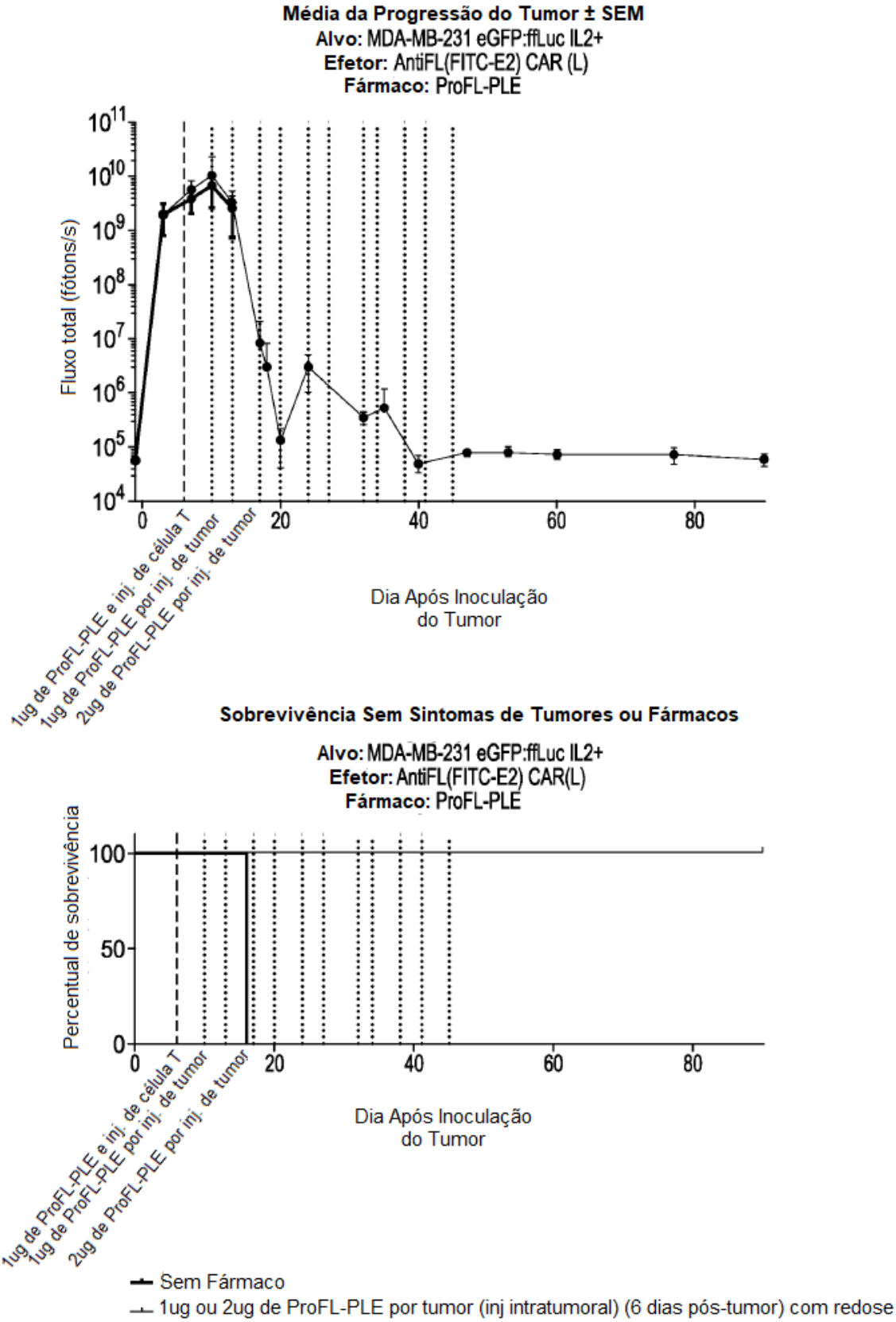

Média da Progressão do Tumor ± SEM
Alvo: MDA-MB-231 eGFP:ffLuc IL2+
Efetor: AntiFL(FITC-E2) CAR (L)
Fármaco: ProFL-PLE
Fluxo total (fótons/s)
10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
0
20
40
60
80
Dia Após Inoculação do Tumor
1ug de ProFL-PLE e inj. de célula T
1ug de ProFL-PLE por inj. de tumor
2ug de ProFL-PLE por inj. de tumor
Sobrevivência Sem Sintomas de Tumores ou Fármacos
Alvo: MDA-MB-231 eGFP:ffLuc IL2+
Efetor: AntiFL(FITC-E2) CAR(L)
Fármaco: ProFL-PLE
Percentual de sobrevivência
100
50
0
0
20
40
60
80
Dia Após Inoculação do Tumor
1ug de ProFL-PLE e inj. de célula T
1ug de ProFL-PLE por inj. de tumor
2ug de ProFL-PLE por inj. de tumor
Sem Fármaco
1ug ou 2ug de ProFL-PLE por tumor (inj intratumoral) (6 dias pós-tumor) com redose

FIG. 21A

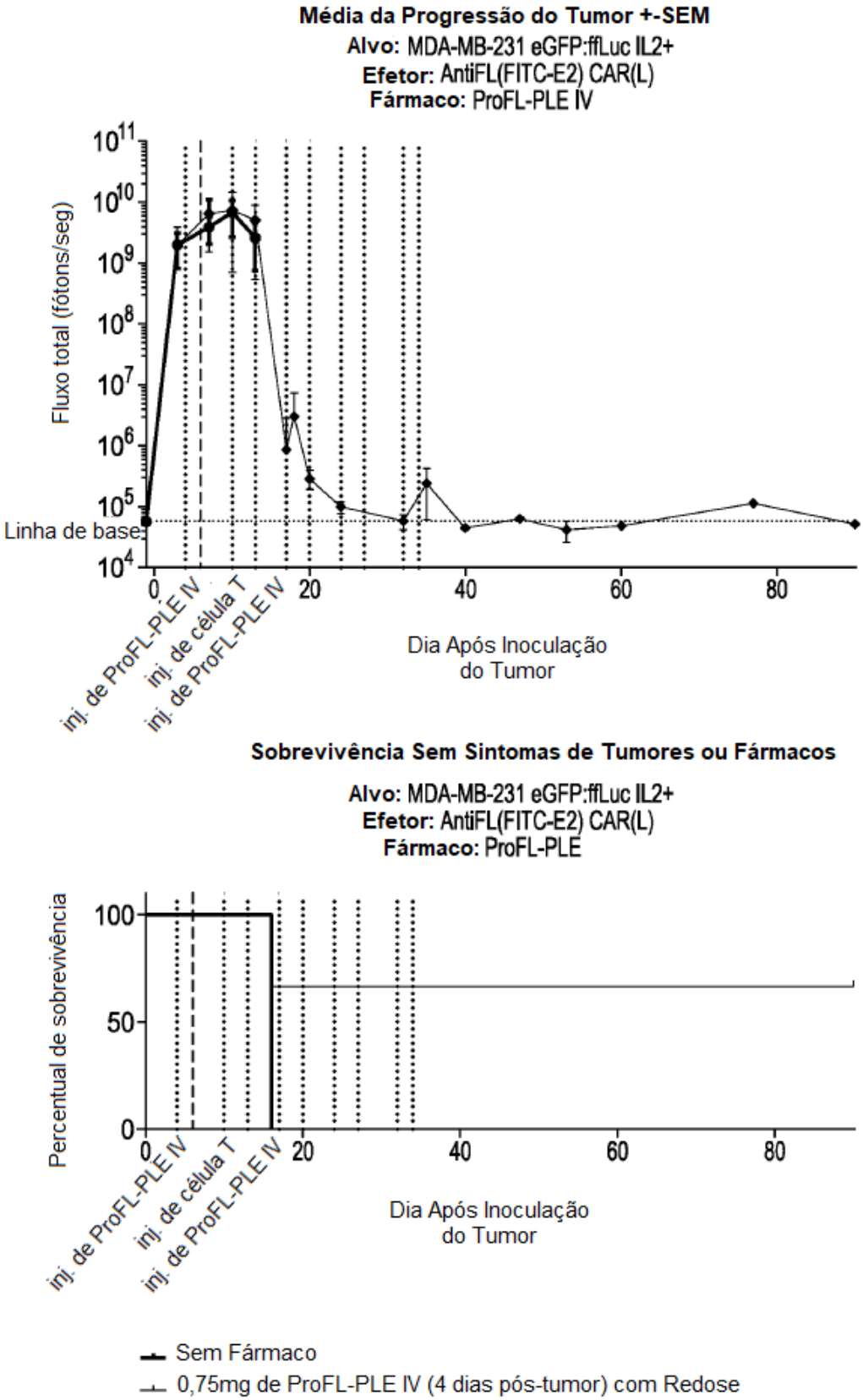

Média da Progressão do Tumor +-SEM
Alvo: MDA-MB-231 eGFP:ffLuc IL2+
Efetor: AntiFL(FITC-E2) CAR(L)
Fármaco: ProFL-PLE IV
Fluxo total (fótons/seg)
Linha de base
Dia Após Inoculação do Tumor
inj. de ProFL-PLE IV
inj. de célula T
inj. de ProFL-PLE IV
Sobrevivência Sem Sintomas de Tumores ou Fármacos
Alvo: MDA-MB-231 eGFP:ffLuc IL2+
Efetor: AntiFL(FITC-E2) CAR(L)
Fármaco: ProFL-PLE
Percentual de sobrevivência
Dia Após Inoculação do Tumor
Sem Fármaco
0,75mg de ProFL-PLE IV (4 dias pós-tumor) com Redose

FIG 21B

Resumo da Patente de Invenção para: **"RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICO (CARS) ESPECÍFICOS DE FLUORESCEÍNA EXIBINDO A FUNÇÃO DE CÉLULA T ÓTIMA CONTRA OS TUMORES MARCADOS POR FL-PLE"**

Os aspectos aqui descritos se referem a receptores de antígeno quiméricos (CARs) manipulados e suas composições com especificidade e afinidade para ligantes contendo fluoresceína apresentados na superfície das células tumorais. Também são aqui fornecidas composições incluindo CARs, compreendendo adicionalmente um braço espaçador e métodos para fabricar e usar essas composições.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequencias K.02.047.PI-BR.TXT
- Data de Geração do Código: 04/08/2020
- Hora de Geração do Código: 15:51:39
- Código de Controle:
  - Campo 1: EB7D9E3AA32E5611
  - Campo 2: 520FECE26AB34EF8