



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

(21) BR 112019014615-6 A2



(22) Data do Depósito: 17/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 02/06/2020

(54) **Título:** RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICO CONTRA AXL OU ROR2 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS

(51) **Int. Cl.:** C07K 16/28; A61K 39/395.

(30) **Prioridade Unionista:** 03/03/2017 US 62/467,059; 08/07/2017 US 62/530,193; 18/01/2017 US 62/447,898.

(71) **Depositante(es):** F1 ONCOLOGY, INC..

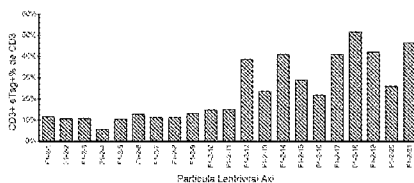
(72) **Inventor(es):** GREGORY IAN FROST; JAMES JOSEPH ONUFFER.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018014122 de 17/01/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/136570 de 26/07/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 16/07/2019

(57) **Resumo:** A presente revelação fornece receptores de antígenos quiméricos que se ligam a Axl e Ror2 e receptores de antígenos quiméricos (CARs) condicionalmente ativos que reconhecem Axl e Ror2. Além disso, são fornecidos aqui ácidos nucleicos que codificam esses CARs e métodos de preparo e uso dos CARs, incluindo métodos de tratamento de câncer, especialmente cânceres que expressam Axl e/ou Ror2, como carcinoma de célula renal. A presente revelação fornece células geneticamente modificadas para produzir os CARs.



## RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICO CONTRA AXL OU ROR2 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS

### Referência cruzada a pedidos relacionados

[1] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório nº US 62/447.898, depositado em 18 de janeiro de 2017, Pedido Provisório nº US 62/467.059, depositado em 3 de março de 2017, e Pedido Provisório nº US 62/530.193, depositado em 8 de julho De 2017 Estes pedidos citados neste parágrafo estão aqui incorporados por referência em sua totalidade.

### Listagem de sequências

[2] Este pedido incorpora por referência o material da Listagem de Sequência eletrônica arquivada concomitantemente. Os materiais na listagem de sequência eletrônica são submetidos como um arquivo de texto (.txt) intitulado “F1.002.WO.01\_Seqlist.txt” criado em 17/1/2018, que tem um tamanho de arquivo de 126 KB e está incorporado ao presente documento por referência em sua totalidade.

### Acordo de pesquisa conjunta

[3] A F1 Oncology, Inc. e a BioAtla, LLC são partes de um acordo de pesquisa conjunta que se relaciona com a matéria aqui revelada.

### Campo da revelação

[4] Esta revelação refere-se a receptores de antígenos quiméricos e usos dos receptores de antígenos quiméricos em métodos diagnósticos e terapêuticos.

### Antecedentes da revelação

[5] Na imunoterapia adoptiva à base de células, as células imunes isoladas de um paciente podem ser modificadas para expressar proteínas sintéticas que permitem que as células desempenhem novas funções terapêuticas depois de serem subsequentemente transferidas de volta para o paciente. Um exemplo de tal proteína sintética é um receptor de antígeno quimérico (CAR). Um exemplo de um CAR atualmente usado é a fusão de um domínio de reconhecimento extracelular (por exemplo, uma região de

direcionamento específica de antígeno ou ASTR), um domínio transmembranar e um ou mais domínios de sinalização intracelular. No acoplamento antigênico, a porção de sinalização intracelular do CAR pode iniciar uma resposta relacionada à ativação em uma célula imune, como liberação de moléculas citolíticas para induzir a morte de células tumorais, etc. Embora CARs e terapia CAR-T tenham sido muito eficazes nos tipos de cânceres do sangue, continua a existir necessidade de terapia com CARs e CAR-T contra tumores sólidos, que se revelaram até agora muito mais evasivos.

[6] Embora os CARs representem um método impressionante para tratar várias doenças, a segurança dos CARs foi recentemente questionada por meio de eventos adversos durante os ensaios clínicos. Um método para diminuir esses eventos adversos é reduzindo a ligação não tumoral no alvo dos ASTRs. CARs com ASTRs condicionalmente ativos ligam-se apenas ao antígeno sob certas condições, como aquelas que existem no microambiente tumoral, e fornecem uma redução na ligação não tumoral no alvo de modo que os CARs não se liguem ao antígeno em condições fisiológicas normais. Dessa forma, os efeitos colaterais desses CARs são reduzidos e o tratamento pode prosseguir com mais segurança.

[7] As tirosina quinases receptoras (RTKs) são uma família de receptores da superfície celular que regulam uma faixa de processos celulares normais através de atividade de tirosina-quinase controlada por ligante. Nos últimos 20 anos, a desregulação das RTKs mostrou desempenhar um papel crítico no desenvolvimento e progressão do câncer. Os RTKs são agora reconhecidos como biomarcadores moleculares prognósticos e como alvos da terapêutica oncológica.

[8] A proteína Axl (também conhecida como Ark, UFO, Tyro-7) é uma RTK da família Tyro-3 de quinases. As quinases receptoras Tyro-3 são caracterizadas por uma combinação de dois domínios do tipo imunoglobina e repetições duplas de fibronectina tipo III na região extracelular e um domínio citoplásmico de quinase. Os ligantes para as quinases do receptor Tyro-3 são

Gas6 (específico de paragem de crescimento 6) e proteína S, duas proteínas dependentes de vitamina K que apresentam 43% de identidade de sequência de aminoácidos e compartilham estruturas de domínio similares. Cada proteína possui um domínio N-terminal de Gla contendo 11 g de resíduos de ácido carboxiglutâmico, seguido por quatro módulos similares ao fator de crescimento epidérmico (EGF), e uma estrutura similar à estrutura do tipo globlina de ligação ao hormônio sexual (SHBG) C-terminal de dois domínios de laminina G aleatórios. O domínio SHBG é necessário e suficiente para a ligação e ativação da quinase receptora Tyro-3, enquanto o domínio Gla liga os fosfolipídeos da membrana carregados negativamente e desempenha um papel importante na fagocitose mediada por Tyro-3-quinase de células apoptóticas.

[9] A ativação de axl leva à sinalização através da PI-3-quinase/Akt e outras vias principais como Ras/Erk e  $\beta$ -catenina/TCF. O axl é fracamente expresso em uma variedade de tecidos normais, incluindo cérebro, coração, músculo esquelético, cápsulas de órgãos e tecidos conjuntivos de vários outros órgãos, e em monócitos, mas não em linfócitos. A fosforilação de Akt induzida por Axl tem sido descrita na sobrevivência de fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas vasculares e neurônios. Além disso, o Axl desempenha um papel na adesão celular e na quimiotaxia devido ao fato de que os animais com knockout de Axl apresentam uma estabilização deficiente dos agregados plaquetários e formação de trombos como resultado da redução da ativação da integrina plaquetária IIb3.

[10] A desregulação de Axl ou do seu ligante Gas6 está implicada na patogênese de vários cânceres humanos. A superexpressão de Axl foi demonstrada em vários tipos de câncer, por exemplo, mama (Meric et al., *Clin. Cancer Res.*, vol. 8, páginas 361-367, 2002; Berclaz et al., *Ann. Oncol.*, vol. 12, páginas 819-824, 2001), cólon (Chen et al., *Int. J. Cancer*, vol. 83, páginas 579-584, 1999; Craven et al., *Int. J. Cancer*, vol. 60, páginas 791-797, 1995), próstata (Jacob et al., *Cancer Detect. Prev.*, vol. 23, páginas 325-332, 1999), pulmões (Wimmel et al., *Eur J Cancer*, vol. 37, páginas 2264-2274, 2001), gástrico (Wu et

al., *Anticancer Res.*, vol. 22, páginas 1071-1078, 2002), ovário (Sun et al., *Oncology*, vol. 66, páginas 450-457, 2004), endométrio (Sun et al., *Ann. Oncol.*, vol. 14, páginas 898-906, 2003), rins (Chung et al., *DNA Cell Biol.*, vol. 22, páginas 533-540, 2003), hepatocellular (Tsou et al., *Genomics*, vol. 50, páginas 331-340, 1998), tiroide (Ito et al., *Thyroid*, vol. 12, páginas 971-975, 2002; Ito et al., *Thyroid*, vol. 9, páginas 563-567, 1999), osteossarcoma (Nakano et al., *J. Biol. Chem.*, vol. 270, páginas 5702-5705, 2003), melanoma (van Ginkel et al., *Cancer Res.*, vol. 64, páginas 128-134, 2004), em carcinoma de célula escamosa da cabeça e pescoço (Green et al., *Br J. Cancer.*, vol. 94, páginas 1446-51, 2006), câncer de ovário, câncer renal, glioma, endócrino, pâncreas, linfoma, cérebro, fígado, carcinoma de células renais, células claras renais, bexiga, reto, carcinoma de células escamosas do colo do útero e, além disso, em linfoma e várias leucemias, incluindo leucemia mieloide crônica (Janssen et al., *Oncogene*, vol. 6, páginas 2113-2120, 1991; Braunger et al., *Oncogene*, vol. 14, páginas 2619-2631 1997; O'Bryan et al., *Mol. Cell. Biol.*, vol. 11, páginas 5016-5031, 1991), e leucemia mieloide aguda (Rochlitz et al., *Leukemia*, vol. 13, páginas 1352-1358, 1999).

[11] A expressão de axl é induzida por fármacos quimioterápicos direcionados e a expressão de Axl induzida por fármacos confere resistência à quimioterapia na leucemia mieloide aguda (Hong et al, *Cancer Letters*, vol. 268, páginas 314-324, 2008), bem como resistência ao imatinib e Lapatinib/Herceptin em tumores estromais gastrointestinais (Mehadevan, et al, *Oncogene*, vol. 26, páginas 3909-3919, 2007) e câncer de mama (Liu et al, *Cancer Research*, vol. 281, páginas 6871-6878, 2009), respectivamente.

[12] Além disso, foi identificado que o Axl está relacionado com a metástase do tumor, devido ao fato de que o Axl é regulado positivamente em linhas celulares de câncer de mama agressivas, em comparação com células não invasivas. *In vitro*, a atividade do axl foi necessária para migração e invasão, e essa atividade pode ser inibida pelo tratamento com anticorpos (WO 04/008147). De modo similar, a revogação da atividade do Axl *in vivo*, seja via

expressão de uma versão dominante negativa do Axl (Vajkoczy, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Science U.S.A.*, vol. 103, páginas 5799-5804, 2005) ou por siRNA mediado por regulação decrescente de Axl (Holland et al., *Cancer Res.*, vol. 65, páginas 9294-9303, 2005) preveniu o crescimento celular subcutâneo e ortotópico em experimentos de xenoenxerto murino.

[13] Consequentemente, foram sugeridos anticorpos monoclonais anti-Axl para uso no tratamento de cânceres. Por exemplo, publicações relativas a anticorpos anti-Axl incluem o documento WO 2009/063965, WO 2009/062690, WO 2011/014457, US 2014/0227283 e a Patente nº US 8.853.369. O documento US 2014/0227283 revela anticorpos monoclonais anti-Axl e seus usos em métodos de diagnóstico e terapêutico. O documento WO 2009/062690 revela anticorpos que se ligam ao domínio extracelular da proteína Axl e podem inibir pelo menos parcialmente a atividade de Axl. No entanto, mesmo para alvos como Axl, em que os anticorpos monoclonais foram identificados e estão disponíveis como reagentes, existem muitos desafios que tornam muito difícil criar um CAR condicionalmente ativo contra o Axl ou Ror2.

[14] Outro RTK, Ror2, também chamado de receptor órfão tipo receptor de tirosina quinase 2, é um ligante de membrana que é ativado pela sinalização Wnt não canônica através de sua associação com a glicoproteína Wnt5A durante o desenvolvimento normal de osso e cartilagem. Ror2 possui apenas um domínio transmembranar, que separa seus domínios extracelular e intracelular. Ror2 é conhecido por desempenhar papéis cruciais no desenvolvimento normal de vários órgãos e tecidos. Em mamíferos, camundongos deficientes em Ror2 e Wnt5A exibem anormalidades similares durante a morfogênese do desenvolvimento, refletindo seus defeitos em movimentos de extensão convergentes e polaridade de células planas. Além disso, as mutações do gene Ror2 humano são responsáveis pelos distúrbios genéticos do esqueleto, tipo braquidactilia dominante, e síndrome de Robinow recessiva. Verificou-se que Ror2 media a migração celular polarizada e o mau funcionamento dos resultados da Ror2 em distúrbios esqueléticos hereditários e invasão tumoral (Minami et al.,

“Ror-family receptor tyrosine kinases in noncanonical Wnt signaling: their implications in developmental morphogenesis and human diseases”, *Dev Dyn.*, vol. 239, páginas 1-15, 2010). Adicionalmente, Debebe et al., (“Ror2 as a therapeutic target in cancer”, *Pharmacol. Ther.*, vol. 50, páginas 143-148, 2015) revela que Ror2 media tanto vias de sinalização canônicas quanto não-canônicas.

[15] Relatou-se que Ror2 também tem efeitos pró-tumorigênicos. O documento US 2014/0322234 revela que a expressão e a atividade de Ror2 em diversos cânceres é diferente dos tecidos normais. Assim, sugere-se que a desregulação de Ror2 desempenha um papel na patogênese de uma variedade de cânceres humanos. O documento US 2014/0322234 também contempla que os anticorpos contra Ror2 possam ser usados no diagnóstico de cânceres e na inibição do crescimento de células cancerosas. Por exemplo, tais anticorpos podem ser conjugados com um agente citotóxico que tem um elevado grau de citotoxicidade para células cancerosas que expressam Ror2, de modo que o agente citotóxico possa matar eficazmente as células cancerígenas. O gene Ror2 também pode ser usado na classificação de cânceres de acordo com o padrão de expressão Ror2 nos cânceres.

[16] Ror2 está envolvido no desenvolvimento e progressão de cânceres (“The dual role of the novel Wnt receptor tyrosine kinase, Ror2, in human carcinogenesis”, *International Journal of Cancer*, vol. 133, páginas 779–787, 2013). Especificamente, verificou-se que Ror2 desempenha um papel crucial na carcinogênese de inúmeros cânceres, incluindo câncer de cólon, carcinoma hepatocelular, melanoma metastático e carcinoma de células renais. Por exemplo, Ror2 é superexpresso em osteossarcoma, melanoma, carcinoma de células renais, carcinoma de próstata, carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, câncer de cólon, câncer de mama, linfoma, leucemia, tireoide, pâncreas endócrino, cérebro, ovário, papilar renal, pulmão, pâncreas, fígado, células claras renais, bexiga, endométrio, reto, carcinoma de células escamosas do colo do útero e tumores estromais. Na maioria desses tipos de câncer, a

expressão de Ror2 está associada a estados de câncer mais agressivos. Ror2 tem, assim, o potencial de ser um alvo de fármacos para tratamentos de câncer por inibição da via de sinalização de Wnt.

[17] Permanece a necessidade de um tratamento eficaz que aproveite o poder do sistema imune para combater o câncer, mas que tenha reduzido ou eliminado os efeitos não tumorais no alvo, bem como os efeitos fora do alvo. Embora os anticorpos monoclonais contra Ror2 e Axl estejam comercialmente disponíveis, há uma necessidade de CARs que incluam fragmentos de anticorpos direcionados a Ror2 ou Axl que sejam condicionalmente ativos, que efetivamente direcionam células expressando Ror2 ou Axl somente em certos ambientes, como um microambiente de câncer. Criar esses CARs condicionalmente ativos apresenta inúmeros desafios. Por exemplo, fragmentos de anticorpos devem ser criados e identificados, que não só se ligam a Axl ou Ror2 quando são expressos na superfície de células T ou NK como parte de CARs, mas que adicionalmente têm a capacidade de reconhecer um epítopo que é exposto em células cancerosas. Além disso, tais CARs se ligam muito aos seus alvos de uma maneira condicionalmente ativa, especialmente sob o pH ácido de um tumor comparado a um pH fisiológico normal. Adicionalmente, tais CARs candidatos, quando ligados ao seu alvo, devem ativar uma célula T ou célula NK expressando o CAR para expressar uma função citotóxica. Assim, existem muitos requisitos para que um CAR contendo um tal fragmento de anticorpo ajude a resolver problemas impostos pelos métodos atuais de CAR-T. Tal CAR condicionalmente ativo contra Axl ou Ror2 seria promissor para o tratamento de cânceres sólidos usando a terapia CAR-T, superando assim uma grande limitação das atuais terapias de CAR-T.

#### Sumário da revelação

[18] A presente revelação fornece receptores de antígenos quiméricos (CARs) e ácidos nucleicos que compreendem sequências nucleotídicas que codificam os CARs que se ligam a Axl e/ou Ror2, e CARs biológicos condicionalmente ativos (CAB) que se ligam a Axl e Ror2. A presente revelação

fornece células geneticamente modificadas para produzir os CARs e métodos para produzir tais células. Os CARs da presente revelação podem ser usados em vários métodos, que são também fornecidos, incluindo métodos para ativação de células imunes sob certas condições, como um pH abaixo de um valor limiar, métodos para realizar terapia celular adoptiva como terapia CAR, por exemplo, terapia CAR contra o câncer, por exemplo, carcinoma das células renais.

[19] Detalhes dos aspectos e modalidades aqui fornecidas são fornecidos ao longo desta revelação. Por uma questão de clareza, essa seção Sumário não pretende ser, e não deve ser interpretada como limitando o escopo da revelação aqui fornecida.

#### Breve descrição dos desenhos

[20] A Figura 1 fornece um gráfico de barras mostrando a transdução percentual de células CD3+ com base na análise FACS da expressão eTag.

[21] As Figuras 2A-2F mostram os resultados de ensaios de morte em tempo real de células CHO-Axl a pH 6,7 e pH 7,4 por células T expressando um CAR de controle com um ASTR de tipo selvagem que reconhece Axl (Figura 2A) e células T expressando candidatos a CAB-CARs que reconhecem o Axl, que têm ASTRs condicionalmente ativos que reconhecem Axl (Figuras 2B-2F). A razão entre efector e alvo foi de 3:1 nas Figuras 2A e 2B, e de 1:1 nas Figuras 2C-2F.

[22] As Figuras 3A-3J mostram os resultados de ensaios de morte em tempo real de células CHO-Ror2 a pH 6,7 e pH 7,4 por células T expressando um CAR de controle com um ASTR de tipo selvagem que reconhece Ror2 (Figura 3A) e células T expressando CAB-CARs candidatos que reconhecem Ror2, que têm ASTRs condicionalmente ativos que reconhecem Ror2 (Figuras 3B-J). A razão entre efector e alvo foi de 1:1.

[23] A Figura 4A mostra resultados representativos de um ensaio de morte em tempo real de células CHO-Axl por células T que expressam um dos CARs condicionalmente ativos contra Axl aqui fornecidos, a vários pHs. A Figura

4B fornece resultados de lise no ponto no tempo de 20 horas a vários pHs como referido, para o mesmo CAB-CAR como na Figura 4A.

[24] A Figura 5A mostra resultados representativos de um ensaio de morte em tempo real de células CHO-Ror2 por células T que expressam um dos CAB-CAR condicionalmente ativos contra Ror2 aqui fornecidos, a vários pHs. A Figura 5B fornece resultados de lise no ponto no tempo de 20 horas a vários pHs como referido, para o mesmo CAB-CAR como na Figura 5A.

[25] A Figura 6A mostra os resultados de ensaios de morte em tempo real de células Caki-1 humanas a pH 6,7 e pH 7,4 por células T expressando um dos CAB-CAR condicionalmente ativos contra Axl. A Figura 6B mostra os resultados de ensaios de morte em tempo real de células HEK293 humanas a pH 6,7 e pH 7,4 por células T expressando um dos CAB-CAR condicionalmente ativos contra Ror2.

[26] A Figura 7A mostra resultados de depleção celular para PBMCs transduzidos com um vetor de expressão de lentivírus expressando eTag após tratamento com cetuximab em várias concentrações, ou um controle (isótopo). A Figura 7B fornece resultados de depleção celular para PBMCs transduzidos com um vetor de expressão de lentivírus expressando eTag após tratamento com cetuximab ou um controle (isótopo) a várias razões entre células transduzidas (E) e células não transduzidas (T).

[27] As Figuras 8A-8D mostram gráficos de barras dos níveis de citocinas em meios com ou sem coincubação de diferentes células a pH 6,7 ou pH 7,4. As várias células usadas foram células T que expressam a sequência sinal GM-CSF e eTag (F1-0-01), células T que expressam um CAB-CAR Axl (F1-2-15), células T expressando um Ror2 CAB-CAR (F1-1 -15), células CHO, células CHO expressando células Axl (CHO-AXL) e CHO expressando Ror2 (CHO-ROR2). A Figura 8A mostra os níveis de IL-2 nos meios das células T F1-0-01 ou F1-2-15 sozinhas ou quando coincubadas com CHO ou CHO-Axl. A Figura 8B mostra os níveis de IFN- $\gamma$  nos meios das células T F1-0-01 ou F1-2-15 sozinhas ou quando coincubadas com CHO ou CHO-Axl. Os níveis de

citocina em meio quando as células CHO ou CHO-Axl são incubadas na ausência de células T efectoras também são mostrados como um controle nas Figuras 8A e 8B. A Figura 8C shows os níveis de IL-2 nos meios das células T F1-0-01 ou F1-1-15 sozinhas ou quando coincubadas com CHO ou CHO-Ror2. A Figura 8D mostra os níveis de IFN- $\gamma$  nos meios das células T F1-0-01 ou F1-1-15 T isoladas ou quando coincubadas com CHO ou CHO-Ror2. Os níveis de citocina no meio quando as células CHO ou CHO-Ror2 são incubadas na ausência de células T efectoras também são mostrados como um controle nas Figuras 8C e 8D.

[28] As Figuras 9A-9C mostram resultados representativos de um ensaio de morte em tempo real de células CHO-Axl por células T que expressam um dos CAB-CAR condicionalmente ativos contra o Axl aqui fornecido, com e sem tratamento com um agente farmacológico modulador de pH. Na Figura 9A, o meio estava inicialmente em pH 6,7 e os poços experimentais (linha sólida) e controle (linha tracejada) foram tratados com ou sem NaHCO<sub>3</sub>, respectivamente, no horário indicado pela seta. Na Figura 9B, o meio estava inicialmente em pH 6,7 e os poços experimentais (linha sólida) e as células controle (linha tracejada) foram tratados com ou sem NaOH, respectivamente, no horário indicado pela seta. Na Figura 9C, o meio estava inicialmente em pH 7,4 e os poços experimentais (linha sólida) e as células controle (linha tracejada) foram tratados com ou sem HCl, respectivamente.

[29] A Figura 10 é um gráfico que mostra a porcentagem de RFU da sonda ProSense FAST em camundongos com tumor de xenoenxerto-CHO antes e após a administração de PBS ou bicarbonato.

[30] A Figura 11A mostra o volume médio de tumor de tumores CHO em camundongos B-NSG administrados por via intravenosa com PBS ou células T humanas transduzidas com uma partícula lentiviral contendo um ácido nucleico que codifica F1-0-01 (eTag) ou F1-1-15, um dos CAB-CARs condicionalmente ativos contra Ror2. A Figura 11B mostra o volume tumoral médio de tumores CHO-Ror2 em camundongos B-NSG administrados intravenosamente com PBS

ou células T humanas transduzidas com uma partícula lentiviral contendo um ácido nucleico que codifica F1-0-01 ou F1-1-15.

[31] A Figura 12A mostra o volume tumoral médio de tumores CHO em camundongos B-NSG administrados por via intratumoral com PBS ou células T humanas transduzidas com uma partícula lentiviral contendo um ácido nucleico codificando F1-0-01 (eTag) ou F1-2-15 ou F1-2-22. F1-2-15 e F1-2-22 codificam dois dos CAB-CARs condicionalmente ativos contra Axl. A Figura 12B mostra o volume tumoral médio de tumores de OHC-Axl em camundongos B-NSG administrados por via intratumoral com PBS ou células T humanas transduzidas com uma partícula lentiviral contendo um ácido nucleico que codifica F1-0-01, F1-2-15 ou F1-2-22.

[32] A Figura 13A mostra o volume tumoral médio de tumores CHO em camundongos B-NSG administrados intravenosamente com PBS ou células T humanas transduzidas com uma partícula lentiviral contendo um ácido nucleico que codifica F1-0-01 (eTag) ou F1-2-15 ou F1-2-22. F1-2-15 e F1-2-22 codificam dois dos CAB-CARs condicionalmente ativos contra Axl. A Figura 13B mostra o volume tumoral médio de tumores de OHC-Axl em camundongos B-NSG administrados intravenosamente com PBS ou células T humanas transduzidas com uma partícula lentiviral contendo um ácido nucleico codificando F1-0-01, F1-2-15 ou F1-2-22.

[33] A Figura 14A mostra o volume tumoral médio de tumores CHO em camundongos B-NSG administrados intravenosamente com PBS ou células T humanas transduzidas com uma partícula lentiviral contendo um ácido nucleico que codifica F1-0-01 (eTag) ou F1-2-15 ou F1-2-22. F1-2-15 e F1-2-22 codificam dois dos CAB-CARs condicionalmente ativos contra Axl. A Figura 14B mostra o volume tumoral médio de tumores de OHC-Axl em camundongos B-NSG administrados intravenosamente com PBS ou células T humanas transduzidas com uma partícula lentiviral contendo um ácido nucleico codificando F1-0-01, F1-2-15 ou F1-2-22. Os camundongos dosados com células T nas Figuras 14A e 14B também receberam injeções subcutâneas de IL-2 (50.000 UI) no sítio

contralateral, afastado do tumor todos os dias durante os primeiros 3 dias.

### Definições

[34] Os termos “receptor de antígeno quimérico” ou “CAR” ou “CARs” como usados aqui se referem a receptores modificados, que enxertam uma especificidade de antígeno nas células, por exemplo, células T, células NK, macrófagos e células-tronco. Os CARs da invenção podem incluir pelo menos uma região de direcionamento específica do antígeno (ASTR), um domínio de dobradiça ou stalk (isto é, domínio de stalk extracelular (ESD)), um domínio transmembranar (TM), um ou mais domínios coestimuladores (CSDs) e um domínio de ativação intracelular (IAD). Em certas modalidades, o ESD e/ou o CSD são opcionais. Os CARs aqui fornecidos em algumas modalidades têm domínios especificamente recitados (por exemplo, um domínio de ativação intracelular CD3Z). Para tais domínios especialmente recitados, pretende-se que o domínio retenha uma atividade de um domínio de tipo selvagem, de modo que possa ser efetivamente empregado em um CAR (ou seja, o CAR retém a capacidade de ligar um alvo e em resposta, transmitir um sinal um domínio de ativação intracelular encontrado no CAR) e tem pelo menos 80% de identidade de sequência com uma sequência humana conhecida para esse domínio específico, sobre a porção do domínio que fornece essa atividade. Por exemplo, um domínio intracelular de CD3Z tem pelo menos 80% de identidade de sequência ao nível de aminoácido, a uma sequência de CD3Z humana conhecida, e quando encontrado em um CAR retém a capacidade de transmitir um sinal após ligação de um ASTR do CAR ao seu alvo. Em uma outra modalidade, o CAR é um CAR biespecífico, que é específico para dois antígenos ou epítomos diferentes. Depois que o ASTR se liga especificamente a um antígeno alvo, o IAD ativa a sinalização intracelular. Por exemplo, o IAD pode redirecionar a especificidade e a reatividade das células T para um alvo selecionado de uma maneira não restrita pelo MHC, explorando as propriedades de ligação ao antígeno dos anticorpos. O reconhecimento do antígeno não restrito pelo MHC fornece às células T que expressam o CAR a capacidade de

reconhecer um antígeno independente do processamento do antígeno, evitando assim um mecanismo principal de escape do tumor. Além disso, quando expressas em células T, os CARs não dimerizam vantajosamente com cadeias alfa e beta de receptor de célula T endógeno (TCR).

5           [35] O termo “condicionalmente ativo” como usado aqui em relação a um CAR ou um ASTR se refere a um CAR ou um ASTR que possui uma afinidade de ligação menor ou, em modalidades ilustrativas, uma maior afinidade de ligação a um ou mais antígenos alvo sob uma condição (ou condições) em um microambiente alvo do que sob uma condição em um ambiente fisiológico  
10 normal. Em modalidades ilustrativas, os CARs condicionalmente ativos, aqui fornecidos, são mais ativos sob uma condição em um microambiente tumoral ou em um ensaio de substituto do tumor *in vitro* em comparação com uma condição em um microambiente não tumoral ou uma condição normal. As condições no microambiente tumoral incluem menor pH, maiores concentrações de lactato e  
15 piruvato, hipóxia, menor concentração de glicose e temperatura levemente mais alta em comparação com o microambiente não tumoral. Por exemplo, um CAR condicionalmente ativo, em certas modalidades, é virtualmente inativo à temperatura normal do corpo, mas é ativo a uma temperatura mais elevada em um microambiente tumoral. Em ainda outra modalidade, um CAR  
20 condicionalmente ativo é menos ativo no sangue oxigenado normal, mas mais ativo sob um ambiente menos oxigenado que existe em um tumor. Em uma modalidade ilustrativa aqui fornecida, um CAR condicionalmente ativo é menos ativo em pH fisiológico normal 7,2-7,8, mas mais ativo sob um pH ácido 6,0-6,8 que existe em um microambiente tumoral. Existem outras condições no  
25 microambiente tumoral conhecidas por um versado na técnica que também podem ser usadas como a condição na presente invenção, em que CARs e ASTRs condicionalmente ativos têm afinidades de ligação diferentes. CARs condicionalmente ativos podem ser referidos aqui como “CARs biológicos condicionalmente ativos” ou “CAB-CARs” e “CARs biológicos restritos no  
30 microambiente” ou “MRB-CARs”.

[36] O termo “microambiente” como aqui utilizado significa qualquer porção ou região de um tecido ou corpo que tenha diferenças constantes ou temporais, físicas ou químicas de outras regiões do tecido ou regiões do corpo. Para tumores, o termo “microambiente tumoral” como usado aqui se refere ao ambiente no qual existe um tumor, que é a área não celular dentro do tumor e a área diretamente fora do tecido tumoral, mas não pertence ao compartimento intracelular da própria célula cancerosa. O tumor e o microambiente tumoral estão intimamente relacionados e interagem constantemente. Um tumor pode alterar seu microambiente e o microambiente pode afetar a forma como um tumor cresce e se espalha. Tipicamente, o microambiente tumoral tem um pH baixo na faixa de 5,8 a 7,0, mais comumente na faixa de 6,0 a 6,8, na faixa de 6,2 a 6,8. Por outro lado, um pH fisiológico normal está na faixa de 7,2 a 7,8. O microambiente tumoral também é conhecido por ter menor concentração de glicose e outros nutrientes, mas maior concentração de ácido láctico, em comparação com o plasma sanguíneo. Além disso, o microambiente tumoral pode ter uma temperatura que é de 0,3 a 1 °C maior do que a temperatura fisiológica normal. O microambiente tumoral foi discutido em Gillies et al., “MRI of the Tumor Microenvironment”, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 16, páginas 430-450, 2002, aqui incorporado por referência em sua totalidade. O termo “microambiente não tumoral” se refere a um microambiente em um sítio diferente de um tumor.

[37] Os termos “polinucleotídeo” e “ácido nucléico”, usados indistintamente neste documento, se referem a uma forma polimérica de nucleotídeos de qualquer comprimento, seja ribonucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos. Assim, esse termo inclui, entre outros, DNA ou RNA de cadeia simples, dupla ou múltipla, DNA genômico, cDNA, híbridos de DNA-RNA ou um polímero compreendendo bases de purina e pirimidina ou outras bases naturais, químicas ou bases nucleotídicas modificadas bioquimicamente, não naturais ou derivatizadas.

[38] Os termos “anticorpos” e “imunoglobulina” incluem anticorpos ou

imunoglobulinas de qualquer isotipo, assim como fragmentos de anticorpos que retêm ligação específica a um epítopo, tipicamente o mesmo epítopo que o anticorpo completo quando ambas as cadeias pesada e leve do anticorpo são presente para o ensaio, incluindo, sem limitação, Fab, Fab', Fab'-SH, (Fab')<sub>2</sub> Fv, 5 scFv, scFv divalente e fragmentos Fd, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos de cadeia única e proteínas de fusão compreendendo uma região de direcionamento específica do antígeno de um anticorpo e uma proteínas não anticorpo.

[39] "Fragmentos de anticorpos" incluem uma porção de um anticorpo 10 intacto, por exemplo, a região de ligação ao antígeno ou variável do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, e fragmentos Fv; diacorpos; anticorpos lineares (Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)); moléculas de anticorpo de cadeia simples; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos. A digestão de 15 anticorpos por papaína produz dois fragmentos idênticos de ligação ao antígeno, chamados fragmentos "Fab", cada um com um único local de ligação ao antígeno, e um fragmento residual "Fe", uma designação que reflete a capacidade de cristalizar prontamente. O tratamento com pepsina origina um fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tem dois sítios de combinação com o antígeno e tem 20 ainda a capacidade de reticular o antígeno.

[40] Os fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia única", "scFv" ou "sFv" 25 incluem os domínios de anticorpo VH e VL, em que esses domínios estão presentes EM uma única cadeia polipeptídica. Em algumas modalidades, o polipeptídeo Fv inclui ainda um ligante polipeptídico entre os domínios VH e VL, o que permite que o sFv forme a estrutura desejada para ligação ao antígeno. Para uma análise de sFv, consulte *Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, New York, páginas 269-315 (1994)*.

[41] Como usado aqui, o termo "afinidade" se refere à constante de 30 equilíbrio para a ligação reversível de dois agentes e é expresso como uma

constante de dissociação ( $K_d$ ). A afinidade pode ser pelo menos 1 vez maior, pelo menos 2 vezes maior, pelo menos 3 vezes maior, pelo menos 4 vezes maior, pelo menos 5 vezes maior, pelo menos 6 vezes maior, pelo menos 7 vezes maior, pelo menos 8 vezes maior, pelo menos 9 vezes maior, pelo menos 10 vezes

maior, pelo menos 20 vezes maior, pelo menos 30 vezes maior, pelo menos 40 vezes maior, pelo menos 50 vezes maior, pelo menos 60 vezes maior, pelo menos 70 vezes maior, pelo menos 80 vezes maior, pelo menos 90 vezes maior, pelo menos 100 vezes maior, ou pelo menos 1.000 vezes maior, ou mais, do que a afinidade de um anticorpo para sequências de aminoácidos não relacionadas.

A afinidade de um anticorpo para uma proteína alvo pode ser, por exemplo, de cerca de 100 nanomolar (nM) a cerca de 0,1 nM, de cerca de 100 nM a cerca de 1 picomolar (pM), ou de cerca de 100 nM a cerca de 1 femtomolar (fM) ou mais. Como aqui utilizado, o termo “avidez” se refere à resistência de um complexo de dois ou mais agentes à dissociação após a diluição. Os termos “imunorreativo” e “liga-se preferencialmente” são aqui usados indistintamente em relação a anticorpos e/ou fragmentos de ligação ao antígeno.

[42] O termo “ligação” se refere a uma associação direta entre duas moléculas, devido, por exemplo, a interações covalentes, eletrostáticas, hidrofóbicas e iônicas e/ou ligações de hidrogênio, incluindo interações como pontes salinas e pontes de água. A ligação não específica se refere à ligação com uma afinidade inferior a cerca de  $10^{-7}$  M, por exemplo, ligação com uma afinidade de  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M, etc.

[43] Como aqui utilizado, o termo “região de dobradiça” se refere a uma região de ligação polipeptídica flexível (também referida aqui como “dobradiça” ou “espaçador”) fornecendo flexibilidade estrutural e espaçamento a regiões de polipeptídeo flanqueadoras e pode consistir em polipeptídeos naturais ou sintéticos. Uma “região de dobradiça” derivada de uma imunoglobulina (por exemplo, IgG1) é geralmente definida como alongamento de Glu216 para Pro230 de IgG1 humana (Burton (1985) *Molec. Immunol.*, 22:161- 206). As regiões de dobradiça de outros isotipos de IgG podem ser alinhadas com a

sequência de IgG colocando os primeiros e últimos resíduos de cisteína formando ligações de dissulfureto inter cadeias pesadas (S-S) nas mesmas posições. A região de dobradiça pode ser de ocorrência natural ou ocorrência não natural, incluindo, sem limitação, uma região de dobradiça alterada, conforme descrito na Patente nº US 5.677.425. A região de dobradiça pode incluir uma região de dobradiça completa derivada de um anticorpo de uma classe ou subclasse diferente daquela do domínio de CH1. O termo “região de dobradiça” também pode incluir regiões derivadas de CD8, CD28 ou outros receptores que fornecem uma função similar no fornecimento de flexibilidade e espaçamento para regiões flanqueadoras.

[ 44 ] Um polipeptídeo “isolado” é aquele que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam com os usos diagnósticos ou terapêuticos para o polipeptídeo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em algumas modalidades, o polipeptídeo será purificado (1) até mais de 90%, superior a 95%, ou superior a 98%, em peso de anticorpo conforme determinado pelo método de Lowry, por exemplo, mais de 99% em peso, (2) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos da sequência de aminoácidos N-terminal ou interna com o uso de um sequenciador de copo giratório, ou (3) até homogeneidade por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) sob condições redutoras ou não redutoras usando azul de Coomassie ou mancha de prata. O polipeptídeo isolado inclui o polipeptídeo *in situ* nas células recombinantes, uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do polipeptídeo não estará presente. Em alguns casos, o polipeptídeo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

[ 45 ] O termo “células imunes”, como aqui usado, geralmente inclui células brancas do sangue (leucócitos) que são derivadas de células-tronco hematopoiéticas (HSC) produzidas na medula óssea. “Células imunológicas” inclui, por exemplo, linfócitos (células T (ou seja, linfócitos T), células B, células

exterminadoras naturais (NK) (CD3-CD56 +)) e células derivadas de mieloides (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, macrófagos, dendríticos). “Células T” incluem todos os tipos de células imunes que expressam CD3, incluindo células T auxiliares (células CD4<sup>+</sup>), células T citotóxicas (células CD8<sup>+</sup>), células T reguladoras (Treg) e células T gama-delta e células T NK (CD3<sup>+</sup> e CD56<sup>+</sup>). Um versado na técnica compreenderá que as células T e/ou as células NK, conforme usadas ao longo da revelação, podem incluir apenas células T, apenas células NK, ou ambas, células T e células NK. Em certas modalidades e aspectos ilustrativos aqui fornecidos, as células T são ativadas e transduzidas. Além disso, as células T são fornecidas em certas modalidades de composição ilustrativas e aspectos aqui fornecidos. Uma “célula citotóxica” inclui células T CD8<sup>+</sup>, células exterminadoras naturais (NK), células NK-T, células T  $\gamma\delta$  e neutrófilos, que são células com capacidade de mediar respostas de citotoxicidade.

[46] Como aqui usado, o termo “célula-tronco” geralmente inclui células-tronco pluripotentes ou multipotentes. “Células-tronco” inclui, por exemplo, células-tronco embrionárias (ES); células-tronco mesenquimatosas (MSC); células-tronco pluripotentes induzidas (iPS); e células progenitoras comprometidas (células-tronco hematopoiéticas (HSC); células derivadas da medula óssea, etc.).

[47] O termo “Axl”, como aqui usado, se refere a qualquer Axl nativo de qualquer fonte de vertebrado, incluindo mamíferos como primatas (por exemplo, seres humanos) e roedores (por exemplo, camundongos e ratos), salvo indicação em contrário. O termo engloba o Axl “completo”, não processado, bem como qualquer forma de Axl resultante do processamento na célula. O termo também abrange variantes de ocorrência natural de Axl, por exemplo, variantes de emenda ou variantes alélicas. A sequência de aminoácidos do Axl humano é bem conhecida na técnica e está disponível em bases de dados públicas como o GenBank.

[48] O termo “ativação de Axl”, como usado aqui, se refere à ativação, ou fosforilação, do receptor Axl. Geralmente, a ativação de Axl resulta na

transdução de sinal (por exemplo, aquela causada por um domínio quinase intracelular de um resíduo de fosforilação do receptor Axl em Axl ou um polipeptídeo de substrato). A ativação do axl pode ser mediada pela ligação do ligante Axl (Gas6) a um receptor Axl de interesse. A ligação de Gas6 a Axl pode  
5 ativar um domínio quinase de Axl e desse modo resultar na fosforilação de resíduo de tirosina no Axl e/ou na fosforilação de resíduo de tirosina em polipeptídeo (ou polipeptídeos) de substrato adicional.

[49] O termo “anti-apoptose mediada por Axl”, como aqui usado, se refere a todos os processos envolvendo Axl que previnem as células humanas, de preferência, mas não limitadas a células cancerosas humanas contra a morte  
10 celular programada (apoptose). Em particular, se refere a processos que previnem as células humanas, de preferência, mas não limitadas a células cancerosas humanas, contra a indução de apoptose através da retirada do fator de crescimento, hipóxia, exposição a agentes quimioterápicos ou radiação, ou  
15 iniciação da sinalização mediada pelo receptor Fas/Apo-1, e são estimuladas ou mediadas por atividades não catalíticas ou catalíticas de Axl, de preferência, incluindo fosforilação de Axl e/ou transdução de sinal mediada por Axl.

[50] O termo “Ror2”, como usado aqui, se refere ao receptor órfão tipo receptor de tirosina quinase, que é uma proteína prevista de 943 aminoácidos  
20 com atividade de proteína quinase *in vitro*, mostrada no número de acesso Genbank AAI30523. Muitas tirosina quinases receptoras restritas à linhagem foram inicialmente identificadas como ‘órfãs’ homólogas a receptores conhecidos, e somente posteriormente usadas para identificar seus fatores de crescimento desconhecidos. DeChiara et al. (2000) identificou um desses órfãos,  
25 codificado por Ror2.

[51] Como aqui usado, os termos “tratamento”, “tratar” e similares, se referem à obtenção de um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser profilático em termos de prevenir completa ou parcialmente uma doença ou sintoma do mesmo e/ou pode ser terapêutico em termos de uma cura  
30 parcial ou completa para uma doença e/ou efeito adverso atribuível à doença.

“Tratamento”, como aqui usado, abrange qualquer tratamento de uma doença em um mamífero, por exemplo, em um ser humano, e inclui: (a) impedir que a doença ocorra em um indivíduo que possa estar predisposto à doença, mas ainda não tenha sido diagnosticado como portador da doença; (b) inibir a doença, isto é, parar o seu desenvolvimento; e (c) aliviar a doença, isto é, causar a regressão da doença.

[52] Os termos “indivíduo”, “sujeito”, “hospedeiro” e “paciente”, aqui usados de forma intercambiável, se referem a um mamífero, incluindo, mas não limitado a seres humanos, murinos (por exemplo, ratos, camundongos), lagomorfos (por exemplo, coelhos), primatas não humanos, seres humanos, caninos, felinos, ungulados (por exemplo, equinos, bovinos, ovinos, suínos, caprinos), etc.

[53] Uma “quantidade terapeuticamente eficaz” ou “quantidade eficaz” se refere à quantidade de um agente, ou quantidades combinadas de dois agentes, que, quando administrados a um mamífero ou outro indivíduo para tratar uma doença, é suficiente para afetar tal tratamento para a doença. A “quantidade terapeuticamente eficaz” irá variar dependendo do agente (ou agentes), da doença e da sua gravidade e da idade, peso, etc., do indivíduo a ser tratado.

[54] Como usado aqui, o termo “evolução”, ou “evoluir”, se refere ao uso de um ou mais métodos de mutagênese para gerar um polinucleotídeo diferente que codifica um polipeptídeo diferente, que é o próprio uma molécula biológica melhorada e/ou contribui para a geração de outra molécula biológica melhorada.

[55] Condições “fisiológicas” ou “normais” ou “fisiológicas normais” são condições como, sem limitação, temperatura, pH, pressão osmótica, osmolalidade, estresse oxidativo e concentração de eletrólitos, bem como outros parâmetros, que seriam considerados dentro de um intervalo normal no sítio de administração, ou no tecido ou órgão no sítio de ação, para um indivíduo.

[56] Será entendido que a presente revelação e os aspectos e modalidades aqui fornecidas não estão limitadas a exemplos particulares

revelados, que podem, evidentemente, variar. Também deve ser entendido que a terminologia usada aqui é para o propósito de revelar exemplos particulares e apenas modalidades, e não pretende ser limitativa, uma vez que o âmbito da presente revelação será limitado apenas pelas reivindicações anexas.

5           [57] Quando um intervalo de valores é fornecido, entende-se que cada valor interveniente, para o décimo da unidade do limite inferior, a menos que o contexto dite claramente o contrário, entre o limite superior e inferior desse intervalo e qualquer outro valor declarado ou interveniente nesse intervalo declarado, é abrangido pela invenção. Os limites superior e inferior desses  
10 intervalos mais pequenos podem, independentemente, ser incluídos nos intervalos mais pequenos e estão também abrangidos no âmbito do invento, sujeitos a qualquer limite especificamente excluído no intervalo indicado. Onde o intervalo declarado incluir um ou ambos os limites, os intervalos excluindo qualquer um ou ambos os limites incluídos estão também incluídos na invenção.

15           [58] A menos que seja definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm os mesmos significados conforme comumente entendido por um indivíduo de habilidade comum na técnica a que essa invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes aos aqui descritos também possam ser usados na  
20 prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais preferenciais são agora descritos. Todas as publicações aqui mencionadas são aqui incorporadas por referência para revelar e descrever os métodos e/ou materiais em relação aos quais as publicações são citadas.

          [59] Deve ser notado que, como aqui usado e nas reivindicações  
25 anexas, as formas singulares “um”, “uma” e “o” incluem referentes plurais, a menos que o contexto dite claramente o contrário. Assim, por exemplo, a referência a “um receptor de antígeno quimérico” inclui uma pluralidade de tais receptores de antígeno quiméricos e seus equivalentes conhecidos pelos versados na técnica, e assim por diante. Note-se ainda que as reivindicações  
30 podem ser elaboradas para excluir qualquer elemento opcional. Como tal, esta

declaração destina-se a servir como base antecedente para o uso de tal terminologia exclusiva como “somente”, “apenas” e similares em conjunto com a recitação de elementos de reivindicação, ou uso de uma limitação “negativa”.

[60] Entende-se que certas características da invenção, que são, para maior clareza, descritas no contexto de modalidades separadas, podem também ser fornecidas em combinação em uma única modalidade. Por outro lado, várias características da invenção, que são, por brevidade, descritas no contexto de uma única modalidade, podem também ser fornecidas separadamente ou em qualquer subcombinação adequada. Todas as combinações das modalidades referentes à invenção são especificamente abrangidas pela presente invenção e são reveladas aqui como se cada uma das combinações fosse divulgada individual e explicitamente. Além disso, todas as subcombinações das várias modalidades e seus elementos são também especificamente abrangidas pela presente invenção e são aqui reveladas como se cada uma e todas as subcombinações fossem aqui reveladas individual e explicitamente.

#### Descrição detalhada

[61] Os aspectos e modalidades apresentadas na presente invenção superam o problema dos efeitos de terapias atuais fora do tumor, fornecendo, em um aspecto, um receptor de antígeno quimérico (CAR) condicionalmente ativo para a ligação de Axl e/ou Ror2. Os CARs para ligação de Axl e/ou Ror2 são ativos em um ambiente de tumor, mas não tecido/órgãos fisiológicos normais. Além de várias modalidades de CARs que se ligam a Axl e/ou Ror2, são fornecidas modalidades de ácidos nucleicos que incluem uma sequência de nucleotídeos que codifica qualquer um dos CARs aqui fornecidos, bem como construtos virais para expressarem qualquer um dos CARs, células infectadas com menos um dos construtos virais, bem como células recombinantes expressando os CARs. Um CAR da presente revelação pode ser usado em vários métodos, que são também fornecidos, juntamente com modos de infecção de células T e outras células citotóxicas com vetores de expressão, como vetores virais recombinantes, que codificam os CARs da presente revelação.

### Receptores de antígeno quimérico

[ 62 ] A presente revelação fornece um receptor de antígeno quimérico, que, por simplicidade, é referido aqui como um “CAR”. Em modalidades ilustrativas, um CAR da presente revelação liga-se a Axl ou Ror2 e, em outras modalidades ilustrativas, um CAR se liga a Axl ou Ror2 de uma maneira condicionalmente ativa. Em certas modalidades ilustrativas, um CAR aqui fornecido inclui: a) pelo menos uma região de direcionamento específica de antígeno (ASTR) condicionalmente ativa que exibe uma ligação aumentada a pH 6,7 em comparação com um pH de 7,4; b) um domínio transmembranar; e c) um domínio de ativação intracelular. Em modalidades ilustrativas, a região de direcionamento específica do antígeno do CAR é uma porção scFv condicionalmente ativa de um anticorpo anti-Axl ou anti-Ror2. Além disso, em modalidades ilustrativas, o ASTR exibe um aumento na atividade em um ambiente tumoral ou uma condição de ensaio substituto do tumor *in vitro* em comparação com um ambiente fisiológico normal.

[ 63 ] Um CAR da presente revelação pode estar presente na membrana plasmática de uma célula eucariótica, por exemplo, uma célula de mamífero, onde células de mamífero adequadas incluem, sem limitação, uma célula citotóxica, um linfócito T, uma célula-tronco, uma progênie de uma célula-tronco, uma célula progenitora, uma progênie de uma célula progenitora e uma célula NK, uma célula NK-T e um macrófago. Quando presente na membrana plasmática de uma célula eucariótica, um CAR da presente revelação é ativo na presença de Axl e/ou Ror2 que, em certas condições, se liga ao ASTR. Axl e Ror2 são um segundo membro do par de ligação específica. Axl e/ou Ror2 do par de ligação específica podem ser um fator solúvel (por exemplo, não ligado a uma célula); um fator presente na superfície de uma célula, como uma célula-alvo; um fator apresentado em uma superfície sólida; um fator presente em uma bicamada lipídica; e similar. Quando o ASTR é um anticorpo, e o segundo membro do par de ligação específica é um antígeno, o antígeno pode ser um antígeno solúvel (por exemplo, não ligado a uma célula); um antígeno presente

na superfície de uma célula, como uma célula-alvo; um antígeno apresentado em uma superfície sólida; um antígeno presente em uma bicamada lipídica; e similar.

[64] Em alguns casos, um CAR da presente revelação, quando  
5 presente na membrana plasmática de uma célula eucariótica, e quando ativado por Axl e/ou Ror2, aumenta a expressão de pelo menos um ácido nucleico na célula. Por exemplo, em alguns casos, um CAR da presente revelação, quando presente na membrana plasmática de uma célula eucariótica, e quando ativado por Axl e/ou Ror2, aumenta a expressão de pelo menos um ácido nucleico na  
10 célula em pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de vezes, pelo menos cerca de 2,5 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, ou mais de 10 vezes, em comparação com o  
15 nível de transcrição do ácido nucleico na ausência de Axl e/ou Ror2.

[65] Como um exemplo, o CAR da presente revelação pode incluir um polipeptídeo de sinalização intracelular contendo motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM); em tais casos, um CAR da presente revelação, quando presente na membrana plasmática de uma célula eucariótica, e quando  
20 ativado por Axl e/ou Ror2, aumenta a transcrição dependente do fator nuclear de células T ativadas (NFAT). Transcrição dependente de NFAT inclui transcrição induzida por qualquer membro da família NFAT, incluindo, por exemplo, NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4, NFAT5; AP-1; Spl; NKKB; e similar.

[66] Um CAR da presente revelação, quando presente na membrana  
25 plasmática de uma célula eucariótica, e quando ativado por Axl ou Ror2, pode, em alguns casos, resultar no aumento da produção de uma ou mais citocinas pela célula. Por exemplo, um CAR da presente revelação, quando presente na membrana plasmática de uma célula eucariótica, e quando ativado por Axl ou Ror2, pode aumentar a produção de uma citocina pela célula em pelo menos  
30 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%,

pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 75%, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 - dobrada, ou mais de 10 vezes, comparada com a quantidade de citocina produzida pela célula na ausência de Axl e/ou Ror2. Em algumas modalidades, um CAR da presente  
5 revelação, quando presente na membrana de uma célula eucariótica, e quando ativado por Axl e/ou Ror2, pode aumentar a secreção de uma citoquina pela célula em pelo menos 10%, pelo menos 15% pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 75%, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 5 vezes, menos 10 vezes,  
10 ou mais de 10 vezes, em comparação com a quantidade de citocina segregada pela célula na ausência de Axl e/ou Ror2. As citocinas cuja produção pode ser aumentada incluem, sem limitação, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-2, IL-15, IL-12, IL-4, IL- 5, IL-10; uma quimiocina; um fator de crescimento; e similar.

15 [67] Em alguns casos, um CAR da presente revelação, quando presente na membrana plasmática de uma célula eucariótica, e quando ativado por Axl e/ou Ror2, pode resultar em um aumento na transcrição de um ácido nucléico na célula, um aumento na produção de uma citocina e um aumento na secreção da citocina pela célula.

20 [68] Em alguns casos, um CAR da presente revelação, quando presente na membrana plasmática de uma célula eucariótica, e quando ativado por Axl e/ou Ror2, resulta em atividade citotóxica pela célula em direção a uma célula-alvo que expressa em sua superfície celular um antígeno ao qual o domínio de ligação ao antígeno do primeiro polipeptídeo do CAR se liga. Por  
25 exemplo, quando a célula eucariótica é uma célula citotóxica (por exemplo, uma célula NK ou um linfócito T citotóxico), um CAR da presente revelação, quando presente na membrana plasmática da célula, e quando ativada por Axl e/ou Ror2 aumenta a atividade citotóxica da célula em direção a uma célula-alvo que expressa na sua superfície celular Axl e/ou Ror2. Por exemplo, quando a célula  
30 eucariótica é uma célula NK ou um linfócito T, um CAR da presente revelação,

quando presente na membrana plasmática da célula, e quando ativada por Axl e/ou Ror2, aumenta a atividade citotóxica da célula por pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 2,5 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, ou mais de 10 vezes, em comparação com a atividade citotóxica da célula na ausência de Axl e/ou Ror2.

[69] Em alguns casos, um CAR da presente revelação, quando presente na membrana plasmática de uma célula eucariótica, e quando ativado por Axl e/ou Ror2, pode resultar em outros eventos relacionados à ativação de CAR, tais como proliferação e expansão (devido ao aumento divisão celular ou respostas anti-apoptóticas).

[70] Em alguns casos, um CAR da presente revelação, quando presente na membrana plasmática de uma célula eucariótica, e quando ativado por Axl e/ou Ror2, pode resultar em outros eventos relacionados à ativação de CAR, como modulação de sinalização intracelular, diferenciação celular ou morte celular.

[71] Um CAR da presente revelação pode estar presente em uma membrana celular eucariótica, em que o primeiro e segundo polipeptídeos do CAR não estão covalentemente ligados entre si. Um CAR da presente revelação pode estar presente em uma membrana celular eucariótica como um único heterodímero que não está covalentemente ligado a qualquer outro polipeptídeo na membrana. Alternativamente, um primeiro CAR da presente revelação pode estar presente em uma membrana celular eucariótica como um heterodímero que está covalente ou não covalentemente ligado a um segundo CAR da presente revelação. Em alguns casos, o primeiro e o segundo CAR estão ligados covalentemente através de uma ligação dissulfureto formada entre cisteínas presentes em uma região de dobradiça presente no primeiro polipeptídeo do primeiro CAR e no primeiro polipeptídeo do segundo CAR.

[72] Em alguns casos, um CAR da presente revelação pode estar presente em uma membrana celular eucariótica, em que os primeiros polipeptídeos do CAR incluem um fragmento de anticorpo e os segundos polipeptídeos do CAR incluem um domínio de transdução de sinal derivado de um receptor de citocina, de modo que, após a dimerização, o CAR possa representar um CAR de sinal heterodimérico, por exemplo, um anticorpo de sinal composto por pelo menos dois polipeptídeos independentes. Um “corpo de sinal”, como é conhecido na técnica, é uma macromolécula quimérica única composta por um fragmento de anticorpo e um domínio de transdução de sinal derivado de um receptor de citocina. Em certos casos, um CAR de sinal heterodimérico da presente revelação, quando presente na membrana celular de uma célula eucariótica, dimerizada por um dimerizador, e ativado por um antígeno, por exemplo, um antígeno oligomerizado, pode induzir a oligomerização do CAR de corpo de sinal heterodimérico. Tal oligomerização induzida por ligante de um CAR de corpo de sinal heterodimérico pode ativar, por exemplo, aumentar ou perpetuar, por exemplo, manter transdução de sinal, por exemplo, a oligomerização induzida por ligante de um CAR de sinal heterodimérico pode transmitir um sinal desencadeando uma resposta celular. Em alguns casos, uma pluralidade de CARs de modelo de sinal heterodimérico pode ser usada combinatoriamente para induzir uma resposta celular desejada.

#### Regiões de direcionamento específicas de antígeno

[73] Um CAR da presente revelação inclui um membro de um par de ligação específica, que é tipicamente um ASTR. Pares de ligação específica incluem, sem limitação, pares de ligação antígeno-anticorpo; pares de ligação ligante-receptor; e similares. Assim, um membro de um par de ligação específica adequado para uso em um CAR da presente revelação inclui um ASTR que é um anticorpo, um antígeno, um ligante, um domínio de ligação ao receptor de um ligante, um receptor, um domínio de ligação ao ligante de um receptor e um aficorpo.

[74] Um ASTR adequado para uso em um CAR da presente revelação

pode ser qualquer polipeptídeos de ligação de ligação ao antígeno. Em certas modalidades, o ASTR é um anticorpo como um anticorpo de comprimento total, um anticorpo de cadeia única, um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento (Fab')<sub>2</sub>, um fragmento Fv e um anticorpo de cadeia simples divalente ou um diacorpo.

[75] Em algumas modalidades, o ASTR é um Fv de cadeia simples (scFv). Em algumas modalidades, a cadeia pesada está posicionada no N-terminal da cadeia leve no CAR. Em outras modalidades, a cadeia leve está posicionada no N-terminal da cadeia pesada no CAR. Em qualquer uma das modalidades reveladas, as cadeias pesadas e leves podem ser separadas por um ligante como discutido em mais detalhes aqui. Em qualquer uma das modalidades reveladas, a cadeia pesada ou leve pode estar no N-terminal N do CAR e está tipicamente C-terminal de outro domínio, como uma sequência de sinais sinalizadora ou peptídeo.

[76] Outros domínios de reconhecimento baseados em anticorpos (cAb VHH (domínios variáveis de anticorpos de camelídeos) e versões humanizadas, IgNAR VH (domínios variáveis de anticorpos de tubarão) e versões humanizadas, sdAb VH (domínios variáveis de anticorpo de domínio único) e domínios variáveis “camelizados” são adequados para uso com os CARs e métodos usando os CARs da presente revelação. Em alguns casos, os domínios de reconhecimento baseados no receptor de células T (TCR), como TCR de cadeia simples (scTv, TCR de dois domínios de cadeia simples contendo VaVβ) também são adequados para utilização.

#### CARs biológicos condicionalmente ativos (CAB-cars)

[77] CARs da presente revelação são tipicamente condicionalmente ativos. Essa propriedade é tipicamente o resultado da natureza condicionalmente ativa do domínio ASTR do CAR. Em modalidades ilustrativas, os CAB-CARs da presente revelação têm uma maior afinidade de ligação a Axl ou Ror2 sob uma condição (ou condições) em um microambiente tumoral do que sob uma condição em um microambiente não tumoral. Em algumas

modalidades, o estado no microambiente tumoral e a condição em um microambiente não tumoral são ambos pH. Assim, os CAB-CARs podem se ligar seletivamente a Axl ou Ror2 de uma maneira condicionalmente ativa, tipicamente devido ao fato de que têm uma maior afinidade de ligação para Axl ou Ror2 em um pH de cerca de 6,0 a 6,8, um pH que é encontrado em um microambiente tumoral para um pH de 7,2 a 7,8, um pH que é encontrado em um ambiente fisiológico normal. Por exemplo, os CAB-CARs podem ter uma maior afinidade de ligação a Axl ou Ror2 a pH 6,7 do que a pH 7,4. Adicional ou alternativamente, os CAB-CARs podem ter uma maior afinidade de ligação a Axl ou Ror2 a pH 6,0 do que a pH 7,4. Tais condições podem ser testadas em um ensaio de substituição de tumor *in vitro* que, por exemplo, testa a ligação de antígeno e/ou atividade de CAR (por exemplo, lise celular) sob uma ou mais condições encontradas em um ambiente tumoral *in vivo*, como apresentado em mais detalhe abaixo, que diferem da condição (ou condições) correspondente no tecido fisiológico normal. Por exemplo, uma condição de ensaio de substituto de tumor *in vitro* pode ser um pH baixo (por exemplo, 6,0 a 6,8) em comparação com um pH fisiológico (7,2 a 7,8). Em um exemplo ilustrativo, uma condição de ensaio substituto de tumor é um pH de 6,7 enquanto que um pH fisiológico correspondente é de 7,4.

[78] Em algumas modalidades, os CAB-CARs podem ser obtidos por identificação de um VH e/ou VL de um anticorpo que foi identificado sob condições fisiológicas (isto é, anticorpo parental de tipo selvagem ou wt). Os anticorpos podem então sofrer mutação e serem testados (evoluídos). Um versado na técnica pode usar o método para identificar anticorpos condicionalmente ativos revelados no documento 8.709.755 para identificar anticorpos adicionais condicionalmente ativos e fragmentos de anticorpos que podem ser usados em ASTRs para CAB-CARs da presente revelação. A região determinante de complementaridade (CDR) é uma estrutura tridimensional que é formada pela interação entre VH e VL. Para alterar a especificidade de ligação de um ponto de partida (anticorpo "wt"), é razoável esperar que a mutação de

um ou ambos os VH/VL poderia levar a atividade de CAB em um CAB-CAR. Para gerar um anticorpo condicionalmente ativo, tanto uma VH quanto uma VL são tipicamente identificadas sob condições fisiológicas e, então, tanto uma VH quanto uma VL ou, mais tipicamente, tanto uma VH quanto uma VL são mutadas e testadas em condições não fisiológicas, como pH de 6,0 a 6,7 ou outra condição de um microambiente tumoral, para gerar um anticorpo condicionalmente ativo.

[79] O ácido nucleico que codifica regiões VH e/ou VL de anticorpos do tipo selvagem pode ser clonado com o uso de métodos conhecidos. As variantes de tais regiões VH e VL de tipo selvagem podem então ser preparadas introduzindo modificações na sequência de nucleotídeos que codifica as regiões variáveis da cadeia pesada e leve. Tais modificações incluem, por exemplo, deleções e/ou inserções e/ou substituições de resíduos nas sequências de aminoácidos do anticorpo ou fragmento de anticorpo. Qualquer combinação de deleção (ou deleções), inserção (ou inserções) e substituição (substituições) pode ser feita para chegar a um fragmento de anticorpo condicionalmente ativo.

[80] Métodos mais detalhados para fabricar e/ou isolar ASTRs condicionalmente ativos são fornecidos em uma seção separada aqui.

#### ASTRs Condicionalmente Ativos Direcionados para Axl

[81] As modalidades ilustrativas de qualquer um dos vários aspectos aqui fornecidos incluem um CAR com um ASTR condicionalmente ativo que se liga especificamente a uma proteína Axl a um pH de 6,7 em comparação com um pH de 7,4. Exemplos de tais ASTRs e CARs contendo tais ASTRs são fornecidos nos Exemplos do presente documento. Em certas modalidades, o ASTR liga-se ao mesmo epítipo de Axl como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de SEQ ID NO: 79 e a cadeia leve de SEQ ID NO: 80. Em modalidades ilustrativas, o ASTR liga-se ao mesmo epítipo de Axl como um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples compreendendo uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 79 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 80.

[82] O ASTR pode ser um anticorpo de cadeia única, um fragmento Fab,

um fragmento Fab', um fragmento (Fab')<sub>2</sub>, um fragmento Fv, um anticorpo de cadeia única divalente ou um diacopo. Em modalidades ilustrativas, o ASTR condicionalmente ativo que se liga a Axl é um fragmento variável de cadeia simples compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve.

5 [83] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Axl e, em modalidades ilustrativas, liga-se ao mesmo epítipo de Axl como um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples compreendendo uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 79 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 80, a região variável da cadeia pesada pode incluir três regiões determinantes de  
10 complementaridade, tendo as referidas regiões as sequências H1, H2 e H3, em que:

[84] a sequência H1 é X<sub>1</sub>GX<sub>2</sub>TMN (SEQ ID NO: 87);

[85] a sequência H2 é LIKPSNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 88); e

[86] a sequência H3 é GX<sub>3</sub>YX<sub>4</sub>SYX<sub>5</sub>AMDY (SEQ ID NO:89), em que X<sub>1</sub>  
15 é T ou W; X<sub>2</sub> é H ou A, X<sub>3</sub> é H ou D; X<sub>4</sub> é E ou H; e X<sub>5</sub> é E ou F.

[87] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Axl e, em modalidades ilustrativas, liga-se ao mesmo epipo de Axl como um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples compreendendo uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 79 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 80,  
20 incluindo as modalidades da cadeia pesada imediatamente acima, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia leve que inclui três regiões determinantes de complementaridade, tendo as referidas regiões as sequências L1, L2 e L3, em que:

[88] a sequência L1 é KASQDVX<sub>6</sub>SAVA (SEQ ID NO:90);

25 [89] a sequência L2 é WX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>TRX<sub>9</sub>T (SEQ ID NO:91); e

[90] a sequência L3 é QEHFSX<sub>10</sub>PLX<sub>11</sub> (SEQ ID NO:92),

[91] em que X<sub>6</sub> é S ou V; X<sub>7</sub> é A ou Q; X<sub>8</sub> é S ou D; X<sub>9</sub> é H ou D; X<sub>10</sub> é T ou P; e X<sub>11</sub> é T ou R.

[92] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Axl e, em  
30 modalidades ilustrativas, liga-se ao mesmo epítipo de Axl como um fragmento

de anticorpo variável de cadeia simples compreendendo uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 79 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 80, a região variável da cadeia pesada pode incluir três regiões determinantes de complementaridade, tendo as referidas regiões as sequências H1, H2 e H3, em que:

[93] a sequência H1 é  $X_1GX_2X_3MX_4$  (SEQ ID NO:134);

[94] a sequência H2 é  $LIKX_5SNGGTX_6YNQKFKG$  (SEQ ID NO:135); e

[95] a sequência H3 é  $GX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}DYX_{15}X_{16}$  (SEQ ID NO:136),

[96] em que  $X_1$  é T, A, ou W;  $X_2$  é H ou A;  $X_3$  é T ou I;  $X_4$  é N ou I;  $X_5$  é P ou N;  $X_6$  é S, I, ou T;  $X_7$  é H, D, E, P, R, ou W;  $X_8$  é Y ou N;  $X_9$  é E, A, D, F, G, H, I, L, M, N, R, V, ou Y;  $X_{10}$  é S, D, M, N, ou Q;  $X_{11}$  é Y, C, E, ou P;  $X_{12}$  é F, E, N, S, T, ou V;  $X_{13}$  é A, D, G, L, ou Y;  $X_{14}$  é M, E, ou F;  $X_{15}$  é W, A, D, H, L, N, P, R, ou T; e  $X_{16}$  é G ou H.

[97] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Axl e, em modalidades ilustrativas, liga-se ao mesmo epítipo de Axl como um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples compreendendo uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 79 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 80, incluindo as modalidades da cadeia pesada imediatamente acima, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia leve que inclui três regiões determinantes de complementaridade, tendo as referidas regiões as sequências L1, L2 e L3, em que:

[98] a sequência L1 é  $KASQDX_{17}X_{18}SX_{19}VX_{20}$  (SEQ ID NO:137);

[99] a sequência L2 é  $X_{21}X_{22}X_{23}TRX_{24}T$  (SEQ ID NO:138); e

[100] a sequência L3 é  $QEX_{25}X_{26}SX_{27}X_{28}X_{29}X_{30}$  (SEQ ID NO:139),

[101] em que  $X_{17}$  é V, D, G, N, ou W;  $X_{18}$  é S ou V;  $X_{19}$  é A, L, ou M;  $X_{20}$  é A, D, N, ou Q;  $X_{21}$  é W ou F;  $X_{22}$  é A, I, N, P, ou Q;  $X_{23}$  é S ou D;  $X_{24}$  é H ou D;  $X_{25}$  é H, C, F, I, L, Q, S, T, V, ou Y;  $X_{26}$  é F, C, D, E, G, N, ou S;  $X_{27}$  é T, C, ou P;  $X_{28}$  é P, A, C, D, E, H, K, S, T, V, ou W;  $X_{29}$  é L, G, ou R; e  $X_{30}$  é T, I, ou R.

[102] Em certas modalidades ilustrativas, o ASTR inclui a região variável da cadeia leve da SEQ ID NO: 80 e/ou a região variável da cadeia pesada da SEQ ID NO: 79. Essas modalidades ilustrativas podem incluir o N-terminal da cadeia pesada para a cadeia leve ou o N-terminal da cadeia leve para a cadeia pesada. Em uma modalidade ilustrativa, um ASTR anti-Axl pode incluir a sequência de qualquer uma de SEQ ID N°: 128, SEQ ID N°: 129, SEQ ID N°: 159, SEQ ID N°: 160, ou SEQ ID N°: 161.

[103] As cadeias pesadas e leves de qualquer dessas modalidades anti-Axl que incluem duas regiões variáveis, as regiões variáveis são tipicamente separadas por um ligante. O ligante pode ter entre 6 e 100 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligante é o ligante 1 (SEQ ID NO: 53), o ligante 2 (SEQ ID NO: 54) ou o ligante 3 (SEQ ID NO: 55). Em modalidades ilustrativas, as duas regiões variáveis são uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve. Tanto a cadeia pesada quanto a cadeia leve podem estar localizadas no N-terminal em relação à outra no ASTR. Em certas modalidades ilustrativas, a cadeia pesada é N-terminal para a cadeia leve.

[104] Exemplos de CARs condicionalmente ativos (CAB-CARs) que têm ligação aumentada a Axl a pH 6,7 em comparação com pH 7,4 são encontrados no Exemplo 1 aqui. Em modalidades ilustrativas, o CAR ou ASTR podem ligar-se ao mesmo epítipo de Axl como um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples compreendendo uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 79 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 80. Em modalidades adicionais de tais modalidades ilustrativas, o CAR ou ASTR anti-Axl compreende ou é um fragmento variável de cadeia simples (scFv). Em exemplos ilustrativos adicionais, o scFv anti-Axl compreende quer uma cadeia pesada que é N-terminal para uma cadeia leve ou uma cadeia leve que é N-terminal para uma cadeia pesada. Em qualquer uma das modalidades aqui incluídas, que inclui uma CAR e em modalidades ilustrativas liga-se ao mesmo epítipo de Axl como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de

SEQ ID NO: 79 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 80, O ASTR pode incluir qualquer uma das SEQ ID NO: 128, 129, 159, 160 ou 161. Além disso, os CARs anti-Axl de qualquer das modalidades aqui descritas podem incluir qualquer um dos componentes CAR aqui fornecidos. Em certas modalidades exemplificativas, os CARs anti-Axl podem incluir os componentes CAR listados na Tabela 1 e podem ser qualquer um dos CARs na Tabela 1. Mais tipicamente para quaisquer modalidades aqui incluídas que incluem um CAR anti-Axl, o CAR é um CAB-CAR e, em modalidades ilustrativas não limitativas, pode incluir, por exemplo, qualquer um dos componentes CAB-CAR e CAB-CARs fornecidos na Tabela 1 que demonstrou atividade citotóxica. Por exemplo, o CAB-CAR anti-Axl pode incluir um peptídeo de sinalização CD8, um domínio stalk/transmembranar CD8 ou CD28, um CD137, ICA, ou um domínio coestimulador IC4 e um domínio coestimulador CD137 e/ou um domínio de ativação CD3Z. Além disso, os CAR ilustrativos para qualquer uma das modalidades aqui incluídas que incluem um CAR anti-Axl e especialmente um CAB-CAR anti-Axl, em modalidades ilustrativas não limitativas incluem qualquer CAB-CARs anti-Axl que demonstrou atividade citotóxica condicional na Tabela 1. Tais CAB-CARs ilustrativos incluem F1-2-1, F1-2-2, F1-2-3, F1-2-6, F1-2-8, F1-2-10, F1-2-13, F1-2-14, F1-2-15, F1-2-22, ou F1-2-23 da Tabela 1. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um ASTR, o ASTR pode incluir o ASTR de F1-2-1, F1-2-2, F1-2-3, F1-2-6, F1-2-8, F1-2-10, F1-2-13, F1-2-14, F1-2-15 F1-2-22 ou F1-2-23. Além disso, os CAR ilustrativos para qualquer uma das modalidades da presente invenção que incluem um CAR anti-Axl e especialmente um CAB-CAR anti-Axl, em modalidades ilustrativas não limitativas incluem qualquer CAB-CARs anti-Axl que demonstrou alta atividade citotóxica condicional na Tabela 1. Tais CAB-CARs ilustrativos incluem F1-2-13, F1-2-15, F1-2-22 ou F1-2-23. Consequentemente, em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um ASTR, o ASTR pode incluir o ASTR de F1-2-1, F1-2-2, F1-2-3, F1-2-6, F1-2-8, F1-2-10, F1-2-13, F1-2-14, F1-2-15, F1-2-22 ou F1-2-23.

[105] Os polipeptídeos da região variável de cadeia pesada e os

polipeptídeos da região variável de cadeia leve aqui revelados foram identificados a partir de uma região variável de cadeia pesada do anticorpo parental (SEQ ID NO: 93) e uma região variável de cadeia leve do anticorpo parental (SEQ ID NO: 94) com o uso de um método revelado na patente nº US 8.709.755. Um versado na técnica pode utilizar o método para identificar anticorpos condicionalmente ativos revelados no documento 8.709.755 para identificar anticorpos adicionais condicionalmente ativos e fragmentos de anticorpos que podem ser utilizados em ASTRs para CAB-CARs da presente revelação.

[106] Em algumas modalidades, as regiões variáveis da cadeia pesada podem ser SEQ ID NO: 112-114. Em algumas modalidades, as regiões variáveis de cadeia leve podem ser SEQ ID NO: 108-111. Essas regiões variáveis da cadeia pesada e leve podem ligar-se especificamente ao Axl. Verificou-se que os anticorpos que compreendem qualquer uma dessas regiões variáveis de cadeia pesada e leve têm uma maior afinidade de ligação a Axl a um pH 6,7 do que a um pH 7,4. Um pH 6,7 é um pH encontrado no microambiente tumoral. Um pH 7,4 é um pH encontrado em microambiente fisiológico normal não tumoral.

[107] O CAR pode também incluir variantes das regiões variáveis de cadeia pesada e leve das sequências de SEQ ID NO: 108-114 que podem ligar-se especificamente a Axl. Para derivar essas variantes, determinou-se que as regiões determinantes de complementaridade (CDR) das regiões variáveis da cadeia pesada (H1-H3) e as CDRs das regiões variáveis da cadeia leve (L1-L3) devem permanecer intactas. As variantes dessas regiões variáveis da cadeia pesada e leve podem ser preparadas através da introdução de modificações apropriadas na sequência nucleotídica que codifica as regiões variáveis da cadeia pesada e leve, ou por síntese peptídica. Tais modificações incluem, por exemplo, deleções e/ou inserções e/ou substituições de resíduos nas sequências de aminoácidos do anticorpo ou fragmento de anticorpo. Qualquer combinação de deleção (ou deleções), inserção (ou inserções) e substituição (ou substituições) pode ser realizada para chegar ao construto final, desde que o

construto final tenha pelo menos uma das características desejadas, por exemplo, ligação ao antígeno.

#### ASTRs Condicionalmente Ativos Direcionados para Ror2

[108] As modalidades ilustrativas de qualquer um dos vários  
 5 aspectos aqui fornecidos incluem um CAR com um ASTR condicionalmente ativo  
 que se liga especificamente a uma proteína Ror2 a um pH de 6,7 em comparação  
 com um pH de 7,4. Exemplos de tais ASTRs e CARs contendo tais ASTRs, são  
 fornecidos nos Exemplos aqui. Em certas modalidades, o ASTR liga-se ao  
 mesmo epítipo de Ror2 como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de SEQ  
 10 ID NO: 82 ou SEQ ID NO: 83 ou o ASTR se liga ao mesmo epítipo de Ror2  
 como um anticorpo que inclui a cadeia pesado de SEQ ID NO: 151. Em  
 modalidades ilustrativas, o ASTR liga-se ao mesmo epítipo de Ror2 como um  
 fragmento de anticorpo variável de cadeia simples que compreende uma cadeia  
 pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 82 ou SEQ ID NO: 83 ou o ASTR se liga ao  
 15 mesmo epítipo de Ror2 como um fragmento de anticorpo variável de cadeia  
 simples que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 151.  
 Em modalidades ilustrativas, o ASTR liga-se ao mesmo epítipo de Ror2 como  
 um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples que inclui a cadeia pesada  
 de anticorpo de SEQ ID NO: 82 ou SEQ ID NO: 83 e uma cadeia leve de  
 20 anticorpo de SEQ ID NO: 84 ou o ASTR liga-se ao mesmo epítipo de Ror2 como  
 um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples que inclui a cadeia pesada  
 do anticorpo da SEQ ID NO: 151 e a cadeia leve do anticorpo da SEQ ID NO:  
 152.

[109] O ASTR pode ser um anticorpo de cadeia única, um  
 25 fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento (Fab')<sub>2</sub>, um fragmento Fv, um  
 anticorpo de cadeia única divalente ou um diacopo. Em modalidades ilustrativas,  
 o ASTR condicionalmente ativo que se liga a Ror2 é um fragmento variável de  
 cadeia simples que compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve.

[110] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Ror2, o  
 30 ASTR pode incluir uma região variável de cadeia pesada com três regiões

determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências H1, H2 e H3, em que:

[111] a sequência H1 é GYTX<sub>1</sub>TEX<sub>2</sub>TX<sub>3</sub>H (SEQ ID NO:95) ou X<sub>4</sub>GYSITTGYWWN (SEQ ID NO:96);

5 [112] a sequência H2 é GX<sub>5</sub>NX<sub>6</sub>NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:97) ou YITYDGSKNYNPSLKN (SEQ ID NO:98); e

[113] a sequência H3 é GSLYSYGNSYFDY (SEQ ID NO:99) ou FEGVWX<sub>7</sub>GLDY (SEQ ID NO:100),

[114] em que X<sub>1</sub> é F ou E; X<sub>2</sub> é Y ou D; X<sub>3</sub> é M ou D; X<sub>4</sub> é T ou S; X<sub>5</sub> é E ou I; X<sub>6</sub> é T ou D; e X<sub>7</sub> é Y ou G.

[115] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Ror2, e em modalidades ilustrativas liga-se ao mesmo epítipo de Ror2 que um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 151 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 152, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia pesada com três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências H1, H2 e H3, em que:

[116] a sequência H1 é GYTX<sub>1</sub>TEX<sub>2</sub>TX<sub>3</sub>H (SEQ ID NO:95);

[117] a sequência H2 é GX<sub>5</sub>NX<sub>6</sub>NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:97); e

[118] a sequência H3 é GSLYSYGNSYFDY (SEQ ID NO:99),

[119] em que X<sub>1</sub> é F ou E; X<sub>2</sub> é Y ou D; X<sub>3</sub> é M ou D; X<sub>5</sub> é E ou I; e X<sub>6</sub> é T ou D.

[120] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Ror2 e em modalidades ilustrativas liga-se ao mesmo epítipo de Ror2 que um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 82 ou SEQ ID NO: 83 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 84, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia pesada com três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm as sequências H1, H2 e H3, em que:

[121] a sequência H1 é X<sub>4</sub>GYSITTGYWYWN (SEQ ID NO:96);  
 [122] a sequência H2 é YITYDGSKNYNPSLKN (SEQ ID NO:98);

e

[123] a sequência H3 é FEGVWX<sub>7</sub>GLDY (SEQ ID NO:100),

5 [124] em que X<sub>4</sub> é T ou S; e X<sub>7</sub> é Y ou G.

[125] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Ror2, incluindo, sem limitação, os que têm uma cadeia pesada com as sequências H1, H2 e H3 acima, o ASTR inclui uma região variável de cadeia leve que inclui três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm as  
 10 sequências L1, L2 e L3, em que:

[126] a sequência L1 é SATSSX<sub>8</sub>SYMH (SEQ ID NO:101) ou RASESVDRYGNSFIH (SEQ ID NO:102);

[127] a sequência L2 é X<sub>9</sub>TSNLAS (SEQ ID NO:103) ou RTYNLES (SEQ ID NO:104); e

15 [128] a sequência L3 é QQRSSYPFT (SEQ ID NO:105) ou QQTNEPWT (SEQ ID NO:106),

[129] em que X<sub>8</sub> é E ou V; e X<sub>9</sub> é G ou H.

[130] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Ror2, e em modalidades ilustrativas liga-se ao mesmo epítipo de Ror2 que um anticorpo  
 20 que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 151 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 152, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia leve com três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm as sequências L1, L2 e L3, em que:

[131] a sequência L1 é SATSSX<sub>8</sub>SYMH (SEQ ID NO:101);

25 [132] a sequência L2 é X<sub>9</sub>TSNLAS (SEQ ID NO:103); e

[133] a sequência L3 é QQRSSYPFT (SEQ ID NO:105),

[134] em que X<sub>8</sub> é E ou V; e X<sub>9</sub> é G ou H.

[135] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Ror2 e em modalidades ilustrativas liga-se ao mesmo epítipo de Ror2 que um anticorpo  
 30 que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 82 ou SEQ ID NO: 83 e

a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 84, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia leve com três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências L1, L2 e L3, em que:

[136] a sequência L1 é RASESVDRYGNSFIH (SEQ ID NO:102);

5 [137] a sequência L2 é RTYNLES (SEQ ID NO:104); e

[138] a sequência L3 é QQTNEPDWT (SEQ ID NO:106).

[139] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Ror2, o

ASTR pode incluir uma região variável de cadeia pesada que inclui três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm as

10 sequências H1, H2 e H3, em que:

[140] a sequência H1 é GYTX<sub>1</sub>TEX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>H (SEQ ID NO:140) ou GYSITTGX<sub>29</sub>YWN (SEQ ID NO:141);

[141] a sequência H2 é X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:142) ou YITYDGSX<sub>30</sub>NYNPSLKN (SEQ ID NO:143); e

15 [142] a sequência H3 é X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>SX<sub>12</sub>YX<sub>13</sub>YX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>SYFX<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub> (SEQ ID NO:144) ou CSX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>VX<sub>35</sub>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>LDX<sub>38</sub> (SEQ ID NO:145),

[143] em que X<sub>1</sub> é F ou E; X<sub>2</sub> é Y ou D; X<sub>3</sub> é T ou C; X<sub>4</sub> é M, D, E, ou Y; X<sub>5</sub> é G ou S; X<sub>6</sub> é I ou E; X<sub>7</sub> é N, C, L, ou V; X<sub>8</sub> é T, D ou E; X<sub>9</sub> é A, M, ou T; X<sub>10</sub> é R ou H; X<sub>11</sub> é G ou E; X<sub>12</sub> é L ou F; X<sub>13</sub> é S ou G; X<sub>14</sub> é G ou D; X<sub>15</sub> é N ou E; X<sub>16</sub> é D ou L; X<sub>17</sub> é Y, C, ou T; X<sub>18</sub> é W ou L; X<sub>29</sub> é Y, E, R, ou T; X<sub>30</sub> é K ou N; X<sub>31</sub> é R, G, H, W, ou Y; X<sub>32</sub> é F, C, N, ou Q; X<sub>33</sub> é E ou S; X<sub>34</sub> é G, E, F, H, M, Q, ou S; X<sub>35</sub> é W, A, I, P, Q, T, ou V; X<sub>36</sub> é Y, G, N, ou Q; X<sub>37</sub> é G, S, ou T; e X<sub>38</sub> é Y ou I.

[144] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Ror2, e  
25 em modalidades ilustrativas liga-se ao mesmo epítipo de Ror2 que um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 151 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 152, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia pesada incluindo três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm as sequências H1, H2 e H3, em que:

30 [145] a sequência H1 é GYTX<sub>1</sub>TEX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>H (SEQ ID NO:140);

[146] a sequência H2 é X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:142); e

[147] a sequência H3 é X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>SX<sub>12</sub>YX<sub>13</sub>YX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>SYFX<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub> (SEQ ID NO:144),

5 [148] em que X<sub>1</sub> é F ou E; X<sub>2</sub> é Y ou D; X<sub>3</sub> é T ou C; X<sub>4</sub> é M, D, E, ou Y; X<sub>5</sub> é G ou S; X<sub>6</sub> é I ou E; X<sub>7</sub> é N, C, L, ou V; X<sub>8</sub> é T, D ou E; X<sub>9</sub> é A, M, ou T; X<sub>10</sub> é R ou H; X<sub>11</sub> é G ou E; X<sub>12</sub> é L ou F; X<sub>13</sub> é S ou G; X<sub>14</sub> é G ou D; X<sub>15</sub> é N ou E; X<sub>16</sub> é D ou L; X<sub>17</sub> é Y, C, ou T; e X<sub>18</sub> é W ou L.

[149] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Ror2 e  
10 em modalidades ilustrativas liga-se ao mesmo epítipo de Ror2 que um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 82 ou SEQ ID NO: 83 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 84, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia pesada incluindo três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm as sequências H1, H2 e H3,  
15 em que:

[150] a sequência H1 é GYSITTGX<sub>29</sub>YWN (SEQ ID NO:141);

[151] a sequência H2 é YITYDGSX<sub>30</sub>NYNPSLKN (SEQ ID NO:143); e

[152] a sequência H3 é CSX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>VX<sub>35</sub>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>LDX<sub>38</sub> (SEQ ID  
20 NO:145),

[153] em que X<sub>29</sub> é Y, E, R, ou T; X<sub>30</sub> é K ou N; X<sub>31</sub> é R, G, H, W, ou Y; X<sub>32</sub> é F, C, N, ou Q; X<sub>33</sub> é E ou S; X<sub>34</sub> é G, E, F, H, M, Q, ou S; X<sub>35</sub> é W, A, I, P, Q, T, ou V; X<sub>36</sub> é Y, G, N, ou Q; X<sub>37</sub> é G, S, ou T; e X<sub>38</sub> é Y ou I.

[154] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Ror2, o  
25 ASTR pode incluir uma região variável de cadeia leve que inclui três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências L1, L2 e L3, em que:

[155] a sequência L1 é SATSSX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>MX<sub>22</sub> (SEQ ID NO:146) ou RASESVDRYGNSX<sub>39</sub>IH (SEQ ID NO:147);

30 [156] a sequência L2 é X<sub>23</sub>TSNLAS (SEQ ID NO:148) ou

X<sub>40</sub>TYX<sub>41</sub>LES (SEQ ID NO:149); e

[157] a sequência L3 é QX<sub>24</sub>X<sub>25</sub>SX<sub>26</sub>YPFX<sub>27</sub>X<sub>28</sub> (SEQ ID NO:150)  
ou QQX<sub>42</sub>NX<sub>43</sub>DPX<sub>44</sub>TX<sub>45</sub> (SEQ ID NO:85),

[158] em que X<sub>19</sub> é V ou E; X<sub>20</sub> é S ou D; X<sub>21</sub> é Y, C, ou D; X<sub>22</sub> é  
5 H, G, ou L; X<sub>23</sub> é G, C, H, ou P; X<sub>24</sub> é Q ou E; X<sub>25</sub> é R ou H; X<sub>26</sub> é S, D, G, I, Q,  
ou V; X<sub>27</sub> é T ou D; X<sub>28</sub> é F, D, ou E; X<sub>39</sub> é F, S, ou T; X<sub>40</sub> é R, C, D, E, ou W; X<sub>41</sub>  
é N ou D; X<sub>42</sub> é T, I, ou P; X<sub>43</sub> é E ou V; X<sub>44</sub> é W ou T; e X<sub>45</sub> é F ou T.

[159] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Ror2, e  
em modalidades ilustrativas liga-se ao mesmo epítipo de Ror2 que um anticorpo  
10 que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 151 e a cadeia leve de  
anticorpo de SEQ ID NO: 152, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia  
leve que inclui três regiões determinantes de complementaridade, em que as  
ditas regiões têm as sequências L1, L2 e L3, em que:

[160] a sequência L1 é SATSSX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>MX<sub>22</sub> (SEQ ID NO:146);  
15 [161] a sequência L2 é X<sub>23</sub>TSNLAS (SEQ ID NO:148); e  
[162] a sequência L3 é QX<sub>24</sub>X<sub>25</sub>SX<sub>26</sub>YPFX<sub>27</sub>X<sub>28</sub> (SEQ ID NO:150),  
[163] em que X<sub>19</sub> é V ou E; X<sub>20</sub> é S ou D; X<sub>21</sub> é Y, C, ou D; X<sub>22</sub> é  
H, G, ou L; X<sub>23</sub> é G, C, H, ou P; X<sub>24</sub> é Q ou E; X<sub>25</sub> é R ou H; X<sub>26</sub> é S, D, G, I, Q,  
ou V; X<sub>27</sub> é T ou D; e X<sub>28</sub> é F, D, ou E.

[164] Em algumas modalidades em que o ASTR se liga a Ror2 e  
em modalidades ilustrativas liga-se ao mesmo epítipo de Ror2 que um anticorpo  
que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 82 ou SEQ ID NO: 83 e  
a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 84, o ASTR pode incluir uma região  
variável da cadeia leve que inclui três regiões determinantes de  
25 complementaridade, em que as ditas regiões têm as sequências L1, L2 e L3, em  
que:

[165] a sequência L1 é RASESVDRYGNSX<sub>39</sub>IH (SEQ ID NO:147);  
[166] a sequência L2 é X<sub>40</sub>TYX<sub>41</sub>LES (SEQ ID NO:149); e  
[167] a sequência L3 é QQX<sub>42</sub>NX<sub>43</sub>DPX<sub>44</sub>TX<sub>45</sub> (SEQ ID NO:85),  
30 [168] em que X<sub>39</sub> é F, S, ou T; X<sub>40</sub> é R, C, D, E, ou W; X<sub>41</sub> é N ou

D; X<sub>42</sub> é T, I, ou P; X<sub>43</sub> é E ou V; X<sub>44</sub> é W ou T; e X<sub>45</sub> é F ou T.

[169] Em algumas modalidades, o ASTR condicionalmente ativo que se liga a Ror2 e, em modalidades ilustrativas, o ASTR condicionalmente ativo que se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 152, inclui uma região variável de cadeia pesada que tem uma sequência de aminoácidos selecionada das sequências de SEQ ID NO: 115-119 e SEQ ID NO: 151. Nessas modalidades ilustrativas em que o ASTR condicionalmente ativo se liga ao mesmo epítopo de Ror2 que um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 152, que inclui opcionalmente as cadeias pesadas listadas na sentença anterior, a cadeia leve pode incluir a cadeia leve de SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 122-124, ou SEQ ID NO: 152.

[170] Em certas modalidades ilustrativas, o ASTR condicionalmente ativo liga-se ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 82 ou SEQ ID NO: 83 e um anticorpo que compreende uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 84 e inclui uma região variável de cadeia pesada de anticorpo de qualquer uma das SEQ ID NO: 120-121 e 82-83. Nessa modalidade ilustrativa em que o ASTR condicionalmente ativo se liga ao mesmo epítopo de Ror2 que um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 82 ou SEQ ID NO: 83 e um anticorpo que compreende uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 84, opcionalmente incluindo as cadeias pesadas listadas na frase anterior, a cadeia leve pode incluir a cadeia leve de SEQ ID NO: 84 ou 86.

[171] Exemplos de CARs condicionalmente ativos (CAB-CARs) que têm ligação aumentada a Ror2 a pH 6,7 em comparação com pH 7,4 são encontrados no Exemplo 1 aqui. Em modalidades ilustrativas, o CAR ou ASTR podem ligar-se ao mesmo epítopo de Ror2 como um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 82 ou SEQ ID NO: 83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID

NO: 84 ou o CAR ou ASTR podem ligar-se ao mesmo epítopo de Ror2 como um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 152. Em modalidades adicionais de tais modalidades ilustrativas, o CAR anti-Ror2 ou ASTR compreende ou um fragmento variável de cadeia simples (scFv) e em exemplos ilustrativos adicionais, compreende uma cadeia leve que está N-terminal em relação a uma cadeia pesada, ou compreende uma cadeia pesada que está N-terminal em relação a uma cadeia leve. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR ou ASTR, e em modalidades ilustrativas liga-se ao mesmo epítopo de Ror2 como um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 82 ou SEQ ID NO: 83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 84 ou se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 152, O ASTR pode incluir qualquer uma das SEQ ID NO: 130-132 ou 153-158. Além disso, CARs anti-Ror2 de qualquer uma das modalidades aqui descritas podem incluir qualquer um dos componentes CAR aqui fornecidos. Em certas modalidades exemplificativas, os CARs anti-Ror2 podem incluir os componentes do CAR listados na Tabela 2 e podem ser qualquer um dos CARs na Tabela 2. Mais tipicamente para quaisquer modalidades aqui incluídas que incluem um CAR anti-Ror2, o CAR é um CAB-CAR e, em modalidades ilustrativas não limitativas, pode incluir, por exemplo, qualquer um dos componentes CAB-CAR e CAB-CARs fornecidos na Tabela 2 que demonstrou atividade citotóxica. Por exemplo, o CAB-CAR anti-Ror2 pode incluir um peptídeo de sinalização CD8, um domínio de stalk/transmembrana CD8 ou CD28, um domínio coestimulador CD137 e/ou um domínio de ativação CD3Z. Além disso, os CARs ilustrativos para qualquer uma das modalidades aqui, que incluem uma CAR anti-Ror2 e especialmente uma CAB-CAR anti-Ror2, em modalidades ilustrativas não limitativas incluem qualquer CAB-CARs anti-Ror2 que demonstrou atividade citotóxica condicional

na Tabela. 2 Tais CAB-CARs ilustrativos incluem F1-1-9, F1-1-10, F1-1-11, F1-1-12, F1-1-15, F1-1-17, F1-1-18, F1-1-19, F1-1-20, F1-1-21, F1-1-23, F1-1-25 ou F1-1-26. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um ASTR anti-Ror2, o ASTR pode incluir o ASTR de F1-1-9, F1-1-10, F1-1-11, F1-1-12, F1-1-15, F1-1-17, F1-1-18, F1-1-19, F1-1-20, F1-1-21, F1-1-23, F1-1-25 ou F1-1-26 da Tabela 2. Além disso, os CARs ilustrativos para qualquer uma das modalidades aqui que incluem um CAR anti-Ror2 e especialmente um CAB-CAR anti-Ror2, em modalidades ilustrativas não limitativas incluem qualquer CAB-CARs anti-Ror2 que demonstrou alta atividade citotóxica condicional na Tabela 2. Tais CAB-CARs ilustrativos incluem F1-1-11, F1-1-12, F1-1-15, F1-1-17, F1-1-19, F1-1-20 ou F1-1-23. Consequentemente, em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um ASTR anti-Ror2, o ASTR pode incluir o ASTR de F1-1-11, F1-1-12, F1-1-15, F1-1-17, F1-1-19, F1-1-20, F1-1-23.

[172] De modo mais geral, em relação a qualquer uma das modalidades aqui fornecidas, quer dirigidas a Axl ou Ror2, o ASTR pode ser um anticorpo de cadeia única, um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento (Fab')<sub>2</sub>, um fragmento Fv, um anticorpo divalente de cadeia única ou um diacorpo. Em modalidades ilustrativas, o ASTR condicionalmente ativo que se liga a Ror2 é um fragmento variável de cadeia simples que compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve.

[173] Os polipeptídeos de região variável de cadeia pesada e os polipeptídeos de região variável de cadeia leve revelados aqui foram identificados de um anticorpo parental através do método revelado na Patente nº US 8.709.755. Um versado na técnica pode utilizar o método para identificar anticorpos condicionalmente ativos revelados no documento 8.709.755 para identificar anticorpos adicionais condicionalmente ativos e fragmentos de anticorpos que podem ser utilizados em ASTRs para CAB-CARs da presente revelação.

[174] As sequências de aminoácidos das regiões variáveis da cadeia pesada de alguns exemplos de ASTRs são mostradas nas SEQ ID NO:

115-121. As sequências de aminoácidos das regiões variáveis da cadeia leve desses ASTR exemplificadores são mostradas nas SEQ ID NO: 81, 86 e 122-124. Essas regiões variáveis de cadeia pesada e regiões variáveis de cadeia leve podem ligar-se especificamente a Ror2 humano. Constatou-se que os anticorpos ou fragmentos de anticorpo incluindo qualquer uma dessas regiões variáveis de cadeia pesada e regiões variáveis de cadeia leve têm maior afinidade de ligação a Ror2 a um pH no microambiente tumoral do que a um pH em um microambiente não tumoral ou em condições fisiológicas. Por exemplo, os anticorpos e fragmentos de anticorpo têm uma maior afinidade de ligação a Ror2 a pH 6,0 do que a pH 7,4. Em algumas modalidades, os anticorpos e fragmentos de anticorpo têm uma maior afinidade de ligação a Ror2 a pH 6,7 do que a pH 7,4.

[175] Os anticorpos anti-Ror2 ou fragmentos de anticorpo têm uma maior afinidade de ligação a Ror2 em um tumor em comparação com a sua afinidade de ligação a Ror2 em um tecido normal. Crê-se que esses anticorpos anti-Ror2 ou fragmentos de anticorpo têm uma semivida mais longa e efeitos secundários reduzidos, bem como eficácia comparável, em comparação com anticorpos monoclonais anti-Ror2 conhecidos na técnica. Esses recursos permitem o uso de uma dosagem mais elevada desses anticorpos anti-Ror2 ou fragmentos de anticorpo a serem administrados a um paciente, sendo assim uma opção terapêutica mais eficaz.

[176] Embora o ASTR possa incluir as regiões variáveis de cadeia pesada e região variável de cadeia leve com sequência de aminoácidos com SEQ ID NO: 81, 86 e 115-124, a presente invenção também fornece variantes dessas que podem se ligar especificamente a Ror2 humana. Para derivar essas variantes, as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) das regiões variáveis de cadeia pesada (H1-H3) e as regiões determinantes de complementaridade das regiões variáveis de cadeia leve (L1-L3) devem permanecer intactas. No entanto, a sequência de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada e das regiões variáveis de cadeia leve fora das

regiões determinantes de complementaridade pode sofrer mutações de acordo com os princípios de substituição, inserção e eliminação. As variantes das regiões variáveis de cadeia pesada e região variável de cadeia leve podem ser preparadas através da introdução de modificações apropriadas na sequência de nucleotídeos que codifica as regiões variáveis de cadeia pesada e região variável de cadeia leve, ou por síntese peptídica. Tais modificações incluem, por exemplo, deleções de, e/ou inserções em e/ou substituições de resíduos nas sequências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada e região variável de cadeia pesada. Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição pode ser realizada para chegar ao ASTR para os CARs, desde que tenham as características desejadas, por exemplo, ligação condicional de antígeno ao Ror2 humano.

#### ASTRs Multiespecíficos

[177] Em algumas modalidades, o ASTR pode ser multiespecífico, por exemplo, anticorpos biespecíficos. Anticorpos multiespecíficos têm especificidades de ligação para pelo menos dois sítios ou alvos diferentes. Em certas modalidades, uma das especificidades de ligação é para Axl ou Ror2 e a outra é para outro antígeno. Em certas modalidades, os anticorpos biespecíficos podem ligar-se a dois epítomos diferentes de Axl ou Ror2. Anticorpos biespecíficos podem também ser usados para localizar agentes citotóxicos para células que expressam Axl ou Ror2. Anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpo. Em certas modalidades, uma das especificidades de ligação liga-se a Axl e a outra liga-se a Ror2, em que nenhuma delas, nem ambas, podem ser condicionalmente ativas.

[178] Um ASTR adequado para uso em um CAR da presente revelação pode ter uma variedade de especificidades de ligação ao antígeno. Em modalidades ilustrativas, o ASTR liga-se a Axl ou Ror2, que são conhecidos por serem expressos em certas células cancerosas (isto é, antígenos específicos de câncer). Em alguns casos, o ASTR é biespecífico, e além de um domínio de

ligação ao antígeno que se liga a Axl ou Ror2, tipicamente de uma maneira condicionalmente ativa, o ASTR pode incluir um segundo domínio de ligação ao antígeno que é específico para um segundo antígeno que é expressa por (sintetizada por) uma célula cancerosa, isto é, um antígeno associado a células cancerosas. O antígeno associado a células cancerosas pode ser um antígeno associado a, por exemplo, uma célula de câncer da mama, um linfoma de células B, uma célula de linfoma de Hodgkin, uma célula de câncer do ovário, uma célula de câncer da próstata, um mesotelioma, uma célula de câncer do pulmões (por exemplo, célula de câncer de pulmão de pequenas células), uma célula de linfoma de células B não Hodgkin (B-NHL), uma célula de câncer de ovário, uma célula de câncer de próstata, uma célula de mesotelioma, uma célula de câncer de pulmão, uma célula de melanoma, uma célula de leucemia linfocítica crônica, uma célula leucêmica linfocítica aguda, uma célula de neuroblastoma, um glioma, um glioblastoma, um meduloblastoma, uma célula cancerígena colorretal, etc. Um antígeno associado a células cancerosas pode também ser expresso por uma célula não cancerosa.

[179] Exemplos não limitativos de antígenos aos quais um ASTR biespecífico de um CAR se pode ligar além de Axl ou Ror2 incluem, por exemplo, CD19, CD20, CD38, CD30, ERBB2, CA125, MUC-1, antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), molécula de adesão superficial CD44, mesotelina, antígeno carcinoembrionário (CEA), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), EGFRvIII, receptor do fator de crescimento endotelial vascular-2 (VEGFR2), antígeno associado ao melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), MAGE -A1, IL-13R-a2, GD2 e similares.

[180] Em alguns casos, um membro de um par de ligação específica adequado para uso em um ASTR biespecífico de tópico de um CAR, além de um membro do par de ligação específica que se liga a Axl ou Ror2, liga-se a um ligante para um receptor. Os ligantes incluem, sem limitação, citocinas (por exemplo, IL-13, etc.); fatores de crescimento (por exemplo, heregulina; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); e similares); um peptídeo de ligação

à integrina (por exemplo, um peptídeo que compreende a sequência Arg-Gly-Asp); e similares.

[181] Quando o membro de um par de ligação específica em um CAR biespecífico de tópico é um ligante, o CAR pode ser ativado na presença de um segundo membro do par de ligação específica, em que o segundo membro do par de ligação específica um receptor para o ligante. Por exemplo, quando o ligando é VEGF, o segundo membro do par de ligação específica pode ser um receptor de VEGF, incluindo um receptor de VEGF solúvel.

[182] Como referido acima, em alguns casos, o membro de um par de ligação específica que está incluído em um CAR biespecífico de tópico é um ASTR que é um receptor, por exemplo, um receptor para um ligante, um correceptor, etc. O receptor pode ser um fragmento de ligação ao ligante de um receptor. Os receptores adequados incluem, sem limitação, um receptor do fator de crescimento (por exemplo, um receptor de VEGF); um polipeptídeo K, membro 1 (NKG2D) da subfamília do receptor do tipo lectina similar a uma célula assassina (receptor para MICA, MICB e ULB6); um receptor de citocina (por exemplo, um receptor de IL-13; um receptor de IL-2; etc.); CD27; um receptor de citotoxicidade natural (NCR) (por exemplo, polipeptídeo NKP30 (NCR3 / CD337) (receptor para transcrito associado a HLA-B 3 (BAT3) e B7-H6), etc.); etc.

#### Região de Stalk

[183] Em alguns casos, o CAR inclui um domínio de dobradiça (também referido aqui como um “espaçador” ou um “stalk”) que está localizado na porção CAR fora da célula e interposto entre o ASTR e o domínio transmembrana. Em modalidades ilustrativas, o domínio de dobradiça é um domínio de stalk CD8 ou um domínio de stalk CD28. Em alguns casos, o domínio de stalk tem pelo menos 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% de identidade com uma região de stalk CD8 do tipo selvagem (TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA (SEQ ID NO: 125)), tem pelo menos 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, ou 100% de identidade com uma região de stalk CD28 do tipo selvagem

(FCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP (SEQ ID NO: 126)) ou tem pelo menos 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% de identidade com uma região de dobradiça/stalk da cadeia pesada de imunoglobulina de tipo selvagem. Em alguns casos, o domínio de stalk é um polipeptídeo da região de dobradiça derivado de um receptor (por exemplo, uma região de dobradiça derivada de CDS). Em um CAR, o stalk empregado permite que a região de direcionamento específica de antígeno condicionalmente ativa, e tipicamente o CAR inteiro, retenha sua ligação aumentada à propriedade de Ror2 ou Axl, em uma condição de ensaio substituto de tumor *in vitro* em relação a uma condição fisiológica correspondente.

[184] A região de stalk pode ter um comprimento de cerca de 4 aminoácidos a cerca de 50 aminoácidos, por exemplo, de cerca de 4 aa a cerca de 10 aa, de cerca de 10 aa a cerca de 15 aa, de cerca de 15 aa a cerca de 20 aa, de cerca de 20 aa a cerca de 25 aa, de cerca de 25 aa a cerca de 30 aa, de cerca de 30 aa a cerca de 40 aa, ou de cerca de 40 aa a cerca de 50 aa.

[185] Em alguns casos, a região de dobradiça de um indivíduo CAR inclui pelo menos uma cisteína. Por exemplo, em alguns casos, a região de dobradiça pode incluir a sequência Cys-Pro-Pro-Cys (SEQ ID NO: 62). Se presente, uma cisteína na região de dobradiça de um primeiro CAR pode estar disponível para formar uma ligação dissulfureto com uma região de dobradiça em um segundo CAR.

[186] As sequências de aminoácidos da região de dobradiça/stalk da imunoglobulina são conhecidas na técnica; consulte, por exemplo, Tan et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:162; e Huck et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:1779. Como exemplos não limitativos, uma região de dobradiça de imunoglobulina pode incluir um domínio com pelo menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% de identidade de sequência com um trecho de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos de qualquer uma das seguintes sequências de aminoácidos: DKTHT (SEQ ID NO:63); CPPC (SEQ ID NO:62); CPEPKSCDTPPPCPR (SEQ ID NO:64) (consulte, por exemplo, Glaser et al.

(2005) *J. Biol. Chem.* 280:41494); ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:65); KSCDKTHTCP (SEQ ID NO:66); KCCVDCP (SEQ ID NO:67); KYGPPCP (SEQ ID NO:68); EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:69) (dobradiça de IgG1 humana); ERKCCVECP (SEQ ID NO:70) (dobradiça de IgG2 humana); ELKTPLGDTTHTCPRCP (SEQ ID NO:71) (dobradiça de IgG3 humana); SPNMVPHAHHAQ (SEQ ID NO:72) (dobradiça de IgG4 humana); e similares. A região de dobradiça pode incluir uma sequência de aminoácidos de uma região de articulação de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana. A região de dobradiça pode incluir uma ou mais substituições e/ou inserções e/ou deleções de aminoácidos em comparação com uma região de dobradiça de tipo selvagem (de ocorrência natural). Por exemplo, His229 da dobradiça de IgG humana 1 pode ser substituída por Tyr, de modo que a região de dobradiça inclua a sequência EPKSCDKTYTCPPCP; consulte, por exemplo, Yan et al. (2012) *J. Biol. Chem.* 287:5891. A região de dobradiça pode incluir uma sequência de aminoácidos derivada de CD8 humano; por exemplo, a região de dobradiça pode incluir a sequência de aminoácidos: TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:73), ou uma variante da mesma.

#### Domínio transmembranar

[187] O CAR da presente revelação inclui domínios transmembranares para inserção em uma membrana celular eucariótica. O domínio transmembrana pode ser interposto entre o ASTR e o domínio coestimulador. O domínio transmembranar pode ser interposto entre a região de dobradiça e o domínio coestimulador, de modo que o receptor do antígeno quimérico inclua, por ordem do terminal amino (N-terminal), ao terminal carboxila (C-terminal): um ASTR; uma região de dobradiça; um domínio transmembranar; e um domínio de ativação.

[188] Qualquer domínio transmembranar (TM) que forneça a inserção de um polipeptídeo na membrana celular de uma célula eucariótica (por exemplo, mamífero) é adequado para uso em aspectos e modalidades aqui

descritas. Em certas modalidades aqui fornecidas, o domínio da TM para qualquer aspecto aqui fornecido que inclui uma CAR, é um domínio C\* alfa TM, um domínio CD8 TM, um domínio CD4 TM, um domínio C3Z TM, um domínio C28 TM, um C134 TM domínio, um domínio CD7 TM, um domínio CD8 TM ou um domínio CD28 TM. As modalidades ilustrativas de CARs aqui fornecidas incluem um domínio CD8 TM ou um domínio CD28 TM. Outros exemplos não limitativos de domínios TM adequados para qualquer dos aspectos ou modalidades aqui fornecidas, incluem um domínio com pelo menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% de identidade de sequência para um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos de qualquer um dos seguintes domínios de TM:

[189] a) CD8 alfa (IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:46));

[190] b) CD8 beta (LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC (SEQ ID NO:47));

[191] c) CD4 (ALIVLGGVAGLLFFIGLGIFFCVRC (SEQ ID NO:48));

[192] d) CD3Z (LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV (SEQ ID NO:49);

[193] e) CD28 (FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWW (SEQ ID NO:50));

[194] f) CD134 (OX40): (VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL (SEQ ID NO:51));

[195] g) CD7 (ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA (SEQ ID NO:52)),

[196] h) CD8 alfa stalk e TM (TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:75)), e

[197] i) CD28 stalk e TM (IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWW (SEQ ID NO:76)).

[198] Como exemplos não limitativos, um domínio transmembranar de um aspecto da invenção pode ter pelo menos 80, 90 ou 95% de identidade de sequência com o domínio transmembranar de SEQ ID NO: 46, o domínio transmembranar de CD8 beta, o domínio transmembranar de CD4, o domínio transmembranar CD3 zeta, o domínio transmembranar CD28, o domínio transmembranar CD134 ou o domínio transmembranar CD7.

#### Ligantes de CAR

[199] Em alguns casos, o CAR inclui um ligante entre dois domínios adjacentes. Por exemplo, um ligante pode estar entre o domínio transmembranar e o primeiro domínio coestimulador. Como outro exemplo, o ASTR pode ser um anticorpo e um ligante pode estar entre a cadeia pesada e a cadeia leve. Como outro exemplo, um ligante pode estar entre o ASTR e o domínio transmembranar e um domínio coestimulador. Como outro exemplo, um ligante pode estar entre o domínio coestimulador e o domínio de ativação intracelular do segundo polipeptídeo.

[200] O peptídeo ligante pode ter qualquer uma de uma variedade de sequências de aminoácidos. As proteínas podem ser unidas por um peptídeo espaçador, geralmente de natureza flexível, embora outras ligações químicas não sejam excluídas. Um ligante pode ser um peptídeo com entre cerca de 1 e cerca de 100 aminoácidos de comprimento, ou entre cerca de 1 e cerca de 25 aminoácidos de comprimento. Esses ligantes podem ser produzidos com o uso de oligonucleotídeos codificadores de ligação sintéticos para acoplar as proteínas. Ligantes peptídicos com um grau de flexibilidade podem ser usados. Os peptídeos de ligação podem ter praticamente qualquer sequência de aminoácidos, tendo em conta que os ligantes adequados terão uma sequência que resulta em um peptídeo geralmente flexível. O uso de pequenos aminoácidos, como glicina e alanina, é útil na criação de um peptídeo flexível. A criação de tais sequências é rotineira para os versados na técnica.

[201] Ligantes adequados podem ser facilmente selecionados e podem ser de qualquer um de diferentes comprimentos adequados, como desde

1 aminoácido (por exemplo, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluindo 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, 6 aminoácidos a 8 aminoácidos, ou 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, e podem ser 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 aminoácidos.

5           [202]           Ligantes flexíveis exemplificadores incluem polímeros de glicina (G)<sub>n</sub>, polímeros de glicina-serina (incluindo, por exemplo, (GS)<sub>n</sub>, GSGGS<sub>n</sub>, GGGS<sub>n</sub> e GGGGS<sub>n</sub>, em que n é um número inteiro de pelo menos um), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina e outros ligantes flexíveis conhecidos na técnica. Polímeros de glicina e glicina-serina são de interesse,  
10 uma vez que ambos os aminoácidos são relativamente não estruturados e, portanto, podem servir como uma ligação neutra entre os componentes. Polímeros de glicina são de particular interesse, uma vez que a glicina acessa significativamente mais espaço phi-psi do que a alanina, e é muito menos restrita do que os resíduos com cadeias laterais mais longas (por exemplo, Scheraga,  
15 *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). Ligantes flexíveis exemplificadores incluem, sem limitação, GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:53), GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:54), GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55), GGSG (SEQ ID NO:56), GGSGG (SEQ ID NO:57), GSGSG (SEQ ID NO:58), GSGGG (SEQ ID NO:59), GGGSG  
20 (SEQ ID NO:60), GSSSG (SEQ ID NO:61), e similares. O versado na técnica reconhece que a concepção de um peptídeo conjugado com quaisquer elementos descritos acima pode incluir ligantes que sejam total ou parcialmente flexíveis, de modo que o ligante possa incluir um ligante flexível bem como uma ou mais porções que conferem estrutura menos flexível.

## 25           Domínios moduladores

          [203]           Os domínios moduladores podem alterar o efeito do domínio de ativação no CAR, incluindo o aumento ou o amortecimento dos efeitos a jusante do domínio de ativação ou a alteração da natureza da resposta. Os domínios moduladores adequados para uso em um CAR da presente revelação,  
30 e incluídos em certas modalidades ilustrativas de qualquer aspecto aqui que

incluem um CAR, incluem domínios coestimuladores. Em algumas modalidades, um CAR pode ter mais de um domínio modulatório (por exemplo, domínio coestimulador) ou um domínio modulatório (por exemplo, domínio coestimulador) de um CAR pode ser derivado de mais do que um polipeptídeo.

- 5 Um domínio modulatório (por exemplo, domínio coestimulador) adequado para inclusão no CAR pode ter um comprimento de cerca de 30 aminoácidos a cerca de 70 aminoácidos (aa), por exemplo, um domínio modulatório (por exemplo, domínio coestimulador) pode ter um comprimento de cerca de 30 aa a cerca de 35 aa, de cerca de 35 aa a cerca de 40 aa, de cerca de 40 aa a cerca de 45 aa, 10 de cerca de 45 aa a cerca de 50 aa, de cerca de 50 aa a cerca de 55 aa a cerca de 60 aa, de cerca de 60 aa a cerca de 65 aa, ou de cerca de 65 aa a cerca de 70 aa. Em outros casos, o domínio modulatório pode ter um comprimento de cerca de 70 aa a cerca de 100 aa, de cerca de 100 aa a cerca de 200 aa, ou superior a 200 aa.

- 15 [204] Os domínios coestimuladores tipicamente aumentam e/ou alteram a natureza da resposta para ativação de um domínio de ativação. Os domínios coestimuladores adequados para uso em um CAR da presente revelação são geralmente polipeptídeos derivados de receptores. Em algumas modalidades, domínios coestimuladores homodimerizam. Um domínio 20 coestimulador do indivíduo pode ser uma porção intracelular de uma proteína transmembranar (isto é, o domínio coestimulador pode ser derivado de uma proteína transmembranar). Exemplos não limitativos de polipeptídeos coestimuladores adequados incluem, sem limitação, 4-1BB (CD137), B7-H3, CD2, CD7, CD27, CD28, CD28 deletado para a ligação a Lck (ICL), ICOS, OX40, 25 BTLA, CD27, CD30, CD40, GITR, HVEM, LFA-1, LIGHT, NKG2C, PD-1, TILR2, TILR4, TILR7, TILR9, cadeia gama do receptor Fc, cadeia  $\epsilon$  do receptor Fc ou um ligante que se liga especificamente a CD83. Por exemplo, um domínio coestimulador de um aspecto da invenção pode ter pelo menos 80%, 90% ou 95% de identidade de sequência com o domínio coestimulador de 4-1BB 30 (CD137), CD27, CD28, CD28 deletado para Ligação de Lck (ICL), ICOS, OX40,

BTLA, CD27, CD30, GITR ou HVEM. Em algumas modalidades, um CAR pode incluir mais do que um domínio coestimulador, por exemplo, um CAR pode incluir um domínio coestimulador de ICA e um domínio coestimulador de 4-1BB (CD137),

5           [205]       Em alguns casos, o domínio coestimulador é derivado de uma porção intracelular da proteína transmembrana CD137 (também conhecida como TNFRSF9; CD137; 4-1BB; CDw137; ILA; etc.). Por exemplo, um domínio coestimulador adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos da seguinte sequência de aminoácidos: KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:1).

15           [206]       Em algumas dessas modalidades, o domínio coestimulador tem um comprimento de cerca de 30 aa a cerca de 35 aa, de cerca de 35 aa a cerca de 40 aa, de cerca de 40 aa a cerca de 45 aa, de cerca de 45 aa a cerca de 50 aa de cerca de 50 aa a cerca de 55 aa, de cerca de 55 aa a cerca de 60 aa, de cerca de 60 aa a cerca de 65 aa, ou de cerca de 65 aa a cerca de 70 aa.

20           [207]       Em alguns casos, o domínio coestimulador é derivado de uma porção intracelular da proteína transmembrana CD28 (também conhecida como Tp44). Por exemplo, um domínio coestimulador adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos da seguinte sequência de aminoácidos: RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:2). Em algumas dessas modalidades, o domínio coestimulador tem um comprimento de cerca de 30 aa a cerca de 35 aa, de cerca de 35 aa a cerca de 40 aa, de cerca de 40 aa a cerca de 45 aa, de cerca de 45 aa a cerca de 50 aa de cerca de 50 aa a cerca de 55 aa, de cerca de 55 aa a cerca de 60 aa, de cerca de 60 aa a cerca de 65 aa, ou de cerca de 65 aa a cerca de 70 aa.

30           [208]       Em alguns casos, o domínio coestimulador é derivado de

uma porção intracelular da proteína transmembrana CD28 deletada para ligação Lck (ICA). Por exemplo, um domínio coestimulador adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos da seguinte sequência de aminoácidos: RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHQAYAAARDFAAYRS (SEQ ID NO:3). Em algumas dessas modalidades, o domínio coestimulador tem um comprimento de cerca de 30 aa a cerca de 35 aa, de cerca de 35 aa a cerca de 40 aa, de cerca de 40 aa a cerca de 45 aa, de cerca de 45 aa a cerca de 50 aa de cerca de 50 aa a cerca de 55 aa, de cerca de 55 aa a cerca de 60 aa, de cerca de 60 aa a cerca de 65 aa, ou de cerca de 65 aa a cerca de 70 aa.

[209] Em alguns casos, o domínio coestimulador é derivado de uma porção intracelular da proteína transmembrana ICOS (também conhecida como AILIM, CD278 e CVID1). Por exemplo, um domínio coestimulador adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos da seguinte sequência de aminoácidos: TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO:4). Em algumas dessas modalidades, o domínio coestimulador tem um comprimento de cerca de 30 aa a cerca de 35 aa, de cerca de 35 aa a cerca de 40 aa, de cerca de 40 aa a cerca de 45 aa, de cerca de 45 aa a cerca de 50 aa de cerca de 50 aa a cerca de 55 aa, de cerca de 55 aa a cerca de 60 aa, de cerca de 60 aa a cerca de 65 aa, ou de cerca de 65 aa a cerca de 70 aa.

[210] Em alguns casos, o domínio coestimulador é derivado de uma porção intracelular da proteína transmembrana OX40 (também conhecida como TNFRSF4, RP5-902P8.3, ACT35, CD134, OX-40, TXGPIL). Por exemplo, um domínio coestimulador adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou

todos os aminoácidos da seguinte sequência de aminoácidos:  
RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO:5).

[211] Em algumas dessas modalidades, o domínio coestimulador tem um comprimento de cerca de 30 aa a cerca de 35 aa, de cerca de 35 aa a cerca de 40 aa, de cerca de 40 aa a cerca de 45 aa, de cerca de 45 aa a cerca de 50 aa de cerca de 50 aa a cerca de 55 aa, de cerca de 55 aa a cerca de 60 aa, de cerca de 60 aa a cerca de 65 aa, ou de cerca de 65 aa a cerca de 70 aa.

[212] Em alguns casos, o domínio coestimulador é derivado de uma porção intracelular da proteína transmembrana CD27 (também conhecida como S 152, T 14, TNFRSF 7 e Tp55). Por exemplo, um domínio coestimulador adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos da seguinte sequência de aminoácidos:

HQRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP  
(SEQ ID NO:6).

[213] Em algumas dessas modalidades, o domínio coestimulador tem um comprimento de cerca de 30 aa a cerca de 35 aa, de cerca de 35 aa a cerca de 40 aa, de cerca de 40 aa a cerca de 45 aa, ou de cerca de 45 aa a cerca de 50 aa.

[214] Em alguns casos, o domínio coestimulador é derivado de uma porção intracelular da proteína transmembrana BTLA (também conhecida como BTLA1 e CD272). Por exemplo, um domínio coestimulador adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos da seguinte sequência de aminoácidos:

CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDN  
DPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSGVIGPNSRLARNVKEAPTE  
YASICVRS (SEQ ID NO:7).

[215] Em alguns casos, o domínio coestimulador é derivado de uma porção intracelular da proteína transmembrana CD30 (também conhecida como TNFRSF8, DIS166E e Ki-1). Por exemplo, um domínio coestimulador adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % ou 100% de identidade de sequência a um trecho de cerca de 100 aminoácidos a cerca de 110 aminoácidos (aa), de cerca de 110 aa a cerca de 115 aa, de cerca de 115 aa a cerca de 120 aa, de cerca de 120 aa a cerca de 130 aa de cerca de 130 aa a cerca de 140 aa, de cerca de 140 aa a cerca de 150 aa, de cerca de 150 aa a cerca de 160 aa, ou de cerca de 160 aa a cerca de 185 aa da seguinte sequência de aminoácidos:

RRACRKIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPPRSSTQLRSGASVTEPVAEE  
RGLMSQPLMETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNN  
KIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETE  
PPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK (SEQ ID NO:8).

[216] Em alguns casos, o domínio coestimulador é derivado de uma porção intracelular da proteína transmembrana GITR (também conhecida como TNFRSF18, RP5-902P8.2, AITR, CD357 e GITR-D). Por exemplo, um domínio coestimulador adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos da seguinte sequência de aminoácidos:

HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGD  
LWW (SEQ ID NO:9). Em algumas dessas modalidades, o domínio coestimulador tem um comprimento de cerca de 30 aa a cerca de 35 aa, de cerca de 35 aa a cerca de 40 aa, de cerca de 40 aa a cerca de 45 aa, de cerca de 45 aa a cerca de 50 aa de cerca de 50 aa a cerca de 55 aa, de cerca de 55 aa a cerca de 60 aa, de cerca de 60 aa a cerca de 65 aa, ou de cerca de 65 aa a cerca de 70 aa.

[217] Em alguns casos, o domínio coestimulador derivou de uma porção intracelular da proteína transmembranar HVEM (também conhecida como TNFRSF14, RP3-395M20.6, ATAR, CD270, HVEA, HVEM, LIGHTR e

TR2). Por exemplo, um domínio coestimulador adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos da seguinte sequência de aminoácidos:

CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFT GRSPNH (SEQ ID NO:10). Em algumas dessas modalidades, o domínio coestimulador do primeiro e do segundo polipeptídeo tem um comprimento de cerca de 30 aa a cerca de 35 aa, de cerca de 35 aa a cerca de 40 aa, de cerca de 40 aa a cerca de 45 aa, de cerca de 45 aa a cerca de 50 aa, de cerca de 50 aa a cerca de 55 aa, de cerca de 55 aa a cerca de 60 aa, de cerca de 60 aa a cerca de 65 aa, ou de cerca de 65 aa a cerca de 70 aa.

#### Domínio de ativação intracelular

[218] Domínios de ativação intracelular adequados para uso em um CAR da presente revelação quando ativados, tipicamente induzem a produção de uma ou mais citocinas; morte celular aumentada; e/ou proliferação aumentada de células T CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup>, células T natural killer, células T  $\gamma\delta$  e/ou neutrófilos. Em algumas modalidades, o domínio de ativação intracelular inclui pelo menos um (por exemplo, um, dois, três, quatro, cinco, seis, etc.) motivos ITAM como descrito abaixo. Os domínios de ativação intracelular podem ser aqui referidos como domínios ativadores ou domínios de ativação. Os domínios de ativação intracelular para uso em um polipeptídeo de sinalização manipulado podem incluir domínios de sinalização intracelular de vários tipos de receptores de sinalização imune, incluindo proteínas de sinalização de células T, tais como receptores de superfamília coestimuladores da família CD3, B7 e receptor do Fator de Necrose Tumoral (TNFR); domínios de sinalização utilizados por células NK e NKT como NKp30 (B7-H6), DAP12, NKG2D, NKp44, NKp46, DAP10 e CD3z; e os domínios de sinalização de receptores de imunoglobulina humana que contêm motivos de ativação baseados em tirosina imunorreceptor (ITAM), como Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIC,

FcγRIIIA e FcRL5. Como tal, em certas modalidades de CARs para qualquer um dos aspectos da presente revelação, o domínio de ativação intracelular um domínio de sinalização de NKp30 (B7-H6), DAP12, NKG2D, NKp44, NKp46, DAP10, CD3z, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA ou FcRL5. Estes são aqui referidos como um domínio de ativação NKp30 (B7-H6), um domínio de ativação DAP12, um domínio de ativação NKG2D, um domínio de ativação NKp44, um domínio de ativação NKp46, um domínio de ativação DAP10, um domínio de ativação CD3z, um domínio de ativação FcγRI, um domínio de ativação FcγRIIA, um domínio de ativação FcγRIIC, um domínio de ativação FcγRIIIA ou um domínio de ativação de FcRL5, respectivamente.

[219] Em algumas modalidades, o domínio de ativação intracelular inclui cadeias de sinalização do tipo DAP10/CD28. Em algumas modalidades, o domínio de ativação intracelular não é covalentemente ligado à CAR ligado à membrana, mas é difundido no citoplasma. Como exemplos não limitativos, um domínio de ativação intracelular de qualquer aspecto da invenção que inclui um CAR pode ser um domínio de ativação de CD3Z, um domínio de ativação de CD3D, um domínio de ativação de CD3E, um domínio de ativação de CD3G, um domínio de ativação de CD79A, um domínio de ativação de DAP12, um domínio de ativação de FCERIG, um domínio de ativação de DAP10/CD28 ou um domínio de ativação de ZAP70. Como exemplos não limitativos, um domínio de ativação intracelular de qualquer aspecto da invenção que inclui um CAR pode ter pelo menos 80%, 90% ou 95% de identidade de sequência com CD3Z, CD3D, CD3E, CD3G, CD79A, DAP12, FCERIG, DAP10/CD28 ou ZAP70 como descrito abaixo.

### ITAMs

[220] Os domínios de ativação intracelular adequados para uso em um CAR da presente revelação não incluem polipeptídeos de sinalização intracelular contendo motivos de ativação baseados em tirosina imunorreceptora (ITAM). Um motivo ITAM é YX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>L/I, em que X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub> são independentemente qualquer aminoácido. Em alguns casos, o domínio de ativação intracelular de um

CAR de tópico inclui 1, 2, 3, 4 ou 5 motivos ITAM. Em alguns casos, um motivo ITAM é repetido duas vezes [em um domínio de ativação intracelular, em que a primeira e a segunda instâncias do motivo ITAM são separadas uma da outra por 6 a 8 aminoácidos, por exemplo, (YX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>L/I) (X<sub>3</sub>)<sub>n</sub> (YX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>L/I), em que n é um

5 número inteiro de 6 a 8 e cada um dos 6 a 8 X<sub>3</sub> pode ser qualquer aminoácido. Em alguns casos, o domínio de ativação intracelular de um CAR de tópico inclui 3 motivos ITAM.

[221] Um domínio de ativação intracelular adequado pode ser uma porção contendo um motivo ITAM que é derivada de um polipeptídeo que contém

10 um motivo ITAM. Por exemplo, um domínio de ativação intracelular adequado pode ser um domínio contendo um motivo ITAM de qualquer proteína contendo um motivo ITAM. Assim, um domínio de ativação intracelular adequado não precisa conter toda a sequência de toda a proteína da qual é derivada. Exemplos de polipeptídeos contendo motivos ITAM adequados incluem, mas não se

15 limitam a: CD3Z (CD3 zeta); CD3D (CD3 delta); CD3E (CD3 epsilon); CD3G (CD3 gama); CD79A (cadeia alfa de proteína associada a complexo de receptor de antígeno); DAP12; e FCERIG (cadeia gama de receptor I epsilon de Fc).

[222] Em alguns casos, o domínio de ativação intracelular é derivado da cadeia beta da glicoproteína CD3 da superfície das células T

20 (também conhecida como CD3Z, cadeia zeta do receptor de células T T3, CD247, CD3-ZETA, CD3H, CD3Q, T3Z, TCRZ, etc.). Por exemplo, um domínio de ativação intracelular adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com uma alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou

25 todos os aminoácidos nas seguintes sequências ou em um alongamento contínuo de cerca de 100 aminoácidos a cerca de 110 aminoácidos (aa), de cerca de 110 aa para cerca de 115 aa, de cerca de 115 aa a cerca de 120 aa, de cerca de 120 aa a cerca de 130 aa, de cerca de 130 aa a cerca de 140 aa, de cerca de 140 aa a cerca de 150 aa, ou de cerca de 150 aa a cerca de 160 aa de

30 qualquer uma das seguintes sequências de aminoácidos (2 isoformas):

MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFS  
 RSADAPAYQQGQNQL[YNELNLGRREEYDVL]DKRRGRDPEMGGKPRRKNP  
 QEGL[YNELQKDKMAEAYSEI]GMKGERRRGKGHDGL[YQGLSTATKDTYDAL]  
 HMQALPPR (SEQ ID NO:11) ou

5 MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFS  
 RSADAPAYQQGQNQL[YNELNLGRREEYDVL]DKRRGRDPEMGGKPRRKN  
 PQEGL[YNELQKDKMAEAYSEI]GMKGERRRGKGHDGL[YQGLSTATKDTYDA  
 L]HMQALPPR (SEQ ID NO:12), em que os motivos ITAM são apontados com  
 colchetes.

10 [223] Do mesmo modo, um polipeptídeo de domínio de ativação  
 intracelular adequado pode incluir um motivo ITAM contendo uma porção da  
 sequência completa de aminoácidos CD3 zeta. Assim, um domínio de ativação  
 intracelular adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%,  
 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de  
 15 sequência com uma extensão de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos  
 nas sequências seguintes ou numa extensão contígua de cerca de 100  
 aminoácidos a cerca de 110 aminoácidos (aa), de cerca de 110 aa a cerca de  
 115 aa, de cerca de 115 aa a cerca de 120 aa, de cerca de 120 aa a cerca de  
 130 aa, de cerca de 130 aa a cerca de 140 aa, de cerca de 140 aa a cerca de  
 20 150 aa, ou de cerca de 150 aa a cerca de 160 aa qualquer uma das seguintes  
 sequências de aminoácidos:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQL[YNELNLGRREEYDVL]DKRRGRDPEMGGKPR  
 RKNPQEGL[YNELQKDKMAEAYSEI]GMKGERRRGKGHDGL[YQGLSTATKDT  
 YDAL]HMQALPPR (SEQ ID NO:13);

25 RVKFSRSADAPAYQQGQNQL[YNELNLGRREEYDVL]DKRRGRDPEMGGKP  
 QRRKNPQEGL[YNELQKDKMAEAYSEI]GMKGERRRGKGHDGL[YQGLSTATK  
 DTYDAL]HMQALPPR (SEQ ID NO:127); NQL[YNELNLGRREEYDVL]DKR SEQ  
 ID NO:14); EGL[YNELQKDKMAEAYSEI]GMK (SEQ ID NO:15); ou  
 DGL[YQGLSTATKDTYDAL]HMQ (SEQ ID NO:16), em que os motivos ITAM são  
 30 apontados com colchetes.

[224] Em alguns casos, o domínio de ativação intracelular é derivado da cadeia delta CD3 da glicoproteína de superfície (também conhecida como CD3D; CD3-DELTA; T3D; antígeno CD3, subunidade delta; CD3 delta; antígeno CD3d, delta polipeptídeo (complexo TiT3); OKT3, cadeia delta, cadeia delta do receptor T3 de células T, cadeia delta CD3 da glicoproteína de superfície de células T, etc.). Assim, um domínio de ativação intracelular adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com uma extensão de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos nas sequências seguintes ou numa extensão contígua de cerca de 100 aminoácidos a cerca de 110 aminoácidos (aa), de cerca de 110 aa a cerca de 115 aa, de cerca de 115 aa a cerca de 120 aa, de cerca de 120 aa a cerca de 130 aa, de cerca de 130 aa a cerca de 140 aa, de cerca de 140 aa a cerca de 150 aa, ou de cerca de 150 aa a cerca de 160 aa qualquer uma das seguintes sequências de aminoácidos:

15 MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWEGTVGTLLSDI  
 TRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIV  
 TDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQV[YQPLRDRDDAQYS  
 HL]GGNWARNK (SEQ ID NO:17) ou  
 MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWEGTVGTLLSDI  
 20 TRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRTADTQALLRNDQV[YQPL  
 RDRDDAQYSHL]GGNWARNK (SEQ ID NO:18), em que os motivos ITAM são apontados com colchetes.

[225] Do mesmo modo, um polipeptídeo de domínio de ativação intracelular adequado pode compreender uma porção contendo um motivo ITAM da sequência de aminoácidos delta CD3 completa. Assim, um domínio de ativação intracelular adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos na seguinte sequência: DQV[YQPLRDRDDAQYSHL]GGN

30 (SEQ ID NO: 19), em que os motivos ITAM são apontados com colchetes.

[226] Em alguns casos, o domínio de ativação intracelular é derivado da glicoproteína CD3 epsilon da superfície da célula T (também conhecida como CD3e, cadeia de antígeno de superfície de células T T3/Leu-4 epsilon, cadeia CD3 epsilon de glicoproteína de células T, A1504783, CD3, CD3epsilon, T3e, etc.). Assim, um domínio de ativação intracelular adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com uma extensão de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos nas sequências seguintes ou numa extensão contígua de cerca de 100 aminoácidos a cerca de 110 aminoácidos (aa), de cerca de 110 aa a cerca de 115 aa, de cerca de 115 aa a cerca de 120 aa, de cerca de 120 aa a cerca de 130 aa, de cerca de 130 aa a cerca de 140 aa, de cerca de 140 aa a cerca de 150 aa, ou de cerca de 150 aa a cerca de 160 aa a seguinte sequência de aminoácidos: MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQY PGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSK PEDANFYLYLRARVCENCMEMDMSVATIVIVDICITGGLLLLVEYYWSKNRKAKA KPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDP[YEPIRKGQRDLYSGL]NQRR (SEQ ID NO:20), em que os motivos ITAM são apontados com colchetes.

[227] Do mesmo modo, um polipeptídeo de domínio de ativação intracelular adequado pode compreender uma porção contendo um motivo ITAM da sequência de aminoácidos CD3 epsilon inteira. Assim, um domínio de ativação intracelular adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos na seguinte sequência: NPD[YEPIRKGQRDLYSGL]NQR (SEQ ID NO:21), em que os motivos ITAM são apontados com colchetes.

[228] Em alguns casos, o domínio de ativação intracelular é derivado da cadeia gama da glicoproteína CD3 da superfície das células T (também conhecida como CD3G, cadeia gama do receptor T3 das células T, CD3-GAMMA, T3G, polipeptídeo gama (complexo TiT3), etc.). Assim, um

domínio de ativação intracelular adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com uma extensão de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos nas sequências seguintes ou numa extensão contígua de cerca de 100 aminoácidos a cerca de 110 aminoácidos (aa), de cerca de 110 aa a cerca de 115 aa, de cerca de 115 aa a cerca de 120 aa, de cerca de 120 aa a cerca de 130 aa, de cerca de 130 aa a cerca de 140 aa, de cerca de 140 aa a cerca de 150 aa, ou de cerca de 150 aa a cerca de 160 aa a seguinte sequência de aminoácidos:

MEQGKGLAVLILAILLLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITW  
FKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQ  
NCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVQRQSRASDKQTLLPNDQL[Y  
QPLKDREDDQYSHL]QGNQLRRN (SEQ ID NO:22), em que os motivos ITAM  
são apontados com colchetes.

[229] Do mesmo modo, um polipeptídeo do domínio de ativação intracelular adequado pode compreender uma porção contendo um motivo ITAM da sequência de aminoácidos gama CD3 completa. Assim, um domínio de ativação intracelular adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos na seguinte sequência: DQL[YQPLKDREDDQYSHL]QGN (SEQ ID NO:23), em que os motivos ITAM são apontados com colchetes.

[230] Em alguns casos, o domínio de ativação intracelular é derivado de CD79A (também conhecido como cadeia alfa da proteína alfa associada ao complexo antígeno da célula B; antígeno CD79a (alfa associado à imunoglobulina); glicoproteína de membrana MB-1; Ig-alfa; proteína associada a imunoglobulina, proteína associada a IgM de superfície, etc.). Assim, um domínio de ativação intracelular adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com uma extensão de pelo menos 10, 15, 20 ou todos

os aminoácidos nas sequências seguintes ou numa extensão contígua de cerca de 100 aminoácidos a cerca de 110 aminoácidos (aa), de cerca de 110 aa a cerca de 115 aa, de cerca de 115 aa a cerca de 120 aa, de cerca de 120 aa a cerca de 130 aa, de cerca de 130 aa a cerca de 140 aa, de cerca de 140 aa a cerca de 150 aa, ou de cerca de 150 aa a cerca de 160 aa qualquer uma das seguintes sequências de aminoácidos:

MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGP GCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHF  
QCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKSHGGI  
YVCRVQEGNESYQQSCGYLRVRQPPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCA

10 VVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENL[YEGLNLDDCSMYEDI]SRGLQ  
GTYQDVGSLNIGDVQLEKP (SEQ ID NO:24) ou

MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGP GCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHF  
QCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNEPPPRPFLDMGEGT  
KNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENL[YEGLNLD

15 DCSMYEDI]SRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP (SEQ ID NO:25), em que os motivos ITAM são apontados com colchetes.

[231] Do mesmo modo, um polipeptídeo de domínio de ativação intracelular adequado pode compreender uma porção contendo um motivo ITAM da sequência de aminoácidos CD79A de comprimento total. Assim, um domínio de ativação intracelular adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos na seguinte sequência: ENL[YEGLNLDDCSMYEDI]SRG (SEQ ID NO:26), em que os motivos ITAM são apontados com colchetes.

25 [232] Em alguns casos, o domínio de ativação intracelular é derivado de DAP12 (também conhecida como TYROBP; proteína de ligação à proteína tirosina quinase TYRO; KARAP; PLOSL; proteína 12 de ativação de DNAX; proteína associada a KAR; proteína de ligação tirosina quinase TYRO; proteína associada a receptor; proteína associada ao receptor ativador de killer; etc.). Por exemplo, um domínio de ativação intracelular adequado pode incluir

30

um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos nas seguintes sequências ou em um alongamento contínuo de cerca de 100 aminoácidos a cerca de 110 aminoácidos (aa), de cerca de 110 aa para cerca de 115 aa, de cerca de 115 aa a cerca de 120 aa, de cerca de 120 aa a cerca de 130 aa, de cerca de 130 aa a cerca de 140 aa, de cerca de 140 aa a cerca de 150 aa, ou de cerca de 150 aa a cerca de 160 aa de uma das seguintes sequências de aminoácidos (4 isoformas):

10 MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVL  
TVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESP[YQELQGQRSDVYSDL]  
NTQRPYYK (SEQ ID NO:27),  
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVL  
TVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESP[YQELQGQRSDVYSDL]N  
15 TQ (SEQ ID NO:28),  
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLG  
RLVPRGRGAAEAATRKQRITETESP[YQELQGQRSDVYSDL]NTQRPYYK  
(SEQ ID NO:29), ou  
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLG  
20 RLVPRGRGAAEAATRKQRITETESP[YQELQGQRSDVYSDL]NTQRPYYK (SEQ  
ID NO:30), em que os motivos ITAM são apontados com colchetes.

[233] Do mesmo modo, um polipeptídeo de domínio de ativação intracelular adequado pode compreender uma porção contendo um motivo ITAM da sequência de aminoácidos DAP12 de comprimento total. Assim, um domínio de ativação intracelular adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos na seguinte sequência: ESP[YQELQGQRSDVYSDL]NTQ (SEQ ID NO:31), em que os motivos ITAM são apontados com colchetes.

30 [234] Em alguns casos, o domínio de ativação intracelular é

derivado de FCER1G (também conhecido como FCRG; cadeia gama do receptor I epsilon; cadeia gama do receptor Fc; fc-epsilon RI-gama; fcRgama; fceRI gama; subunidade gama do receptor epsilon de alta afinidade da imunoglobulina receptor de imunoglobulina E, alta afinidade, cadeia gama, etc. Por exemplo, um

5 domínio de ativação intracelular adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos nas sequências seguintes ou em um alongamento contíguo de cerca de 50 aminoácidos a cerca de 60 aminoácidos (aa), de cerca

10 de 60 aa a cerca de 70 aa, de cerca de 70 aa a cerca de 80 aa, ou de cerca de 80 aa a cerca de 88 aa, da seguinte sequência de aminoácidos: MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQVRKAAITS YEKSDGV[YTGLSTRNQETYETL]KHEKPPQ (SEQ ID NO:32), em que os motivos ITAM são apontados com colchetes.

15 [235] Do mesmo modo, um polipeptídeo de domínio de ativação intracelular adequado pode compreender uma porção contendo um motivo ITAM da sequência de aminoácidos FCER1G de comprimento total. Assim, um domínio de ativação intracelular adequado pode incluir um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou

20 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos na seguinte sequência: DGV[YTGLSTRNQETYETL]KHE (SEQ ID NO:33), em que os motivos ITAM são apontados com colchetes.

[236] Os domínios de ativação intracelular adequados para uso

25 em um CAR da presente revelação incluem uma cadeia de sinalização do tipo DAP10/CD28. Um exemplo de uma cadeia de sinalização DAP10 é a sequência de aminoácidos é: RPRRSPAQDGKV[YINM]PGRG (SEQ ID NO:34). Em algumas modalidades, um domínio de ativação intracelular adequado inclui um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%,

30 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de

pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos na seguinte sequência: RPRRSPAQDGKV[YINM]PGRG (SEQ ID NO:34), em que o motivo notável é apontado com colchetes.

[237] Um exemplo de uma cadeia de sinalização CD28 é a  
5 sequência de aminoácidos

FWLWVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSD[YMNM]TPRRPGPTRK  
HYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:35). Em algumas modalidades, um  
domínio intracelular adequado inclui um domínio com pelo menos 50%, 60%,  
70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade

10 de sequência com um alongamento de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os  
aminoácidos na seguinte sequência:

FWLWVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSD[YMNM]TPRRPGPTRK  
HYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:35).

[238] Os domínios de ativação intracelular adequados para uso  
15 em um CAR da presente revelação incluem um polipeptídeo ZAP70. Por  
exemplo, um domínio de ativação intracelular adequado pode incluir um domínio  
com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%,  
99% ou 100% de identidade de sequência com um alongamento de pelo menos  
10, 15, 20 ou todos os aminoácidos nas seguintes sequências ou para um trecho

20 contíguo de cerca de 300 aminoácidos a cerca de 400 aminoácidos, de cerca de  
400 aminoácidos a cerca de 500 aminoácidos, ou de cerca de 500 aminoácidos  
a 619 aminoácidos, da seguinte sequência de aminoácidos:

MPDPAAHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRS LGGYVLSLVHD  
VRFHHFPIERQLNGTYAIAGGKAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLRKPCNRP

25 SGLEPQPGVFDCLRDAMVRDYVRQTWKLEGEALEQAIISQAPQVEKLIATTAH  
ERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTDGKFLLRPRKEQGTYALSLIYGKTVYH

YLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASG  
AAAPTLP AHPSTLTHPQRRIDTLNSDGYTPEPARITSPDKPRPMPMDTSVYES

PYSDPEELKDKKLFLKRDNLLIADIELGCGNFGSVRQGVYRMRKKQIDVAIKVL  
30 KQGTEKADTEEMMREAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLH

KFLVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAK  
ISDFGLSKALGADDSYYTARSAGKWPLKWYAPECINFRKFSSRSDVWSYGVT  
MWEALSYGQKPYPYKMMKGPEVMAFIEQGKRMECPPECPPELYALMSDCWIYK  
WEDRPDFTVEQRMRACTYYSKASKVEGPPGSTQKAEAAACA (SEQ ID NO:36).

5        Domínios Adicionais

[239]        O CAR pode ainda incluir um ou mais domínios polipeptídicos adicionais, em que tais domínios incluem, mas sem limitação, uma sequência sinal; um marcador epitópico; um domínio de afinidade; e um polipeptídeo que produz um sinal detectável. Exemplos não limitativos de domínios adicionais para qualquer um dos aspectos ou modalidades aqui fornecidas, incluem um domínio com pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com qualquer uma das seguintes sequências, como descrito abaixo: uma sequência sinal, um marcador epitópico, um domínio de afinidade ou um polipeptídeo que produz um sinal detectável.

[240]        Sequências de sinalização que são adequadas para uso em um CAR de tópico, por exemplo, no primeiro polipeptídeo de um CAR de tópico, incluem qualquer sequência de sinalização eucariótica, incluindo uma sequência de sinalização de ocorrência natural, uma sequência de sinalização sintética (por exemplo, artificial), etc. Em algumas modalidades, por exemplo, a sequência de sinalização pode ser a sequência de sinalização CD8 MALPVTALLPLALLHAARP (SEQ ID NO: 74).

[241]        Marcadores epitópicos adequados incluem, sem limitação, hemaglutinina (HA; por exemplo, YPYDVPDYA; SEQ ID NO:37); FLAG (por exemplo, DYKDDDDK; SEQ ID NO:38); c-myc (por exemplo, EQKLISEEDL; SEQ ID NO:39), e similares.

[242]        Os domínios de afinidade incluem sequências de peptídeos que podem interagir com um parceiro de ligação, por exemplo, um imobilizado em um suporte sólido, útil para identificação ou purificação. Sequências de DNA que codificam múltiplos aminoácidos únicos consecutivos, como histidina,

quando fundidas com a proteína expressa, podem ser usadas para purificação de uma etapa da proteína recombinante por ligação de alta afinidade a uma coluna de resina, como a sefarose de níquel. Domínios de afinidade exemplificadores incluem His5 (HHHHH; SEQ ID NO:40), HisX6 (HHHHHH; SEQ ID NO:41), c-myc (EQKLISEEDL; SEQ ID NO:39), Flag (DYKDDDDK; SEQ ID NO:38), Strep Tag (WSHPQFEK; SEQ ID NO:42), hemaglutinina, por exemplo, HA Tag (YPYDVPDYA; SEQ ID NO:37), GST, tioredoxina, domínio de ligação a celulose, RYIRS (SEQ ID NO:43), Phe-His-His-Thr (SEQ ID NO:44), domínio de ligação a quitina, S-peptídeo, peptídeo T7, domínio SH2, marcador de RNA de extremidade C, WEAAAREACCRECCARA (SEQ ID NO:45), domínio de ligação a metal, por exemplo, domínio de ligação a zinco ou domínio de ligação a cálcio como aqueles de proteína de ligação a cálcio, por exemplo, calmodulina, troponina C, calcineurina B, cadeia leve de miosina, recoverina, S-modulina, visinina, VILIP, neurocalcina, hipocalcina, frequenina, caltractina, subunidade grande de calpaína, proteínas S100, parvalbumina, calbindina D9K, calbindina D28K, e calretinina, inteínas, biotina, estreptavidina, MyoD, Id, sequências zipper de leucina, e proteína de ligação a maltose.

[243] Proteínas produtoras de sinal detectáveis adequadas incluem, por exemplo, proteínas fluorescentes; enzimas que catalisam uma reação que gera um sinal detectável como produto; e similar.

[244] Proteínas fluorescentes adequadas incluem, sem limitação, proteína fluorescente verde (GFP) ou variantes das mesmas, variante fluorescente azul de GFP (BFP), variante fluorescente ciano de GFP (CFP), variante fluorescente amarela de GFP (YFP), GFP melhorada (EGFP), reforçada CFP (ECFP), melhorada YFP (EYFP), GFPS65T, Esmeralda, Topázio (TYFP), Vênus, Citrino, mCitrina, GFPuv, desestabilizado EGFP (dEGFP), desestabilizado ECFP (dECFP), desestabilizado EYFP (dEYFP), mCFPm, Cerulean, T-Safira, CyPet, YPet, mKO, HcRed, t-HcRed, DsRed, DsRed2, DsRed-monômero, J-Vermelho, dimer2, t-dimer2 (12), mRFPI, pocilisina, Renilla GFP, Monster GFP, paGFP, proteína Kaede e proteína de kindling, conjugados

Ficobiliproteínas e Ficobiliproteína incluindo B-ficoeritrina, R-ficoeritrina e alofococianina. Outros exemplos de proteínas fluorescentes incluem o melão, mBanana, mOrange, dTomato, tdTomato, mTangerine, mStrawberry, mCherry, mGrapel, mRaspberry, mGrape2, mPlum (Shaner et al. (2005) *Nat. Methods* 2:905-909), e similares. Qualquer uma de uma variedade de proteínas fluorescentes e coloridas das espécies de Anthozoon, como descrito em, por exemplo, Matz et al. (1999) *Nature Biotechnol.* 17:969-973, é adequada para uso.

[245] Enzimas adequadas incluem, sem limitação, peroxidase de rábano (HRP), fosfatase alcalina (AP), beta-galactosidase (GAL), desidrogenase de glucose-6-fosfato, beta-N-acetilglucosaminidase,  $\beta$ -glucuronidase, invertase, Xantina Oxidase, luciferase de pirilampo, glucose oxidase (GO) e similares.

#### Domínios de Reconhecimento e/ou Eliminação

[246] Qualquer um dos CARs aqui revelados pode incluir o domínio de reconhecimento ou eliminação. Em algumas modalidades, o domínio de reconhecimento ou eliminação pode ser derivado de enzima timidina quinase derivada do vírus herpes simplex (HSV-tk) ou caspase-9 induzível ou pode ser o epítipo FLAG (SEQ ID NO: 38). Em algumas modalidades, o domínio de reconhecimento ou eliminação reconhecido por um anticorpo que aprovado por uma agência reguladora governamental para uso em seres humanos, como, sem limitação, cetuximab, rituximab ou Herceptin. Em algumas modalidades, o domínio de reconhecimento ou eliminação pode incluir uma molécula de superfície celular endógena modificada, como descrito na Patente nº US 8.807.274. A molécula de superfície celular endógena modificada pode ser qualquer receptor, ligando, glicoproteína, molécula de adesão celular, antígeno, integrina ou grupo de diferenciação (CD) relacionado à superfície celular que é modificado. Em algumas modalidades, a molécula de superfície celular endógena modificada é um receptor de tirosina-quinase truncado. Em um aspecto, o receptor de tirosina-quinase truncado é um membro da família de receptores do fator de crescimento epidérmico (por exemplo, ErbB1, ErbB2,

ErbB3, ErbB4), por exemplo, SEQ ID NO: 78. O domínio de reconhecimento ou eliminação pode ser expresso como parte de um único polipeptídeo que também inclui o CAR. Em algumas modalidades, o domínio de reconhecimento ou eliminação pode estar no ou próximo do N-terminal do polipeptídeo simples, como após um peptídeo de sinalização N-terminal. Em algumas modalidades, o domínio de reconhecimento ou eliminação pode estar no ou próximo do C-terminal do polipeptídeo. Em algumas modalidades, o domínio de reconhecimento ou eliminação ou próximo do C-terminal pode ser separado da sequência de aminoácidos que codifica o CAR por um sinal de clivagem ou uma sequência saltadora ribossomal. O sinal de clivagem pode ser qualquer sinal de clivagem conhecido na técnica. A sequência de salto ribossômica pode ser qualquer sequência de salto ribossômica conhecida na técnica, por exemplo, 2A-1 com sequência de aminoácidos GSGEGRGSLTCDVEENPGP (SEQ ID NO:77). Em algumas modalidades, o domínio de reconhecimento ou eliminação pode ser entre qualquer um dos domínios da CAR, por exemplo, entre os domínios stalk e transmembranar ou o domínio de reconhecimento ou eliminação pode estar em um ligante, por exemplo, o ligante entre cadeias pesada e leve de um anticorpo de cadeia simples.

[247] O receptor do fator de crescimento epidérmico, também conhecido como EGFR, ErbB1 e HER1, é um receptor de superfície celular para membros da família dos fatores de crescimento epidérmicos de ligantes extracelulares. Alterações na atividade do EGFR foram implicadas em certos tipos de câncer. Em algumas modalidades, um gene que codifica um polipeptídeo EGFR incluindo o receptor do fator de crescimento epidérmico humano (EGFR) que é construído por remoção de sequências de ácido nucleico que codificam polipeptídeos incluindo o domínio de ligação de EGF distal da membrana e a cauda de sinalização citoplasmática, mas retém o epítipo proximal de membrana extracelular reconhecido por um anticorpo anti-EGFR. Em modalidades ilustrativas, o anticorpo é um anticorpo monoclonal anti-EGFR comercialmente disponível conhecido, como cetuximab, matuzumab,

necitumumab ou panitumumab.

[248] A aplicação de cetuximab biotinilado à seleção imunomagnética em combinação com microesferas anti-biotina enriquece com sucesso as células T que foram transduzidas lentiviralmente com construtos contendo EGFRt de tão baixo quanto 2% da população a mais de 90% de pureza sem toxicidade observável para a célula preparação. A expressão constitutiva dessa molécula de EGFR inerte não afeta o fenótipo de células T ou função efetora como dirigido pelo receptor de antígeno quimérico (CAR) CD19R expresso coordenadamente. Por meio de análise citométrica de fluxo, o EGFR foi usado com sucesso como um marcador de rastreamento *in vivo* para o enxerto de células T em camundongos. Além disso, demonstrou-se que o EGFR tem potencial genético suicida através das vias de citotoxicidade celular dependente de anticorpos mediada por Erbitux® (ADCC). Assim, o EGFR pode ser usado como uma ferramenta de seleção não imunogênica, marcador de rastreamento e gene suicida para células T transduzidas que têm potencial imunoterápico. O ácido nucleico de EGFR também pode ser detectado por meios bem conhecidos na técnica.

[249] Em algumas modalidades, o EGFR é expresso como parte de um único polipeptídeo que também inclui o CAR. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos que codifica o domínio de reconhecimento de EGFR pode ser separada da sequência de aminoácidos que codifica o CAR por um sinal de clivagem ou sequência de salto ribossômica. O sinal de clivagem pode ser qualquer sinal de clivagem conhecido na técnica. A sequência de salto ribossômica pode ser qualquer sequência de salto ribossômica conhecida na técnica, por exemplo, 2A-1 com sequência de aminoácidos GSGEGRGSLTCTGDVEENPGP (SEQ ID NO:77). Em algumas modalidades, a sequência de polinucleotídeos que codifica o domínio de reconhecimento pode estar no mesmo transcrito que o CAR, mas separado da sequência de polinucleotídeos que codifica o CAR por um sítio de entrada do ribossoma interno.

### Recombinação de Sequências

[250] Em certos casos, as sequências dos polipeptídeos de um CAR, por exemplo, domínios de CAR, podem ser rearranjadas ou eliminadas em uma célula através do uso de tecnologia de recombinação específica do sítio.

- 5 Em certas modalidades, a resposta relacionada com a ativação celular a um CAR particular pode ser alterada por recombinação específica do sítio, por exemplo, um primeiro domínio de ativação intracelular de um CAR que desencadeia uma primeira resposta relacionada com ativação pode ser trocado por um segundo domínio de ativação intracelular uma segunda resposta relacionada à ativação.
- 10 Como será evidente para um versado na técnica, a recombinação específica do sítio pode ser usada em uma célula para trocar qualquer domínio ou sequência de um CAR com qualquer outro domínio ou sequência como aqui revelado. Como também será evidente para um versado na técnica, a recombinação específica do sítio pode ser usada e uma célula para eliminar qualquer domínio
- 15 ou sequência de um CAR. Tal troca e excisão de sequências e domínios é conhecida na técnica, consulte, por exemplo, comutação de domínio em corpos de sinal como descrito em Tone et al. (2013) *Biotechnology and Bioengineering*, 3219-3226, cuja revelação está aqui incorporada a título de referência. Os mecanismos e requisitos para realizar a recombinação *in situ* específica *in vivo*
- 20 são também bem conhecidos na técnica, consulte, por exemplo, Grindley et al. (2006) *Annual Review of Biochemistry*, 567-605 e Tropp (2012) *Molecular Biology* (Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, MA), cujas revelações estão aqui incorporadas a título de referência.

- [251] CARs são proteínas quiméricas que são geradas pela fusão
- 25 de todos os diferentes domínios discutidos acima em conjunto para formar uma proteína de fusão. O CAR é tipicamente gerado por um vetor de expressão que compreende sequências de polinucleotídeo que codificam os diferentes domínios do CAR como aqui discutido. O ASTR da presente invenção, que funciona para reconhecer e se ligar a um antígeno nas células-alvo, é
- 30 condicionalmente ativo. Especificamente, o ASTR é menos ativo ou inativo em

uma condição fisiológica normal e ativo em uma condição de ensaio substituto do tumor *in vitro* para ligação ao antígeno alvo, em comparação com um ASTR da proteína do tipo selvagem correspondente.

[252] A proteína de tipo selvagem ou nativa que é adequada para  
5 ser usada no todo ou em parte pelo menos pelo seu domínio de ligação para o antígeno alvo, como um ASTR na presente invenção pode ser revelada gerando uma biblioteca proteica e pesquisando a biblioteca durante uma proteína com uma afinidade de ligação desejada para o antígeno alvo. A proteína do tipo selvagem pode ser revelada por rastreio de uma biblioteca de cDNA. Uma  
10 biblioteca de cDNA é uma combinação de fragmentos clonados de cDNA (DNA complementar) inseridos em uma coleção de células hospedeiras, que em conjunto constituem uma parte do transcriptoma do organismo. O cDNA é produzido a partir de mRNA totalmente transcrito e, portanto, contém a sequência de codificação para proteínas expressas de um organismo. As  
15 informações em bibliotecas de cDNA são uma ferramenta poderosa e útil para a revelação de proteínas com propriedades desejadas através do rastreio das bibliotecas para proteínas com a afinidade de ligação desejada ao antígeno alvo.

#### Microambiente tumoral

[253] Células cancerosas em um tumor sólido têm a capacidade  
20 de formar um microambiente tumoral em seu entorno para suportar o crescimento e metástase das células cancerosas. Um microambiente tumoral é o ambiente celular no qual o tumor existe, incluindo vasos sanguíneos adjacentes, células imunes, fibroblastos, outras células, fatores solúveis, moléculas sinalizadoras, uma matriz extracelular e sinais mecânicos que podem  
25 promover a transformação neoplásica, apoiar o crescimento tumoral e invasão, proteger o tumor contra a imunidade do hospedeiro, promover resistência terapêutica e fornecer nichos para que as metástases inativas se desenvolvam. O tumor e seu microambiente circundante estão intimamente relacionados e interagem constantemente. Os tumores podem influenciar o seu microambiente  
30 liberando sinais extracelulares, promovendo a angiogênese tumoral e induzindo

tolerância imunológica periférica, enquanto as células imunes no microambiente podem afetar o crescimento e a evolução das células cancerígenas. Consulte Swarts et al. “Tumor Microenvironment Complexity: Emerging Roles in Cancer Therapy”, *Cancer Res*, vol., 72, páginas 2473-2480, 2012.

5           [254]       O microambiente tumoral é frequentemente hipóxico. À medida que a massa tumoral aumenta, o interior do tumor torna-se ainda mais distante do suprimento sanguíneo existente, o que leva a dificuldades no fornecimento completo de oxigênio ao microambiente tumoral. A pressão parcial de oxigênio no ambiente do tumor está abaixo de 5 mmHg em mais de 50% dos  
10 tumores sólidos localmente avançados, em comparação com uma pressão parcial de oxigênio em torno de 40 mmHg no plasma sanguíneo. Em contraste, outras partes do corpo não são hipóxicas. O ambiente hipóxico leva à instabilidade genética, que está associada à progressão do câncer, via regulação negativa da excisão de nucleotídeos e vias de reparo de incompatibilidade. A  
15 hipóxia também provoca a suprarregulação do fator I induzível por hipóxia (HIF1- $\alpha$ ), que induz a angiogênese, e está associada a pior prognóstico e à ativação de genes associados à metástase. Consulte Weber et al., “The microambiente tumoral”, *Surgical Oncology*, vol. 21, páginas 172- 177, 2012 e Blagosklonny, “Antiangiogenic therapy and tumor progression”, *Cancer Cell*, vol. 5, páginas 13-  
20 17, 2004.

                  [255]       Além disso, as células tumorais tendem a depender da energia gerada pela fermentação do ácido láctico, que não requer oxigênio. Assim, as células tumorais são menos propensas a usar a respiração aeróbica normal que requer oxigênio. Uma consequência do uso da fermentação do ácido  
25 láctico é que o microambiente tumoral é ácido (pH 6,5-6,9), em contraste com outras partes do corpo que são tipicamente neutras ou ligeiramente básicas. Por exemplo, o plasma sanguíneo humano tem um pH de cerca de 7,4. Consulte Estrella et al., “Acidity Generated by the Tumor Microenvironment Drives Local Invasion”, *Cancer Research*, vol. 73, páginas 1524-1535, 2013. A disponibilidade  
30 de nutrientes no microambiente tumoral também é baixa devido à demanda de

nutrientes relativamente alta das células cancerígenas em proliferação, em comparação com as células localizadas em outras partes do corpo.

[256] Além disso, o microambiente do tumor também contém muitos tipos distintos de células que não são comumente encontrados em outras partes do corpo. Esses tipos de células incluem células endoteliais e seus precursores, pericitos, células musculares lisas, fibroblastos, fibroblastos associados a carcinomas, miofibroblastos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, linfócitos T e B, células exterminadoras naturais e células apresentadoras de antígenos (APC) como macrófagos e células dendríticas (Lorusso et al., "The microambiente tumoral and its contribution to tumor evolution toward metastasis", *Histochem Cell Biol*, vol. 130, páginas 1091-1103, 2008).

[257] Consequentemente, o microambiente tumoral tem pelo menos várias condições fisiológicas que são diferentes das de outras partes do corpo, tais como as condições fisiológicas no plasma sanguíneo. O microambiente tumoral tem um pH (ácido) que é mais baixo que outras partes do corpo, especialmente o plasma sanguíneo (pH 7,4). O microambiente do tumor tem uma menor concentração de oxigênio do que outras partes do corpo, como o plasma sanguíneo. Além disso, o microambiente tumoral tem uma menor disponibilidade de nutrientes do que outras partes do corpo, especialmente o plasma sanguíneo. O microambiente tumoral também possui alguns tipos distintos de células que não são comumente encontrados em outras partes do corpo, especialmente no plasma sanguíneo.

[258] Em modalidades ilustrativas, os CARs da presente invenção incluem um ASTR condicionalmente ativo gerado de uma proteína biológica do tipo selvagem (isto é, nativa), como um anticorpo de tipo selvagem ou nativo isolado de um organismo mamífero como um camundongo ou um ser humano, para exemplo, isso pode ser um candidato para tratamento de tumor. O ASTR condicionalmente ativo em tais modalidades ilustrativas tem atividade inferior em pelo menos uma condição fisiológica em partes do corpo que não o

microambiente tumoral como plasma sanguíneo, do que a proteína biológica nativa ou de tipo selvagem, embora tenha maior atividade sob pelo menos uma condição fisiológica no microambiente tumoral do que a proteína biológica nativa ou de tipo selvagem. Tais proteínas nativas ou biológicas condicionalmente

5 ativas podem atuar preferencialmente sobre células cancerosas no microambiente tumoral para tratar tumores e, assim, serão menos prováveis que causem efeitos secundários. Em modalidades em que a proteína nativa ou biológica um anticorpo contra um antígeno na superfície das células tumorais em que o antígeno exposto ao microambiente tumoral, o anticorpo condicionalmente

10 ativo tem menor afinidade para o antígeno do que o anticorpo nativo ou de tipo selvagem em outras partes do corpo, por exemplo, um microambiente não tumoral, embora tenha maior afinidade com o antígeno do que o anticorpo nativo ou tipo selvagem no microambiente tumoral. Tais anticorpos condicionalmente ativos podem ligar-se fracamente ou de modo nenhum ao antígeno em outras

15 partes do corpo, mas têm maior ligação, ou ligam-se fortemente e firmemente, ao antígeno no microambiente tumoral.

#### Ensaio substituto de tumor *in vitro*

[259] Os ASTRs usados em CARs ou na presente revelação, e tipicamente os CARs aqui, que incluem tais ASTRs, em modalidades ilustrativas,

20 condicionalmente ativos em um ambiente tumoral e/ou em uma condição de ensaio substituto de tumor *in vitro*. A condição de ensaio substituto do tumor *in vitro* pode ser qualquer condição que é testada *in vitro* comparando essa condição com valores ou níveis encontrados em pelo menos alguns cânceres *in vivo*, contra essa condição em valores ou níveis encontrados no tecido fisiológico

25 sob condições fisiológicas. É fornecido nos Exemplos aqui um ensaio substituto do tumor *in vitro* não limitativo para a lise celular a pH baixo (por exemplo, 6,0 ou 6,7) em comparação com o pH fisiológico (por exemplo, 7,4). As condições de ensaio substituto de tumor *in vitro* sob as quais um CAR da presente revelação pode ser ativo incluem, sem limitação, elevado hialuronano, ácido láctico e/ou

30 albumina, em que a condição normal são baixos níveis de ácido láctico,

hialuronano e albumina. Outra condição de ensaio substituto de tumor *in vitro* é o pH, especialmente condições específicas em que o pH na condição de ensaio substituto do tumor *in vitro* é inferior ao pH fisiológico normal. Por exemplo, a condição de ensaio substituto do tumor pode ter um pH entre 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 e 6,5 na extremidade inferior do intervalo e 6,6, 6,7, 6,8 e 6,9 na extremidade alta do intervalo. Considerando que o pH fisiológico pode estar entre 7,2, 7,3 e 7,4 na extremidade inferior do intervalo e 7,5, 7,6, 7,7 e 7,8 na extremidade alta do intervalo. Em modalidades ilustrativas, o pH baixo na condição de ensaio substituto do tumor *in vitro* encontra-se entre 6,5 e 6,9 e pode ser especificamente 6,7. O pH fisiológico pode ser de pH 7,2 a 7,6 ou pode ser especificamente ajustado a pH 7,4. Em uma outra modalidade, o pH permanece inalterado, mas a condição de ensaio substituto do tumor *in vitro* difere apenas em concentrações de ácido láctico. Em uma outra modalidade, a condição de ensaio substituto do tumor *in vitro* inclui níveis elevados de adenosina em comparação com o ambiente fisiológico. Em uma outra modalidade, a condição de ensaio substituto do tumor *in vitro* inclui níveis elevados de R-2-hidroxiglutarato em comparação com o ambiente fisiológico. Em outras modalidades, o scFv é enxertado das cadeias pesada e leve de um anticorpo monoclonal que foi selecionado para especificidade microambiental através de evolução molecular, como descrito na patente n° US 8.709.755 B2 e no pedido WO/2016/03331A1.

#### Ácidos nucleicos

[260] A presente revelação fornece um ácido nucleico que inclui uma sequência nucleotídica que codifica o polipeptídeo de um CAR condicionalmente ativo da presente revelação. Um ácido nucleico incluindo uma sequência nucleotídica que codifica o CAR condicionalmente ativo da presente revelação será em algumas modalidades DNA, incluindo, por exemplo, um vetor de expressão recombinante. Um ácido nucleico incluindo uma sequência de nucleotídeos que codifica o CAR condicionalmente ativo da presente revelação será, em algumas modalidades, RNA, por exemplo, RNA sintetizado *in vitro*.

[261] Em alguns casos, um ácido nucleico fornece a produção de um CAR da presente revelação, por exemplo, em uma célula de mamífero. Em outros casos, um ácido nucleico de tópico fornece a amplificação do ácido nucleico que codifica CAR.

5 [262] Uma sequência nucleotídica que codifica o CAR da presente revelação pode ser operacionalmente ligada a um elemento de controle da transcrição, por exemplo, um promotor, e potenciador, etc.

[263] Elementos promotores e potenciadores adequados são conhecidos na técnica. Para expressão em uma célula bacteriana, os promotores adequados incluem, sem limitação, lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P e trc. Para expressão em uma célula eucariótica, os promotores adequados incluem, sem limitação, promotor do gene da imunoglobulina de cadeia leve e/ou pesada e elementos potenciadores; promotor precoce imediato de citomegalovírus; promotor da timidina quinase do vírus herpes simplex; promotores iniciais e tardios de SV40; promotor presente em repetições terminais longas de um retrovírus; promotor de metalotioneína-I de camundongo; e vários promotores específicos do tecido conhecidos na técnica.

10  
15

[264] Promotores reversíveis adequados, incluindo promotores induzíveis reversíveis são conhecidos na técnica. Tais promotores reversíveis podem ser isolados e derivados de muitos organismos, por exemplo, eucariotas e procariotas. A modificação de promotores reversíveis derivados de um primeiro organismo para uso em um segundo organismo, por exemplo, um primeiro procariota e um segundo eucariota, um primeiro eucariota e um segundo um procariota, etc., também é conhecida na técnica. Tais promotores reversíveis, e sistemas baseados em tais promotores reversíveis, mas que também compreendem proteínas de controle adicionais, incluem, sem limitação, promotores regulados pelo álcool (por exemplo, promotor do gene da álcool desidrogenase I (alcA), promotores responsivos às proteínas transativadoras de álcool (AlcR), etc.), promotores regulados por tetraciclina (por exemplo, sistemas promotores incluindo TetActivators, TetON, TetOFF, etc.), promotores regulados

20  
25  
30

por esteroides (por exemplo, sistemas promotores do receptor de glicocorticoides de camundongo, sistemas promotores do receptor de estrogênio humano, sistemas promotores retinoides, sistemas promotores da tiroide, sistemas promotores de ecdisona, sistemas promotores de mifepristona, etc.),  
 5 promotores regulados por metais (por exemplo, sistemas promotores de metalotioneína, etc.), promotores regulados relacionados com patogênese (por exemplo, promotores regulados por ácido salicílico, promotores regulados por etileno, promotores regulados por benzotiadiazol, etc.) promotores regulados pela temperatura (por exemplo, promotores induzíveis por choque térmico (por  
 10 exemplo, HSP-70, HSP-90, promotores de choque térmico da soja, etc.), promotores regulados por luz, promotores induzíveis por síntese e similares.

[265] Em alguns casos, o locus ou construto ou gene trans contendo o promotor adequado é irreversivelmente trocado através da indução de um sistema induzível. Sistemas adequados para indução de um comutador  
 15 irreversível são bem conhecidos na técnica, por exemplo, a indução de um comutador irreversível pode fazer uso de uma recombinação mediada por Cre-lox (consulte, por exemplo, Fuhrmann-Benzakein, et al., PNAS (2000)). 28: e99, cuja revelação está aqui incorporada a título de referência). Qualquer combinação adequada de recombinase, endonuclease, ligase, sítios de  
 20 recombinação, etc. conhecidos na técnica, pode ser usada na geração de um promotor irreversivelmente comutável. Os métodos, mecanismos e requisitos para realizar a recombinação específica de sítio, aqui descritos em outro local, encontram uso na geração de promotores irreversivelmente comutados e são bem conhecidos na técnica, consulte, por exemplo, Grindley et al. (2006) *Annual*  
 25 *Review of Biochemistry*, 567-605 e Tropp (2012) *Molecular Biology* (Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, MA), cujas revelações estão aqui incorporadas a título de referência.

[266] Em alguns casos, o promotor é um promotor específico de células CD8, um promotor específico de células CD4, um promotor específico de  
 30 neutrófilos ou um promotor específico de NK. Por exemplo, um promotor de gene

CD4 pode ser usado; consulte, por exemplo, Salmon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7739; e Marodon et al. (2003) *Blood* 101:3416. Como outro exemplo, um promotor de gene CD8 pode ser usado. A expressão específica para célula NK pode ser conseguida com o uso de um promotor Neri (p46);  
 5 consulte, por exemplo, Eckelhart et al. (2011) *Blood* 117:1565.

[267] Em algumas modalidades, por exemplo, para expressão em uma célula de levedura, um promotor adequado é um promotor constitutivo, tal como um promotor de ADH1, um promotor de PGK1, um promotor de ENO, um promotor de PYK1 e similares; ou um promotor regulável, como um promotor  
 10 GALI, um promotor GALIO, um promotor ADH2, um promotor PH05, um promotor CUP1, um promotor GAL7, um promotor MET25, um promotor MET3, um promotor CYCI, um promotor HIS3, um promotor ADH1, um promotor de PGK, um promotor de GAPDH, um promotor de ADCL, um promotor de TRP1, um promotor de URA3, um promotor de LEU2, um promotor de ENO, um promotor  
 15 de TP1 e AOX1 (por exemplo, para uso em *Pichia*). A seleção do vetor e promotor apropriados está bem dentro do nível do versado na técnica.

[268] Promotores adequados para uso em células hospedeiras procariotas incluem, sem limitação, um promotor de RNA polimerase do bacteriófago T7; um promotor trp; um promotor do operon lac; um promotor  
 20 híbrido, por exemplo, um promotor híbrido lac/tac, um promotor híbrido tac/trc, um promotor trp/lac, um promotor T7/lac; um promotor trc; um promotor tac e similares; um promotor araBAD; promotores regulados *in vivo*, como um promotor ssaG ou um promotor relacionado (consulte, por exemplo, Publicação de Patente nº US 20040131637), um promotor de pagC (Pulkkinen e Miller, *J. Bacteriol.*, 1991: 173(1): 86-93; Alpuche-Aranda et al., *PNAS*, 1992; 89(21): 10079-83), um promotor *nirB* (Harborne et al. (1992) *Mol. Micro.* 6:2805-2813), e similares (consulte, por exemplo, Dunstan et al. (1999) *Infect. Immun.* 67:5133-5141; McKelvie et al. (2004) *Vaccine* 22:3243-3255; e Chatfield et al. (1992) *Biotechnol.* 10:888-892); um promotor sigma70, por exemplo, um promotor de  
 25 consenso sigma70 (consulte, por exemplo, os números de acesso GenBank  
 30

AX798980, AX798961 e AX798183); um promotor de fase estacionária, por exemplo, um promotor *dps*, um promotor *spv* e similares; um promotor derivado da ilha de patogenicidade SPI-2 (consulte, por exemplo, o documento WO96/17951); um promotor *actA* (consulte, por exemplo, Shetron-Rama et al. (2002) *Infect. Immun.* 70:1087-1096); um promotor *rpsM* (consulte, por exemplo, Valdivia e Falkow (1996). *Mal. Microbial.* 22:367); um promotor *tet* (consulte, por exemplo, Hillen, W. e Wissmann, A. (1989) In Saenger, W. e Heinemann, U. (eds), *Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction*. Macmillan, London, UK, Vol. 10, páginas 143-162); um promotor SP6 (consulte, por exemplo, Melton et al. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:7035); e similares. Promotores fortes adequados para uso em procariotas, como *Escherichia coli*, incluem, sem limitação, Trc, Tac, T5, T7 e PLambda. Exemplos não limitantes de operadores para uso em células hospedeiras bacterianas incluem um operador promotor da lactose (a proteína repressora Laci muda de conformação quando colocada em contato com a lactose, impedindo assim que a proteína repressora Laci se ligue ao operador), um operador promotor do triptofano (quando complexado com triptofano, proteína repressora TrpR tem uma conformação que se liga ao operador, na ausência de triptofano, a proteína repressora TrpR tem uma conformação que não se liga ao operador) e um operador promotor *tac* (consulte, por exemplo, deBoer et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25).

[269] Uma sequência de nucleotídeos que codifica uma CAR pode estar presente em um vetor de expressão e/ou em um vetor de clonagem. Quando um CAR inclui dois polipeptídeos separados, as sequências nucleotídicas que codificam os dois polipeptídeos podem ser clonadas nos mesmos vetores ou em vetores separados. Um vetor de expressão pode incluir um marcador selecionável, uma origem de replicação e outros recursos que fornecem replicação e/ou manutenção do vetor. Vetores de expressão adequados incluem, por exemplo, plasmídeos, vetores virais e similares.

[270] Um grande número de vetores e promotores adequados são

conhecidos pelos versados na técnica; muitos estão comercialmente disponíveis para gerar construtos recombinantes de tópico. Os vetores a seguir são fornecidos a título de exemplo. Bacteriano: pBs, phagescript, PsiXI74, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, e pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Suécia). Eucariótico: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXRI, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG e pSVL (Pharmacia).

[271] Os vetores de expressão geralmente têm sítios de restrição convenientes localizados perto da sequência promotora para fornecer a inserção de sequências de ácidos nucleicos que codificam proteínas heterólogas. Um marcador selecionável operativo no hospedeiro de expressão pode estar presente. Vetor de expressão adequados incluem, sem limitação, vetores virais (por exemplo, vetores virais à base de vírus vaccinia; poliovírus; adenovírus (consulte, por exemplo, Li et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borrás et al., Gene Ther 6:515 524, 1999; Li e Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto et al., H Gene Ther 5:1088 1097, 1999; WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 e WO 95/00655); vírus adenoassociado (consulte, por exemplo, Ali et al., Hum Gene Ther 9:81 86, 1998, Flannery et al., PNAS 94:6916 6921, 1997; Bennett et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther 4:683 690, 1997, Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641 648, 1999; Ali et al., Hum Mol Genet 5:591 594, 1996; Srivastava no documento WO 93/09239, Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822-3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154-165; e Flotte et al., PNAS (1993) 90: 10613-10617); SV40; vírus herpes simplex; retrovírus gama; vírus da imunodeficiência humana (consulte, por exemplo, Miyoshi et al., PNAS 94:10319 23, 1997; Takahashi et al., J Virol 73:7812 7816, 1999); um vetor retroviral (por exemplo, Vírus da Leucemia Murina, vírus da necrose do baço e vetores derivados de retrovírus como Vírus do Sarcoma de Rous, Vírus do Sarcoma de Harvey, vírus da leucose aviária, vírus da imunodeficiência humana, vírus do sarcoma mieloproliferativo e vírus do tumor mamário); e similares.

[272] Como notado acima, em algumas modalidades, um ácido nucleico incluindo uma sequência nucleotídica que codifica o CAR condicionalmente ativo da presente revelação será, em algumas modalidades, RNA, por exemplo, RNA sintetizado *in vitro*. Os métodos para a síntese *in vitro* de RNA são conhecidos na técnica; qualquer método conhecido pode ser usado para sintetizar RNA incluindo uma sequência de nucleotídeos que codifica o CAR condicionalmente ativo da presente revelação. Os métodos para introduzir RNA em uma célula hospedeira são conhecidos na técnica. Consulte, por exemplo, Zhao et al. (2010) Cancer Res. 15:9053. A introdução de RNA incluindo uma sequência de nucleotídeos que codifica o CAR condicionalmente ativo da presente revelação em uma célula hospedeira pode ser realizada *in vitro* ou *ex vivo* ou *in vivo*. Por exemplo, uma célula hospedeira (por exemplo, uma célula NK, um linfócito T citotóxico, etc.) pode ser eletroporada *in vitro* ou *ex vivo* com RNA que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica o CAR condicionalmente ativo da presente revelação.

### Células

[273] Alguns aspectos da presente revelação incluem ou são células, em exemplos ilustrativos, células de mamífero, que são usadas como células de empacotamento para produzir vírus, como lentivírus, para transdução de células T e/ou células NK. Qualquer uma de uma grande variedade de células pode ser selecionada para a produção *in vitro* de um vírus, como um retrovírus pseudotipado, de acordo com a invenção. As células eucarióticas são tipicamente usadas, particularmente células de mamíferos incluindo células humanas, símio, caninas, felinas, equinas e de roedores. Em exemplos ilustrativos, as células são células humanas. Em outras modalidades ilustrativas, as células reproduzem indefinidamente e são, portanto, imortais. Exemplos de células que podem ser vantajosamente usadas na presente invenção incluem células NIH 3T3, células COS, células de rim canino Madin-Darby, células 293T embrionárias humanas e quaisquer células derivadas de tais células, como células gpn1slacZ φNX, que são derivadas de células 293T. Podem ser usadas

células altamente transfectáveis, como células 293T de rim embrionário humano. Por “altamente transfectável” entende-se que pelo menos cerca de 50%, mais preferencialmente pelo menos cerca de 70% e mais preferivelmente pelo menos cerca de 80% das células podem expressar os genes do DNA introduzido.

5                   [274]           Células de mamífero adequadas incluem células primárias e linhas celulares imortalizadas. As linhas celulares de mamífero adequadas incluem linhas celulares humanas, linhas celulares de primatas não humanas, linhas celulares de roedores (por exemplo, camundongos, ratos) e similares. Linhas celulares de mamífero adequadas incluem, sem limitação, células HeLa  
10                   (por exemplo, American Type Culture Collection (ATCC) nº CCL-2), células CHO (por exemplo, ATCC nº CRL9618, CCL61, CRL9096), 293 células (por exemplo, ATCC nº CRL-1573), células Vero, células NIH 3T3 (por exemplo, ATCC nº CRL-1658), células Huh-7, células BHK (por exemplo, ATCC nº CCLIO), células PC12 (ATCC nº CRL1721), Células COS, células COS-7 (ATCC nº CRL1651), células  
15                   RAT1, células L de camundongo (ATCC nº CCL1.3), células de rim embrionário humano (HEK) (ATCC nº CRL1573), células HLHepG2, Hut-78, Jurkat, HL-60, linhas celulares NK (por exemplo, NKL, NK92 e YTS) e similares.

#### MÉTODOS DE ATIVAÇÃO DE UMA CÉLULA IMUNE

                  [275]           A presente revelação fornece métodos de ativação de célula  
20                   imune *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*. Os métodos envolvem geralmente colocar uma célula imune (*in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*) em contato de com Axl e/ou Ror2, em que a célula imune foi geneticamente modificada para produzir (isto é, expressar) um CAR condicionalmente ativo da presente revelação. Na presença de Axl e/ou Ror2, o CAR condicionalmente ativo ativa a célula imune, produzindo assim uma  
25                   célula imune ativada. As células imunes incluem, por exemplo, um linfócito T citotóxico, uma célula NK, uma célula T CD4<sup>+</sup>, uma célula T reguladora (Treg), uma célula T γδ, uma célula NK-T, neutrófilos, etc. Em modalidades ilustrativas, a célula imune é uma célula T ou célula NK, em modalidades particularmente ilustrativas, a célula imune é uma célula T, que inclui células NK-T. Em tais  
30                   modalidades ilustrativas, a ativação está tipicamente ativando a atividade

citotóxica da célula T ou da célula NK. Tais métodos podem ser realizados com o uso de uma pluralidade de células imunes (por exemplo, células T ou células NK). Em outras modalidades ilustrativas, o contato envolve colocar uma célula-alvo de mamífero expressando Axl e/ou Ror2 em contato com a célula imune.

5 Esses métodos para ativação das células T ou células NK podem ser detectados pela detecção da liberação de citocinas pelas células T ou células NK, como a liberação de IFN- $\gamma$  ou IL-2, aumento da atividade citotóxica das células T e/ou células NK contra células que expressam Axl ou Ror2, aumenta na expressão intracelular de IFN $\gamma$  e/ou IL-2 nas células T ou NK e aumenta na expressão de  
10 CD107a e/ou CD69 pelas células T ou NK como medido por análise de separação de células ativada por fluorescência (FACS). Os exemplos 1, 3 e 4 fornecem aqui detalhes para alguns desses métodos de detecção da ativação de células T e/ou células NK.

[276] Outros aspectos aqui fornecidos incluem métodos para  
15 ligação de uma célula imune (por exemplo, uma célula T ou célula NK) a uma célula-alvo de mamífero, que inclui colocar a célula-alvo de mamífero em contato com a célula imune *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*, em que célula-alvo de mamífero expressa Axl e/ou Ror2 e a célula imune expressa qualquer um dos CARs aqui fornecidos que se ligam a Axl ou Ror2. Tal ligação pode ativar a célula imune.  
20 Tais métodos podem ser realizados com o uso de uma pluralidade de células imunes (por exemplo, células T ou células NK). Tais métodos de ligação, como detectados por detecção da ativação das células T ou células NK através da liberação de citocinas e aumento da atividade citotóxica, são fornecidos nos Exemplos 1, 3 e 4 aqui.

25 [277] O contato em métodos para ligação ou ativação de uma célula imune, em modalidades ilustrativas, envolve colocar a célula imune (por exemplo, célula T ou célula NK) em um microambiente a um pH inferior a 7,4. Por exemplo, o pH pode ser menor que 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8 ou 6,9, ou no intervalo de 5,8 a 7,0, em modalidades ilustrativas, no  
30 intervalo de 6,0 a 6,8, no intervalo de 6,1 a 6,9, no intervalo de 6,2 a 6,8, ou entre

6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 e 6,5 ou na extremidade inferior do intervalo, e 6,6, 6,7, 6,8 e 6,9 na extremidade superior do intervalo. Em tais modalidades ilustrativas, o CAR é qualquer um dos CAB-CARs aqui divulgados, que reconhece Axl ou Ror2 aqui fornecidos.

5           [278]       O contato da célula imunológica geneticamente modificada (por exemplo, um linfócito T, uma célula NK) com Axl e/ou Ror2 pode aumentar a produção de uma citocina pela célula imunológica em pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20 %, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 2,5 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, ou mais de 10 vezes, em comparação com a quantidade de citocina produzida pela célula imune na ausência de Axl e/ou Ror2. O contato da célula imunológica geneticamente modificada (por exemplo, um linfócito T ou uma célula NK) com Axl e/ou Ror2  
10           pode aumentar a secreção de uma citocina pela célula imune em pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20% menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 75%, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, ou mais de 10 vezes, em comparação com a quantidade de citocina segregada pela célula imune na ausência de Axl e/ou Ror2. As citocinas cuja produção pode ser aumentada incluem, sem limitação, IL-2 e IFN- $\gamma$ .  
15           20

          [279]       O contato de uma célula citotóxica geneticamente modificada (por exemplo, linfócitos T citotóxicos) com AAR pode aumentar a atividade citotóxica da célula citotóxica em pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25% cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 2,5 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, ou mais de 10 vezes, em comparação com a atividade citotóxica da célula citotóxica na ausência de Axl e/ou Ror2.  
25           30

[280] O contato de uma célula citotóxica geneticamente modificada (por exemplo, linfócitos T citotóxicos) com Axl e/ou Ror2 pode aumentar a atividade citotóxica da célula citotóxica em pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 2,5 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes 10 vezes, ou mais de 10 vezes, em comparação com a atividade citotóxica da célula citotóxica na ausência de Axl e/ou Ror2.

[281] Em outras modalidades, por exemplo, dependendo da célula imune do hospedeiro, o contato de uma célula hospedeira geneticamente modificada com um antígeno pode aumentar ou diminuir a proliferação celular, a sobrevivência celular, a morte celular e similares.

#### Métodos para criar/isolar uma região de segmentação específica de antígeno condicionalmente ativa

[282] Em modalidades ilustrativas, os receptores de antígeno anti-Axl e anti-Ror2 aqui revelados são condicionalmente ativos de modo que exibem um aumento na ligação a Axl ou Ror2 a um pH 6,7 (um pH exemplificativo de um ambiente tumoral e/ou condição *in vitro* do ensaio substituto do tumor) em comparação com 7,4 (uma condição fisiológica normal). Em algumas modalidades ilustrativas de qualquer aspecto aqui revelado, o ASTR anti-Axl ou anti-Ror2 condicionalmente ativo é identificado a partir de uma biblioteca polipeptídica inicial sem membros mutantes/em evolução da biblioteca antes de triagem/evolução e/ou sem mutação durante ou entre repetições opcionais rodadas de triagem. Em outras modalidades, o ASTR anti-Axl ou anti-Ror2 condicionalmente ativo é identificado por um método que inclui mutação/evolução e, em algumas modalidades, começa com um anticorpo do tipo selvagem. Domínios transmembranares exemplificativos e domínios de ativação intracelular podem ser quaisquer daqueles aqui revelados para CARs.

[283] Em um aspecto, é fornecido aqui um método para selecionar

um ASTR anti-Axl ou anti-Ror2 condicionalmente ativo, que compreende selecionar uma biblioteca de exibição de polipeptídeo por:

[284] a. submeter os polipeptídeos da biblioteca de apresentação do polipeptídeo a um ensaio de ligação de Axl ou Ror2 a um pH 7,4 (ou outra  
5 condição fisiológica normal) e um ensaio de ligação de Axl ou Ror2 a um pH 6,7 (ou outra condição de ensaio substituto do tumor *in vitro*); e

[285] b. selecionar um polipeptídeo que exhibe um aumento na atividade de ligação de Axl ou Ror2 a pH 6,7 em comparação com pH 7,4, ou  
outra condição de ensaio substituto de tumor *in vitro* em comparação com a  
10 condição fisiológica normal, selecionando assim a região de direcionamento específica de antígeno condicionalmente ativo.

[286] Em algumas modalidades, é realizado um único ciclo de seleção para obter a região de direcionamento anti-Axl ou anti-Ror2 condicionalmente ativa. Em certas modalidades, o método de triagem ou seleção  
15 é repetido após a identificação de anticorpos livres que se ligam ao antígeno sob condições de ensaio substituto de tumor *in vitro* e não se ligam sob condições fisiológicas, ou células expressando um anticorpo de teste que tinha essas propriedades ou fago revestido com um teste anticorpo que tem tais propriedades em uma rodada inicial ou anterior. Em alguns métodos, fagos que  
20 são coletados são usados para infectar células, que também podem ser infectadas com fago auxiliar, a fim de amplificar o fago coletado. Em outros métodos onde são testados anticorpos na superfície das células, as células coletadas podem ser cultivadas para “amplificar” os anticorpos expressos pelas células por amplificação de anticorpos nas células que codificam os  
25 polipeptídeos. Em algumas modalidades, a amplificação é realizada pelo crescimento de células que expressam os anticorpos identificados sem realizar um processo para mutar os anticorpos que codificam os anticorpos identificados entre os ciclos. Assim, os anticorpos que são coletados num ciclo anterior são então enriquecidos por células amplificadas que contêm anticorpos que  
30 codificam estes anticorpos coletados.

[287] O método de seleção ou triagem pode ser realizado uma única vez, ou repetido por 1 a 1.000 vezes. Em modalidades ilustrativas, a seleção é repetida 1 a 20 vezes ou 2 a 10 vezes ou 2 a 5 vezes.

[288] Em outros métodos, os ASTRs anti-Axl ou anti-Ror2  
5 condicionalmente ativos são gerados usando um ou mais ciclos de mutação/evolução entre rodadas de seleção. Em um método, uma proteína de tipo selvagem (por exemplo, anticorpo) é identificada, por exemplo, gerando uma biblioteca de polipeptídeos ou proteínas e pesquisando o polipeptídeo ou biblioteca de proteínas para um polipeptídeo ou proteína com uma afinidade de  
10 ligação desejada para um antígeno alvo. Em algumas modalidades em que as proteínas do tipo selvagem são anticorpos, os anticorpos do tipo selvagem podem ser revelados gerando e pesquisando bibliotecas de anticorpos policlonais ou monoclonais, incluindo bibliotecas de anticorpos de apresentação em fagos, por exemplo, bibliotecas de anticorpos humanizados para  
15 apresentação em fagos.

[289] Os ASTRs anti-Axl ou Ror2 desenvolvidos podem ser gerados submetendo a proteína do tipo selvagem, ou uma sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína de tipo selvagem, a um processo de mutagênese para produzir uma população de polipeptídeos mutantes que  
20 podem ser triados para identificar um mutante ASTR com uma atividade aumentada (por exemplo, maior afinidade de ligação ao antígeno alvo) em um ambiente tumoral e/ou em uma condição de ensaio substituto de tumor *in vitro*, em comparação com um ambiente fisiológico normal. Exemplos de tais métodos são fornecidos no documento WO2016033331 (“CONDITIONALLY ACTIVE  
25 CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS FOR MODIFIED T-CELLS”) ou na Patente nº US 8.709.755.

[290] Os ASTRs anti-Axl ou anti-Ror2 condicionalmente ativos, identificadas com o uso dos métodos aqui fornecidos, são tipicamente polipeptídeos e, mais especificamente, anticorpos polipeptídicos e, em  
30 modalidades ilustrativas, anticorpos de cadeia simples, como aqui discutido com

mais detalhe. Estes polipeptídeos podem ligar-se a Axl ou Ror2 com maior ou menor afinidade em condições de ensaio substituto de tumor *in vitro* vs. condições fisiológicas normais, mas em modalidades ilustrativas, ligam-se com maior afinidade sob condições de ensaio substituto de tumor *in vitro* do que condições normais. Em algumas modalidades, esses polipeptídeos podem ligar-se ao seu antígeno cognato com uma afinidade de 10%, 20%, 25%, 50%, 75%, 90%, 95% ou 99% maior sob condições de ensaio substituto do tumor *in vitro* do que fisiológico (isto é, normal). Em algumas modalidades, os ASTRs que identificam com o uso de métodos aqui fornecidos não se ligam aos seus antígenos cognatos sob condições fisiológicas normais a qualquer nível detectável acima dos níveis de fundo obtidos com o uso de controles negativos, como anticorpos de controle negativo.

[291] A sequência nucleotídica que codifica uma ASTR anti-Axl ou anti-Ror2 condicionalmente ativo, isolada pelo método aqui fornecido, pode ser determinada por sequenciamento de nucleotídeos da célula coletada expressando o direcionamento específico para o antígeno anti-Axl ou anti-Ror2 condicionalmente ativo. Essas informações da sequência de nucleotídeos podem, então, ser usadas para produzir um receptor de antígeno quimérico anti-Axl ou anti-Ror2 (CAB-CAR) condicionalmente ativo gerando um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende a região de direcionamento específica de antígeno anti-Axl ou anti-Ror2 condicionalmente ativo, um domínio transmembranar e um domínio de ativação intracelular. Regiões segmentares específicas de antígeno anti-Axl ou anti-Ror2 condicionalmente ativas podem ser clonadas em um sistema de expressão de construto de CAR, que pode ser usado para gerar lentivírus recombinantes que incluem o CAR em seu genoma e, então, os lentivírus recombinantes podem ser usados para transduzir células T para testar a morte de células-alvo expressando Axl ou Ror2 mediadas por CAR em um ambiente seletivo para tumores em comparação com condições fisiológicas normais, como ilustrado no Exemplo 1 aqui.

#### Métodos para gerar uma célula condicionalmente ativável

[292] A presente revelação fornece um método para gerar uma célula condicionalmente ativável. O método envolve geralmente a modificação genética de uma célula de mamífero com um vetor de expressão (por exemplo, um plasmídeo ou um vírus), ou um RNA (por exemplo, RNA transcrito *in vitro*),  
5 incluindo sequências de nucleotídeos que codificam um CAR condicionalmente ativo da presente revelação. A célula geneticamente modificada é ativável condicionalmente na presença de Axl e/ou Ror2. A modificação genética pode ser realizada *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo*. A célula é tipicamente uma célula imune (por exemplo, um linfócito T, uma célula T auxiliar ou uma célula NK), uma célula  
10 estaminal, uma célula progenitora, etc. Em modalidades ilustrativas, a célula é uma célula T.

[293] Em alguns casos, a modificação genética é realizada *ex vivo*. Por exemplo, um linfócito T, uma célula-tronco, uma célula auxiliar T ou uma célula NK é obtida de um indivíduo; e a célula obtida do indivíduo é  
15 geneticamente modificada para expressar um CAR da presente revelação. A célula geneticamente modificada é ativável condicionalmente na presença de Axl e/ou Ror2. Em alguns casos, a célula geneticamente modificada é ativada *ex vivo*. Em outros casos, a célula geneticamente modificada é introduzida em um indivíduo (por exemplo, o indivíduo de quem a célula foi obtida); e a célula  
20 geneticamente modificada é ativada *in vivo*. Por exemplo, quando Axl e/ou Ror2 estão presentes na superfície de uma célula no indivíduo, não há necessidade de administrar o antígeno. A célula geneticamente modificada entra em contato com o antígeno presente na superfície de uma célula no indivíduo e a célula geneticamente modificada é ativada. Por exemplo, quando a célula  
25 geneticamente modificada é um linfócito T, a célula geneticamente modificada pode exibir citotoxicidade em direção a uma célula que expressa Axl e/ou Ror2 em sua superfície à qual o CAR se liga.

[294] Em um aspecto, é aqui fornecido um método *ex vivo* para produzir células T ativáveis condicionalmente e/ou células NK que compreendem  
30 um receptor de antígeno quimérico (CAR) para ligação condicional de Axl ou

Ror2, em que o método compreende:

[295] a) enriquecer células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) para isolar PBMCs que compreendem células T e/ou células NK de sangue isolado;

5 [296] b) ativar células T e/ou células NK das PBMC enriquecidas sob condições eficazes;

[297] c) transduzir as células T ativadas e/ou células NK com partículas retrovirais recombinantes incompetentes para replicação sob condições eficazes, produzindo desse modo células T geneticamente  
10 modificadas e/ou células NK, em que as partículas retrovirais recombinantes incompetentes para replicação compreendem cada uma um genoma retroviral que compreende um ou mais sequências de ácidos nucleicos operativamente ligadas a um promotor ativo em células T e/ou células NK, em que uma primeira sequência de ácido nucleico de uma ou mais sequências de ácido nucleico  
15 codifica um CAB-CAR de acordo com qualquer modalidade aqui fornecida; e

[298] d) expandir as células T geneticamente modificadas e/ou as células NK, tornando assim as células T e/ou as células NK condicionalmente ativáveis.

[299] Em algumas modalidades do aspecto acima, o método inclui  
20 ainda coletar células T e/ou células NK expandidas geneticamente modificadas. Em algumas modalidades do aspecto acima, o método inclui coletar sangue de um indivíduo, antes do enriquecimento de PBMCs. Em outras modalidades, o método inclui ainda introduzir células T e/ou células NK geneticamente modificadas, coletadas e expandidas no indivíduo. Em outras modalidades, as  
25 células T e/ou células NK geneticamente modificadas estão presentes no indivíduo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 14 dias após serem introduzidas no indivíduo.

#### Coleta de Sangue

[300] As PBMCs contendo sangue podem ser coletadas obtidas de um indivíduo por qualquer método adequado conhecido na técnica. Por  
30 exemplo, o sangue pode ser coletado por punção venosa ou qualquer outro

método de coleta de sangue pelo qual uma amostra de sangue e/ou PBMCs é coletada. Em algumas modalidades, as PBMCs podem ser obtidas por aférese, como discutido abaixo.

#### Enriquecimento de PBMCs

5           [301]       Em métodos *ex vivo* para produzir células T e/ou células NK ativáveis condicionalmente, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) incluindo células T e/ou células NK, são isoladas de outros componentes de uma amostra de sangue em uma etapa de enriquecimento. O enriquecimento de PBMCs de outros componentes do sangue e células sanguíneas pode ser  
10 realizado com o uso de métodos conhecidos na técnica, por exemplo, como uso de aférese e/ou centrifugação por gradiente de densidade. Em algumas modalidades, o Ficoll-Paque (GE Healthcare) pode ser usado. Em algumas modalidades, é usado um separador automático de aférese que retira sangue do indivíduo, passa o sangue através de um aparelho que classifica um tipo de  
15 célula particular (como, por exemplo, PBMCs) e retorna o restante de volta para o indivíduo. A centrifugação em gradiente de densidade pode ser realizada após aférese. Em algumas modalidades, as PBMCs podem ser enriquecidas e isoladas usando um dispositivo de filtro de leucorredução. Em algumas modalidades, a separação de células ativadas por esferas magnéticas é então  
20 usada para purificar uma população celular específica de PBMCs, como, por exemplo, células T e/ou células NK, de acordo com um fenótipo celular (isto é, seleção positiva). Em algumas modalidades, os monócitos e/ou macrófagos podem ser removidos das PBMCs com o uso de métodos conhecidos na técnica. Com referência a um indivíduo a ser tratado, as células podem ser alogênicas  
25 e/ou autólogas. Durante o processo de enriquecimento de PBMC, uma ou mais lavagens podem ser realizadas como é conhecido na técnica, antes de as PBMCs enriquecidas serem isoladas e depois ativadas. A solução de lavagem pode qualquer solução adequada para lavar sangue e/ou PBMCs. De acordo com métodos conhecidos na técnica, as PBMC isoladas podem ser  
30 ressuspensas em qualquer meio de cultura de base adequado usado para

cultivar células T e/ou células NK. Em algumas modalidades, o meio pode ser suplementado com HSA, soro AB+ humano, soro derivado do indivíduo e/ou substituição do soro.

#### Ativação de PBMCs

5           [302]       Os métodos *ex vivo* para preparar células T e/ou células NK ativáveis condicionalmente fornecidos aqui incluem tipicamente uma etapa de ativação ou estimulação das PBMC isoladas com um ou mais agentes de ativação para gerar células T e/ou células NK ativadas. A ativação pode ser realizada em PBMCs recém-isoladas ou PBMCs previamente criopreservadas.

10   No caso de serem usadas células criopreservadas, as células podem ser descongeladas com o uso de protocolos desenvolvidos antes do uso.

          [303]       Os meios estão tipicamente presentes durante a ativação, como os conhecidos na técnica para processos *ex vivo* (como exemplos não limitativos, meio X-VIVO 15 (Lonza) ou CTS (Thermo Fisher)). Em algumas

15   modalidades, o meio pode ser suplementado com HSA, soro AB+ humano, soro derivado do indivíduo e/ou substituição de soro. Embalagem de substituição ilustrativas, o meio pode ser suplementado com substituição do soro, como a substituição do soro de CTS (Thermo Fisher). Em algumas modalidades, o meio pode ser suplementado com HSA, soro AB+ humano, soro derivado do indivíduo

20   e/ou substituição do soro.

          [304]       Qualquer combinação de um ou mais agentes de ativação pode ser adicionada ao meio para produzir células T e/ou células NK ativadas. Uma mistura de reação é tipicamente formada para realizar a ativação. Em algumas modalidades, a mistura de reação pode ser formada pela adição de um

25   ou mais agentes de ativação ao meio. Em qualquer uma das modalidades apresentadas na presente invenção, o um ou mais agentes de ativação são usados em quantidades eficazes de modo que sejam produzidas células T e/ou células NK ativadas.

          [305]       É notável que essa ativação em modalidades para produzir

30   células T e/ou células NK condicionalmente ativáveis pode envolver a ativação

das células com Axl ou Ror2, como Axl ou Rors solúveis isolados, a um pH abaixo de 7,0. No entanto, a ativação em métodos para produzir células T e/ou células NK condicionalmente ativáveis usa tipicamente agentes de ativação mais genéricos. Por conseguinte, em algumas modalidades, o agente de ativação

5 pode ser um polipeptídeo ou um anticorpo (por exemplo, anti-CD2, anti-CD3 e/ou anti-CD28) ou fragmentos funcionais dos mesmos direcionados a ou se ligam a um estimulador de células T ou molécula coestimulatória, uma citocina de células T ou qualquer outro mitógeno adequado (por exemplo, acetato de tetradecanoil forbol (TPA), fito-hemaglutinina (PHA), concanavalina A (conA),

10 lipopolissacarídeo (LPS), mitógeno de pokeweed (PWM)), um ligando a uma molécula estimuladora ou coestimuladora de células T, fosfo-antígenos ou aminobifosfonatos, como zoledronato. Vários anticorpos e fragmentos funcionais dos mesmos são conhecidos na técnica para ativar ou estimular células T e/ou células NK. Em algumas modalidades, o um ou mais anticorpos ou fragmentos

15 funcionais dos mesmos podem ser imobilizados em uma superfície sólida, como uma conta.

#### Transdução de células T e/ou células NK

[306] Os métodos *ex vivo* para preparar células T e/ou células NK ativáveis condicionalmente aqui fornecidos incluem tipicamente uma etapa de

20 transformação ou transdução de células T e/ou células NK ativadas. Em algumas modalidades de tais métodos, células T e/ou células NK são colocadas em contato *ex vivo* com vetores de expressão, como partículas retrovirais recombinantes incompetentes para replicação, para modificar geneticamente as células T e/ou as células NK. Para não ser limitado pela teoria, durante o período

25 de contato, as partículas retrovirais recombinantes incompetentes para a replicação ligam-se às células T e/ou às células NK, ponto em que as membranas das células retrovirais e do hospedeiro começam a fundir-se. Então, através do processo de transdução, o material genético das partículas retrovirais recombinantes incompetentes para replicação entra nas células T e/ou células

30 NK e é tipicamente incorporado ao DNA da célula hospedeira. Por conseguinte,

tais métodos incluem a modificação genética de células T e/ou células NK por transdução. Os métodos são conhecidos na técnica para transduzir células T e/ou células NK *ex vivo* com partículas retrovirais recombinantes incompetentes para replicação, como partículas lentivirais recombinantes incompetentes para replicação. Métodos exemplificadores são descritos em, por exemplo, Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) *Blood.* 101:1637-1644; Verhoeven et al. (2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114; e Cavalieri et al. (2003) *Blood.* 102(2): 497-505. Em algumas modalidades, as células T e/ou células NK podem ser colocadas em contato com partículas retrovirais recombinantes incompetentes para replicação. Em modalidades ilustrativas, as células T e/ou as células NK podem ser colocadas em contato com partículas lentivirais recombinantes incompetentes para replicação.

#### Expansão de células T e/ou células NK transduzidas

[307] Em modalidades ilustrativas de métodos *ex vivo* para produzir células T e/ou células NK condicionalmente ativáveis aqui fornecidas, células T e/ou células NK transduzidas são expandidas antes da coleta. Em qualquer uma das modalidades apresentadas na presente invenção, o meio está presente para a ativação e transdução e pode ser adicionalmente adicionado ou trocado após a transdução, para realizar a expansão. Em algumas modalidades, o meio pode ser adicionado à mistura de reação formada durante a ativação. Os meios usados para a expansão incluem tipicamente os mesmos meios de base usados na ativação e transdução, como aqueles conhecidos na técnica para processos *ex vivo*, especialmente para células T e/ou células NK (como exemplos não limitativos, X-VIVO 15 (Lonza) ou Optimizer CTS media (Thermo Fisher)). Em algumas modalidades, o meio pode ser suplementado com HSA, soro humano AB+, soro derivado do indivíduo e/ou substituição de soro, como a Replicação de Soro CTS (Thermo Fisher). Citocinas, como IL-2, IL-7 ou IL-15, ou aquelas encontradas em HSA podem ser adicionadas ao meio antes, durante e/ou após a ativação, transdução e expansão. A expansão celular pode ser realizada por um determinado número de dias. Em algumas modalidades, a

expansão pode ser realizada por 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21 dias. Em algumas modalidades, a expansão pode ser realizada entre 4, 5, 6, 7 ou 8 dias no limite inferior do intervalo e 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21 dias no limite superior do intervalo. Em certas modalidades ilustrativas, a expansão é realizada durante entre 6 e 12 dias, ou entre 8 e 10 dias.

#### Coleta de Células

[308] Em métodos *ex vivo* para preparar células T e/ou células NK condicionalmente ativáveis aqui fornecidas incluem tipicamente a coleta de células T e/ou células NK geneticamente modificadas após a expansão. Em algumas modalidades, as células T transduzidas e/ou as células NK podem ser concentradas ou coletadas durante a coleta com o uso de métodos conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, as células T e/ou as células NK podem ser lavadas uma ou mais vezes durante a coleta com o uso de qualquer solução de lavagem adequada conhecida na técnica. No final da coleta, as células T e/ou células NK podem ser ressuspensas em qualquer meio adequado conhecido na técnica. Em qualquer uma das modalidades apresentadas na presente invenção, a coleta das células T e/ou das células NK expandidas pode ser realizada com base nos critérios de conclusão da expansão. Em algumas modalidades, os critérios de conclusão da expansão podem ser concentração de lactato, densidade celular ou um número de dias em expansão.

[309] Em algumas modalidades, as células coletadas podem ser introduzidas, introduzidas de volta, reintroduzidas, infundidas ou reinfundidas em um indivíduo. Em algumas modalidades, as células coletadas podem ser criopreservadas como descrito abaixo antes da reintrodução em um indivíduo. Em modalidades ilustrativas, as células coletadas são introduzidas, introduzidas de volta, reintroduzidas, infundidas ou reinfundidas em um indivíduo sem primeiro criopreservar as células. O indivíduo é tipicamente o mesmo indivíduo do qual o sangue foi coletado.

[310] Ao longo desta revelação, uma célula T transduzida e/ou

uma célula NK inclui a progênie das células transduzidas que retêm pelo menos um dos ácidos nucleicos que são incorporados na célula durante a transdução *ex vivo*. Nos métodos aqui descritos que recitam a reintrodução de uma célula transduzida, será entendido que tal célula tipicamente não está em um estado transduzido quando é coletada do sangue de um indivíduo.

#### Introdução/Reintrodução de Células

[311] Em certas modalidades dos métodos *ex vivo* para produzir células T e/ou células NK condicionalmente ativáveis reveladas aqui, as células T e/ou células NK coletadas podem ser introduzidas, introduzidas de volta, reintroduzidas, infundidas ou reinfundidas em um indivíduo para um efeito terapêutico. O número de células T e/ou células NK a serem reintroduzidas pode ser uma dose predeterminada, que pode ser uma dose terapeuticamente eficaz. Em algumas modalidades, a dose predeterminada pode depender do CAR que é expresso nas células (por exemplo, a afinidade e densidade da região de direcionamento específica do antígeno expressa na célula T transduzida e/ou na célula NK), o tipo de célula-alvo, a natureza da doença ou condição patológica a ser tratada, ou uma combinação. Em algumas modalidades, a dose predeterminada de células coletadas pode basear-se na massa de um indivíduo, por exemplo, células por quilograma do indivíduo (células/kg).

#### Criopreservação de Células

[312] Em métodos *ex vivo* para produzir células T e/ou células NK condicionalmente ativáveis aqui fornecidas, as células coletadas produzidas pelos métodos aqui descritos podem ser criopreservadas a uma dose predeterminada para uso posterior. Métodos e reagentes para criopreservar células são bem conhecidos na técnica. A criopreservação pode incluir uma ou mais lavagens e/ou uma etapa de concentração das células T e/ou das células NK. O método também pode incluir uma etapa de formação de uma mistura de criopreservação, que inclui as células T e/ou células NK na solução de diluente e uma solução criopreservada adequada. Em algumas modalidades, o método pode incluir uma etapa de congelamento da mistura de criopreservação, como é

conhecido na técnica. Métodos de descongelamento de células T e/ou células NK criopreservadas são conhecidos na técnica.

Métodos para modular a atividade das células T e/ou NK que expressam cab-car alterando o pH

5                   [313]       São aqui fornecidos, em certos aspectos, métodos para modular a ativação de uma célula imune (por exemplo, célula T ou célula NK) colocar a célula imune em contato com Axl ou Ror2 em um microambiente a um pH abaixo de 7,0 (por exemplo, abaixo de 6,9 ou 6,8) e depois alterando o pH do microambiente, de modo a que esteja igual ou superior a 7,0 (por exemplo, acima 10 de 7,1, 7,2 ou 7,3), em que a célula imune expressa qualquer um dos CAB-CARs aqui fornecidos. Em modalidades ilustrativas, o Axl ou Ror2 é expresso na superfície de uma célula-alvo de mamífero. Em certas modalidades, tais métodos para modular a ativação são idênticos aos métodos para ativar uma célula imune aqui fornecida, que compreende ainda a etapa adicional de aumentar o pH do 15 microambiente até um pH igual ou superior a 7,0 (por exemplo, acima de 7,1, 7,2 ou 7,3), diminuindo assim a ativação da célula imune. Em modalidades ilustrativas, esse aumento no pH desativa a célula imune.

                  [314]       São aqui fornecidos, em certos aspectos, métodos para modular a ligação e a lise/morte resultante de uma célula-alvo por uma célula T 20 ou célula NK expressando CAB-CAR, causando uma alteração ou mudança no pH dentro de um microambiente que inclui uma célula-alvo dentro um tecido-alvo ou dentro de um ou mais tecidos não alvo (por exemplo, saudáveis/normais), modulando a ligação do CAB-CAR ao seu antígeno cognato em uma célula-alvo (ou células-alvo), em que o antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um 25 epítipo do mesmo ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo. Tais métodos incluem tipicamente colocar uma célula-alvo, como uma célula de mamífero (por exemplo, uma célula humana) em contato com uma célula T ou célula NK que expressa CAB em um microambiente e depois alterar o pH do microambiente, diminuindo ou mais tipicamente aumentando o pH. O 30 microambiente pode ser um microambiente alvo, por exemplo, um tumor, ou um

microambiente fora do alvo, onde a ligação fora do alvo pode causar efeitos colaterais. Em algumas modalidades, esses métodos podem fornecer uma redução transitória da ligação ao alvo de CAR-T sensível ao microambiente tumoral.

5           [315]           Consequentemente, em um aspecto, é aqui fornecido um método para modular a ligação de uma célula T ou célula NK que expressa o receptor de antígeno quimérico biológico (CAB-CAR) condicionalmente ativo a uma célula que expressa um antígeno cognato do CAB-CAR em um indivíduo, que inclui o seguinte:

10           [316]           a. introduzir uma célula T e/ou célula NK que compreende um ácido nucleico que codifica o CAB-CAR no indivíduo, em que após (e opcionalmente e/ou durante) a introdução, a célula T e/ou a célula NK que compreende o ácido nucleico que codifica o CAB-CAR expressa o CAB-CAR e liga-se à célula que expressa o antígeno cognato no indivíduo, em que o  
15           antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo; e

                  [317]           b. administrar um agente farmacológico ao indivíduo em quantidade suficiente para aumentar o pH sanguíneo e/ou o pH de um tecido e/ou pH de um microambiente, em que a administração é realizada antes,  
20           durante ou após a introdução e em que o pH aumentado do sangue, do tecido e/ou do microambiente modulam a ligação da célula T e/ou célula NK que expressa CAB-CAR à célula que expressa o antígeno cognato no sangue, no tecido ou no microambiente com o aumento do pH.

                  [318]           A alteração/deslocamento do pH em aspectos que incluem  
25           uma etapa de administração de um agente farmacológico modulador de pH da presente revelação pode ser conseguida expondo células/tecido-alvo ou não alvo a um agente farmacológico modulador de pH, como administrando o agente farmacológico de modulação de pH para um indivíduo. Exemplos não limitantes de agentes farmacológicos moduladores do pH são aqui fornecidos. Em certos  
30           aspectos, é fornecido aqui um agente farmacológico para uso em um método

para modular a ligação de um CAB-CAR ao seu antígeno cognato ou para modular a ligação de uma célula T e/ou célula NK expressando CAB-CAR a uma célula que expressa seu antígeno cognato ou para reduzir ou aliviar o alvo da toxicidade do tumor em um indivíduo. Tais aspectos, em certas modalidades, se referem ao tratamento do crescimento de tumores, câncer, hiperplasia ou distúrbios proliferativos das células.

[319] Em outros aspectos, é fornecido aqui o uso de um agente farmacológico modulador de pH para uso na fabricação de um medicamento ou um kit para controlar a ligação de uma célula T e/ou célula NK geneticamente modificada a uma célula-alvo de mamífero em um indivíduo *in vivo*, em que a célula-alvo expressa um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo. Em outros aspectos, é fornecido aqui um kit que inclui um recipiente contendo uma partícula retroviral recombinante incompetente para replicação e instruções para seu uso para realizar um método para tratar o crescimento tumoral, em que as instruções instruem um método para controlar a ligação de uma célula T e/ou célula NK a uma célula-alvo de mamífero por modulação do pH, em que a célula-alvo de mamífero expressa um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo. Tal método pode ser qualquer um dos métodos aqui fornecidos para modular a ligação de células T e/ou células NK que expressam CAB-CAR e/ou atividade por alteração do pH. O recipiente que contém as partículas retrovirais recombinantes pode ser um tubo, frasco, poço de uma placa ou outro recipiente para armazenamento de uma partícula retroviral recombinante e/ou um agente farmacológico modulador de pH. Qualquer um desses pode ser de resistência e grau industrial. O kit pode incluir dois ou mais recipientes em certas modalidades. Um recipiente/vaso pode incluir as partículas retrovirais recombinantes e outro recipiente/vaso pode incluir um agente farmacológico modulador de pH. Em tais métodos, o agente farmacológico é distribuído/administrado em quantidade suficiente para aumentar o pH sanguíneo e/ou um pH tecidual e/ou um pH do microambiente

para modular a ligação do CAB-CAR de uma célula T modificada/recombinante e/ou célula NK expressando o CAB-CAR, ao seu antígeno cognato no sangue e/ou tecido com o aumento do pH. Detalhes exemplificativos não limitativos são fornecidos aqui para administrar um agente farmacológico modulador de pH em  
5 quantidade suficiente e por um tempo suficiente.

[320] As células-alvo, seja no alvo ou fora do alvo em relação a um tecido, podem ser colocadas em contacto com um agente de modulação de pH, tal como um agente farmacológico modulador de pH, depois de introduzir o CAB-CAR em um indivíduo. Consequentemente, os aspectos exemplificativos  
10 fornecidos aqui para modulação da ligação e/ou atividade citotóxica de uma célula T que expressa CAB que tem capacidade de se ligar a (isto é, reconhece) um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo, por exemplo, para aliviar a atividade do tumor-alvo e/ou para inibir a proliferação celular alvo, como proliferação de células tumorais, pode  
15 incluir as seguintes etapas:

[321] a. introduzir uma célula T e/ou célula NK que compreende um ácido nucleico que codifica um CAB-CAR em um indivíduo em que após a introdução, a célula T e/ou a célula NK que compreende o ácido nucleico que codifica o CAB-CAR expressa o CAB-CAR, em que o CAB-CAR tem a  
20 capacidade de se ligar ao polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou a um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo, e opcionalmente se liga à célula que expressa o antígeno cognato no indivíduo; e

[322] b. administrar um agente farmacológico ao indivíduo em quantidade suficiente para aumentar o pH sanguíneo e/ou um pH tecidual e/ou  
25 um pH do microambiente para modular a ligação da célula T e/ou célula NK que expressa CAB-CAR a células que expressam o antígeno cognato do CAB-CAR, no sangue, no tecido ou no microambiente com o aumento do pH. Será entendido que, dependendo do método específico usado para introduzir o ácido nucleico que codifica o CAB-CAR na célula T e/ou na célula NK, a célula T e/ou  
30 a célula NK pode ou não expressar o CAB-CAR antes de o mesmo ser

introduzido no indivíduo. No entanto, em algum momento após a introdução no indivíduo, por exemplo, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas, 1 dia, 2 dias, 4 dias e/ou 7 dias, ou mais, as células T e/ou células NK que incluem o ácido nucleico que codifica o CAB-CAR, expressam o CAB-CAR. Então, tais células tipicamente se ligam a uma célula-alvo que expressa o antígeno cognato para o CAB-CAR.

[323] Os métodos aqui fornecidos para modificar geneticamente e expandir opcionalmente os linfócitos de um indivíduo podem ser usados para introduzir uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um CAB-CAR no genoma de uma célula T e/ou célula NK do indivíduo para produzir uma célula T e/ou célula NK com capacidade de expressar o CAB-CAR e, depois, introduzir as células T e/ou as células NK com capacidade de expressar o CAB-CAR no indivíduo, em que, após a introdução, a célula T e/ou célula NK expressa o CAB-CAR para colocar o CAB-CAR em contato com células/tecido-alvo. A presente revelação fornece detalhes de como realizar tais métodos, juntamente com várias alternativas para diferentes componentes de CAR, qualquer dos quais pode ser usado em aspectos da revelação que incluem mudança de pH para modular a ligação de uma célula T e/ou célula NK expressando CAB-CAR a uma célula-alvo expressando um antígeno cognato para o CAB-CAR.

[324] Tais métodos para modificar e expandir geneticamente linfócitos envolvem tipicamente colocar células T e/ou células NK em contato com uma partícula retroviral recombinante incompetente para replicação, para transduzir as células T e/ou células NK. Tal contato tipicamente ocorre *ex vivo* após a remoção dos linfócitos do indivíduo. As células T e/ou as células NK são então introduzidas/reintroduzidas no indivíduo, tipicamente de quem foram removidas. A partícula retroviral recombinante incompetente para replicação inclui um genoma com um polinucleotídeo que codifica o CAB-CAR. Muitas modalidades alternativas e outros detalhes relativos a essa partícula retroviral recombinante incompetente para replicação são fornecidas em outras seções aqui e podem ser usadas em métodos aqui fornecidos para regulação da ligação e lise/morte resultantes de células T que expressam CAR de CAB com

capacidade de se ligarem a um polipeptídeo axl ou um epítopo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítopo do mesmo, modulando o pH em um microambiente de uma célula que expressa um polipeptídeo alvo cognato reconhecido pelo CAB-CAR de um modo dependente do pH.

5           [325]       Tais modos para modular a ligação de uma célula-alvo por uma célula T e/ou uma célula NK expressando CAB-CAR podem ser usados, por exemplo, para reduzir a toxicidade fora do tumor-alvo aumentando o pH do sangue e/ou um tecido (ou tecidos) tumoral dentro do indivíduo. Por exemplo, em uma situação em que um pH “normal” do tecido dentro de um indivíduo torna-se transitoriamente mais baixo, um agente de modulação do pH pode ser  
10       administrado de uma maneira onde o pH do tecido normal é aumentado enquanto o pH do tumor permanece mais baixo e ainda a um pH onde a célula T e/ou célula NK que expressa CAB-CAR se liga a uma célula tumoral alvo. Nessas modalidades, o agente de modulação de pH pode ser distribuído a uma  
15       concentração mais baixa ou de um modo direcionado ao tecido normal.

          [326]       Em algumas modalidades, isso pode ser conseguido enquanto se permite que o pH dentro do microambiente tumoral permaneça suficientemente baixo para que uma célula T e/ou célula NK de CAB-CAR se ligue às células cognatas que expressam o alvo dentro do tumor. Em aspectos  
20       ilustrativos dos métodos aqui fornecidos, o pH de um tecido permanece a um pH sob o qual uma célula T e/ou uma célula NK expressando CAB-CAR se liga ao seu alvo por um período de tempo suficiente para que uma célula T e/ou célula NK que expressa CAB-CAR entre em contato e se ligue a uma célula que expressa seu antígeno cognato (por exemplo, 2, 4, 8, 12 ou 24 horas, ou 2, 4, 7,  
25       14, 28 ou 30 dias, ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 meses ou mais) e, em seguida, o pH é trocado/alterado, por exemplo, aumentando o pH do tecido a uma magnitude tal que afete a ligação de células T e/ou células NK que expressam CAB-CAR a uma célula-alvo.

          [327]       Consequentemente, é fornecido no presente documento, em  
30       um aspecto, um método para a redução transitória da ligação ao alvo de células

CAR-T sensível ao microambiente tumoral através de modificação farmacológica do pH vascular e do tecido, em que a célula CAR-T expressa um CAB-CAR que tem capacidade de se ligar a um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo. Esses ASTRs

5 microambientalmente controlados nas células CAR-T fornecem um nível adicional de proteção contra a toxicidade tumoral não alvo, exigindo condições ambientais locais do tumor para permitir o envolvimento das células T. Embora atraente para algumas terapias de anticorpo monoclonal, a terapia celular adotiva pode criar ambientes locais que são transitoriamente permissivos para

10 seus alvos de CAR-T. Por exemplo, as células CAR-T ativadas em tecidos com pH baixo podem reduzir ainda mais o pH do microambiente, dependendo dos domínios citoplasmáticos presentes no construto de CAR. Em outros casos, a síndrome de liberação de citocinas e outras morbidades associadas à terapia celular adotiva podem resultar em perda da capacidade tamponante de

15 bicarbonato do sangue, levando à acidose láctica. Foi estabelecido que terapias celulares adotivas administradas por infusão intravenosa resultam em retenção pulmonar temporária. Para algumas terapias celulares, a taxa de infusão requer monitoramento constante do oxigênio dissolvido (Fischer et al. *Stem Cells Dev.* Junho de 2009; 18(5): 683-691). A extensão do aprisionamento pulmonar

20 depende do tamanho da célula, do estado de ativação, da dose celular e da taxa de infusão. Cruz et al (*Cytotherapy*. Outubro de 2010; 12(6): 743–749) relatam as constatações adversas de mais de 300 infusões de células T, que doses baixas e infusão lenta podem reduzir o aprisionamento pulmonar. Entretanto, com certas células CAR-T de alta potência, os alvos apresentam-se mesmo em

25 baixos níveis no endotélio pulmonar, como o Her2 (Morgan et al. *Mol Ther.* abril de 2010; 18(4): 843–851), pode resultar em toxicidade imediata que não pode ser controlada e resulta em rápida deterioração do paciente devido à alta concentração celular inicial de CAR-T no pulmão após a infusão e a presença do alvo de célula T nesses tecidos. Em outros casos, a presença de alvos de células

30 T em outros tecidos-alvo, como o duto biliar, pode criar um alvo fora das

toxicidades tumorais que não podem ser controladas (Lamers *Mol Ther.* Abril de 2013;21(4):904-12) e resultam em toxicidade grave de órgãos antes que outros agentes como esteroides ou epítomos de eliminação celular possam ser usados. Embora o plasma arterial e venoso tenha uma forte capacidade tamponante

5    contra a acidose, podem ocorrer estados de acidose respiratória, choque, acidose metabólica e acidose isquêmica em pacientes com câncer tratados com terapia celular adotiva.

[328]        Em alguns aspectos aqui fornecidos, a ligação de um CAB-CAR em um indivíduo pode ser modulada por administração de um agente

10    farmacológico ao indivíduo para aumentar ou diminuir o pH do sangue, um tecido e/ou um microambiente. Em alguns aspectos, a toxicidade tumoral não alvo no alvo pode ser aliviada em um indivíduo por administração de um agente farmacológico ao indivíduo para aumentar ou diminuir o pH do sangue e/ou o pH de um tecido e/ou o pH de um microambiente. Em alguns aspectos, a ligação de

15    uma célula T e/ou célula NK a uma célula-alvo de mamífero pode ser controlada pela introdução de um agente farmacológico para aumentar ou diminuir o pH do sangue e/ou o pH de um tecido e/ou o pH de um microambiente. Em alguns aspectos, a ligação de uma célula T e/ou célula NK geneticamente modificada a uma célula-alvo de mamífero em um indivíduo *in vivo* pode ser controlada por

20    administração de um agente farmacológico modulador de pH ao indivíduo. Em modalidades ilustrativas, o agente farmacológico pode aumentar o pH do sangue e/ou o pH de um tecido e/ou o pH de um microambiente. Em algumas modalidades, o microambiente pode ser um microambiente *in vivo*. Em modalidades ilustrativas, o microambiente pode ser um microambiente tumoral.

25    Em algumas modalidades, o microambiente pode incluir uma célula-alvo de mamífero, em que a célula-alvo de mamífero expressa o antígeno alvo na sua superfície. Em algumas modalidades, a administração de um agente farmacológico a um indivíduo pode aumentar o pH do sangue, um tecido e/ou um microambiente de um pH inferior a 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6,

30    6,7, 6,8 ou 6,9 a um pH de pelo menos 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4,

7,5 ou 7,6, em que o pH do sangue, tecido e/ou microambiente inferior antes de administrar o agente farmacológico do que depois de administrar o agente farmacológico. Em algumas modalidades, a administração de um agente farmacológico a um indivíduo pode diminuir o pH do sangue, um tecido ou um microambiente de um pH superior a 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, ou 7,6 a um pH inferior a 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ou 7,0, em que o pH do sangue, tecido e/ou microambiente é mais elevado antes de administrar o agente farmacológico do que depois de administrar o agente farmacológico. Em algumas modalidades, a administração de um agente farmacológico a um indivíduo pode causar uma alteração do pH no indivíduo no sangue, em um tecido e/ou em um microambiente. Em algumas modalidades, o desvio de pH pode ser pelo menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7 ou 1,8 unidade de pH em qualquer direção, isto é, um aumento ou diminuição do pH após a administração do agente farmacológico em relação ao pH antes da administração do agente farmacológico. Em modalidades ilustrativas, o desvio do pH é um aumento no pH.

[329] Os CAB-CARs da presente revelação podem ter reduzida ligação ao seu antígeno cognato a um pH do que a um pH diferente. Em modalidades ilustrativas em que os valores de pH ilustrativos para ligação diferencial de um CAB-CAR não são já fornecidos no aspecto mais amplo e alternativamente para outras modalidades em vez dos valores para tais aspectos, o CAB-CAR pode ter uma ligação reduzida a um pH mais elevado do que a um pH mais baixo. Por exemplo, o CAB-CAR pode ter ligação reduzida ao seu antígeno cognato a um pH acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ou 7,5 do que em um pH abaixo de 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ou 7,0. Em outras modalidades, o CAB-CAR pode ter uma ligação reduzida a um pH mais elevado do que a um pH mais baixo. Por exemplo, o CAB-CAR pode ter ligação reduzida ao seu antígeno cognato a um pH abaixo de 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ou 7,0 do que a um pH acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ou 7,5. Em algumas modalidades ilustrativas, o CAB-CAR exibe ligação aumentada a um pH de 6,5 a 6,7 em comparação com

pH 7,4 a 7,6. Em outras modalidades ilustrativas, o CAB-CAR exibe ligação aumentada a um pH de 6,7 em comparação com um pH de 7,4. Em outras modalidades, o CAB-CAR exibe ligação aumentada no pH de um tumor em comparação com o pH do sangue. Em algumas modalidades, o CAB-CAR pode incluir uma região de direcionamento específica do antígeno, um stalk e um domínio de ativação intracelular. Em algumas modalidades, o CAB-CAR também pode incluir um domínio coestimulador. Em algumas modalidades, o CAB-CAR pode se ligar a um antígeno associado ao tumor. Em algumas modalidades, o CAB-CAR liga-se a um polipeptídeo Axl ou a um epítipo do mesmo ou a um polipeptídeo Ror2 ou a um epítipo do mesmo.

[330] Em métodos que incluem a modulação do pH do sangue, um tecido ou um microambiente, o pH do microambiente pode ser aumentado de um pH abaixo de 7,0 para um pH acima de 7,0. Por exemplo, o pH pode ser aumentado a partir de um pH abaixo de 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ou 7,0 para um pH acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 ou 7,4. Em algumas modalidades, o CAB-CAR pode se ligar ao antígeno cognato no aumento do pH, mas não no pH do microambiente antes da introdução do agente farmacológico. Em certas modalidades, o pH pode ser aumentado de abaixo de 7,0 para um pH de 7,1 a 8,0 ou para um pH de 7,1 a 7,8 ou para um pH de 7,2 a 7,8 ou um pH de 7,2 a 7,6 ou um pH de 7,3 a 7,6 ou a um pH de 7,4 a 7,8 ou a um pH de 7,4 a 7,6. Tal aumento no pH pode ocorrer por menos de 1, 2, 4, 6, 8, 12 ou 24 horas ou por mais de 1, 2, 4, 6, 8, 12 ou 24 horas, dependendo do tipo e dose de agente farmacológico administrado. Em certas modalidades, o agente farmacológico administrado é tal modo que o pH permanece acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ou 7,5; ou entre 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 no limite inferior do intervalo e 7,4, 7,5, 7,6, 7,7 ou 7,8 no limite superior do intervalo, no tecido-alvo, tal como um tumor e, por exemplo, em pelo menos uma superfície de um microambiente de tecido-alvo (por exemplo, tumor), em pelo menos uma porção de um microambiente de tecido-alvo (por exemplo, tumor), e em modalidades ilustrativas ao longo de um microambiente de tecido-alvo (por exemplo, tumor). O microambiente pode ser

um microambiente *in vivo*, como um tumor, um tecido, um tecido não tumoral, um tecido normal ou um tecido que sofreu uma alteração transitória do pH. Por exemplo, os tecidos que tipicamente sofrem alterações transitórias do pH incluem um tecido muscular em condições anaeróbicas ou tecido muscular submetido a exercício ou um tecido inflamado ou um tecido a experimentar inflamação. Em algumas modalidades que incluem uma célula-alvo de mamífero, a célula-alvo de mamífero pode ser uma célula tumoral ou uma célula não tumoral ou normal.

[331] Em alguns aspectos, são fornecidos métodos para aumentar transientemente o pH vascular para reduzir a afinidade de CAB-CARs microambientalmente controlados que reconhecem, têm a capacidade de se ligar e, em algumas modalidades, se ligam um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo. Um desvio de 0,4U no pH do sangue pode reduzir a afinidade de certos scFvs que formam uma porção de um CAB-CAR, por seu antígeno cognato em mais de 10 vezes. Em algumas modalidades, o controle terapêutico do pH pode ser conseguido através de vias de administração IV ou oral de vários agentes farmacológicos. Por exemplo, em algumas modalidades, a inativação da afinidade de ligação pode ser alcançada com bicarbonato ou bicarbonato de sódio. Em outras modalidades, Tris-hidroximetilaminometano (também conhecido como trometamina, trometamol e THAM) e/ou Carbicarb™ (uma solução hipertônica equimolar de bicarbonato de sódio e carbonato de sódio) podem ser usados para aumentar o pH do sangue em uma quantidade suficiente para aliviar eliminar toxicidades tumorais. Ainda em outras modalidades, Inibidores da bomba de prótons de pequenas moléculas podem ser usados para aumentar o pH do sangue e/ou o pH do tecido em quantidade suficiente para aliviar as toxicidades tumorais no alvo. Inibidores da bomba de prótons que podem ser usados em métodos que incluem pH modulante incluem, mas sem limitação, esomeprazol (Nexium), esomeprazol e naproxeno (Vimovo), lansoprazol (Prevacid), omeprazol (Prilosec e Zegerid) e rabeprazol (Aciphex). A administração de

inibidores da bomba de prótons pode ser utilizada eficazmente ao longo de períodos de tempo mais longos para modular a afinidade de ligação do domínio de ligação do antígeno ao seu antígeno cognato durante dias, semanas, meses ou anos. Em outras modalidades, a afinidade do domínio de ligação ao antígeno pelo seu antígeno cognato pode ser modulada alterando o pH do sangue e/ou o pH do tecido controlando a transcrição, tradução, expressão da membrana e estabilidade de transportadores e bombas. Exemplos de tais transportadores e bombas cuja expressão alterada pode ser modular o pH incluem, sem limitação, bombas de prótons, membros da família de troca de prótons de sódio (NHE), família de transportadores de bicarbonato (BCT) e família transportadora de monocarboxilato.

[332] Em certas modalidades, um agente farmacológico modulador de pH, como, por exemplo, bicarbonato, THAM ou Caricarb™ administrado antes ou concomitantemente com a infusão de células CAR-T de um paciente que expressam ASTRs biológicos condicionalmente ativos (por exemplo, scFvs ou scFvFc). Tal tratamento aliviará a citotoxicidade imediata que está de outra forma associada ao encarceramento pulmonar temporário de infusões de células CAR-T. Consequentemente, em certos aspectos, é fornecido neste documento um método para reduzir a citotoxicidade causada ao tecido saudável normal de um sujeito pela administração de um agente farmacológico ao sujeito em quantidade suficiente para aumentar o pH do sangue e/ou um pH do tecido e / ou um pH do microambiente; e concomitante ou subsequentemente (por exemplo, 1, 2, 4, 6, 8, 12 ou 24 horas, ou 1, 2, 3, 4 ou 7 dias mais tarde) introduzindo uma célula T expressando CAB-CAR ou NK célula no indivíduo. Em certas modalidades, em um tempo alvo após tal introdução (por exemplo, 1, 2, 4, 6, 8, 12, ou 24 horas, ou 1, 2, 3, 4 ou 7 dias depois), a administração do agente farmacológico é terminada por um período de tempo ou indefinidamente, de modo a alterar o pH do sangue, um tecido ou um microambiente do indivíduo e modular a ligação/atividade das células T que expressam CAB-CAR.

[333] Podem ser utilizados vários regimes de dosagem eficazes

para administrar os agentes farmacológicos com capacidade de modular o pH (por exemplo, aumentando o pH sanguíneo e/ou um pH do tecido e/ou o pH de um microambiente em um indivíduo), como será entendido por um versado na técnica. Aqui, a administração pode referir-se a administrar um agente farmacológico a um indivíduo, incluindo a injeção de um agente farmacológico por via intravenosa em um indivíduo ou a administração de uma dose oral de um agente farmacológico a um indivíduo ou a um indivíduo que tome um agente farmacológico. Os agentes farmacológicos podem ser administrados ao sujeito ou paciente durante vários períodos de tempo, por exemplo, pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 semanas; 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15 ou 18 meses; ou 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 ou 5 anos ou indefinidamente. Em algumas modalidades, o agente farmacológico pode ser bicarbonato, bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) ou uma solução de bicarbonato de sódio e carbonato de sódio e uma dose parenteral ou IV pode ser: 0,2 x peso do indivíduo (kg) x déficit de base do indivíduo;  $\text{HCO}_3^-$  (mEq) necessário =  $0,5 \times \text{peso (kg)} \times [24 - \text{HCO}_3^- \text{ sérico (mEq/L)}]$ ; ou 2 a 5 mEq/kg de infusão IV durante 4 a 8 horas. Em algumas modalidades, podem ser usados esquemas de dosagem padrão de bicarbonato, bicarbonato de sódio ou uma solução de bicarbonato de sódio, dependendo da gravidade da acidose. Por exemplo, 50 a 150 mEq de bicarbonato diluído em 1 L de dextrose a 5% em água podem ser administrados via IV a uma taxa de 1 a 1,5 l/hora. Em outro exemplo não limitativo, 90 a 180 mEq de bicarbonato diluído em 1 l de dextrose a 5% em água podem ser administrados via IV a uma taxa de 1 a 1,5 l/hora. Em algumas modalidades em que o agente farmacológico é bicarbonato ou bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), uma dosagem entérica ou oral pode ser, por exemplo, 325 a 2.000 mg de bicarbonato de sódio dado a um indivíduo 1 a 4 vezes/dia.

[334] Em algumas modalidades, o agente farmacológico pode ser tris-hidroximetilaminometano (também conhecido como trometamina, trometamol e THAM) e uma dosagem parenteral ou IV pode ser estimada como:

Solução de trometamina (ml de 0,3 M) necessária = Peso Corporal (kg) x Déficit

de Base (mEq/litro) x 1,1. Em algumas modalidades, a dosagem IV de tris-hidroximetilaminometano pode ser estimada a partir do déficit da base tampão do fluido extracelular em mEq/l, como determinado por meio do nomograma de Siggaard-Andersen. Em algumas modalidades, a dose inicial pode ser de 500 ml (150 mEq) de tris-hidroximetilaminometano injetado por infusão IV lenta com até 1.000 ml, em que a dose máxima é de 500 mg/kg (227 mg/lb) durante um período não inferior a uma hora.

[335] Em algumas modalidades, o agente farmacológico pode ser um inibidor da bomba de prótons de molécula pequena e pode ser administrado por extensões de tratamento prolongadas. Por exemplo, o inibidor da bomba de prótons de molécula pequena pode ser administrado durante pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 semanas; 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15 ou 18 meses; ou 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 ou 5 anos ou indefinidamente. Em algumas modalidades, o inibidor da bomba de prótons pode ser esomeprazol (Nexium) e 20 mg ou 40 mg de esomeprazol pode ser administrado por via oral uma ou duas vezes ao dia. Em algumas modalidades, o inibidor da bomba de prótons pode ser uma combinação de esomeprazol e naproxeno (Vimovo) e 20 mg de esomeprazol com 375 ou 500 mg de naproxeno pode ser administrado por via oral duas vezes ao dia. Em algumas modalidades, o inibidor da bomba de prótons pode ser lansoprazol (Prevacid) e 15, 30 ou 60 mg de lansoprazol podem ser administrados por via oral uma ou duas vezes ao dia. Em algumas modalidades, O lansoprazol pode ser administrado por via intravenosa com 30 mg de lansoprazol injetado durante 30 minutos uma vez ao dia por até 7 dias. O indivíduo pode então mudar para o lansoprazol oral e continuar o tratamento. Em algumas modalidades, o inibidor da bomba de prótons pode ser omeprazol (Prilosec e Zegerid) e 10, 20 ou 40 mg de omeprazol podem ser administrados oralmente uma ou duas vezes por dia. Em algumas modalidades, o inibidor da bomba de prótons pode ser rabeprazol (Aciphex) e 20 ou 60 mg de rabeprazol podem ser administrados oralmente uma ou duas vezes por dia ou 100 mg de rabeprazol pode ser administrado oralmente uma vez por dia. Em qualquer uma

das modalidades aqui reveladas, os agentes farmacológicos podem ser usados em combinação entre si.

[336] Em qualquer uma das modalidades aqui descritas, o pH do sangue, tecido e/ou microambiente de um indivíduo pode ser medido antes, durante ou após a administração de um agente farmacológico. Em algumas modalidades, a decisão de administrar ou continuar a administrar a um indivíduo o agente farmacológico para aumentar ou diminuir o pH pode basear-se na medição do pH do sangue, tecido e/ou microambiente do indivíduo. Métodos para medir o pH do sangue e/ou os níveis de bicarbonato do sangue de um indivíduo são bem conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, tomografia por emissão de pósitrons (PET), espectroscopia de ressonância magnética (MRS), ressonância magnética (MRI) e imagem óptica podem ser usados para medir o pH *in vivo* em microambientes, por exemplo, em tumores (para detalhes de medição do pH do tumor, consulte: Zhang X, Lin Y, Gillies RJ. Tumor pH and its measurement. J Nucl Med. agosto de 2010;51(8):1167-70).

[337] Em um outro aspecto, é fornecido aqui um método para aliviar a toxicidade do tumor-alvo em um indivíduo, que inclui o disposto a seguir:

[338] a. introduzir um polinucleotídeo que codifica um receptor de antígeno quimérico biológico condicionalmente ativo (CAB-CAR) em uma célula T ou célula NK do indivíduo para produzir uma célula T e/ou célula NK com capacidade de expressar o CAB-CAR, em que o CAB-CAR tem a capacidade de se ligar a um polipeptídeo Axl ou a um epítipo do mesmo, ou a um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo;

[339] b. introduzir a célula T e/ou célula NK com capacidade de expressar o CAB-CAR no indivíduo, em que a célula T e/ou a célula NK expressam o CAB-CAR no indivíduo; e

[340] c. administrar um agente farmacológico ao indivíduo em quantidade suficiente para aumentar o pH sanguíneo e/ou o pH de um tecido e/ou pH de um microambiente para modular a ligação do CAB-CAR ao seu antígeno cognato no sangue, no tecido e/ou o microambiente com o aumento do

pH, aliviando assim o alvo da toxicidade do tumor no indivíduo.

[341] Na etapa de introdução, a célula T ou célula NK tem a capacidade de expressar o CAB-CAR que tem a capacidade de se ligar a um polipeptídeo Axl ou a um epítipo do mesmo, ou a um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo devido ao fato de que é geneticamente modificado para conter o ácido nucleico que codifica o CAB-CAR. Essa modificação genética pode ser a presença da sequência de codificação CAB-CAR em um vetor que foi introduzido no interior da célula T ou célula NK por transfecção ou transdução. Em modalidades ilustrativas, o ácido nucleico que codifica o CAB-CAR é integrado ao genoma da célula T ou da célula NK.

[342] Prevê-se que vários métodos conhecidos na técnica para introduzir um polinucleotídeo em uma célula T e/ou célula NK possam ser usados com métodos aqui fornecidos para aspectos que incluem a alteração do pH para afetar a ligação de uma célula T CAB-CAR ou de uma célula NK a o seu antígeno cognato em uma célula com o uso de um agente como um agente farmacológico modulador de pH (por vezes referido aqui como “aspectos de Comutador de pH”). Tipicamente, um vetor, em exemplos ilustrativos, um vetor de expressão, é usado para distribuir o polinucleotídeo. Tais vetores podem incluir vários vetores conhecidos na técnica para administrar ácidos nucleicos a células T e/ou a células NK. Aspectos ilustrativos da invenção usam vetores retrovirais e partículas retrovirais e, em algumas modalidades, particularmente ilustrativas, vetores lentivirais e, em modalidades ilustrativas, partículas lentivirais recombinantes.

[343] Outros vetores de expressão adequados podem ser usados em aspectos de comutação de pH aqui fornecidos. Tais vetores de expressão incluem, sem limitação, vetores virais (por exemplo, vetores virais à base de vírus vaccinia; poliovírus; adenovírus (consulte, por exemplo, Li et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borrás et al., Gene Ther 6:515 524, 1999; Li e Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto et al., H Gene Ther 5:1088 1097, 1999; documentos WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO

94/28938; WO 95/11984 e WO 95/00655); vírus adenoassociado (consulte, por exemplo, Ali et al., Hum Gene Ther 9:81 86, 1998, Flannery et al., PNAS 94:6916 6921, 1997; Bennett et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther 4:683 690, 1997, Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641 648, 1999; Ali et al., Hum Mol Genet 5:591 594, 1996; Srivastava no documento WO 93/09239, Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822-3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154-165; e Flotte et al., PNAS (1993) 90: 10613-10617); SV40; vírus herpes simplex; ou um vetor retroviral (por exemplo, Vírus da Leucemia Murina, vírus da necrose do baço e vetores derivados de retrovírus, como Vírus Sarcoma de Rous, Vírus Sarcoma de Harvey, vírus da leucose aviária, vírus da imunodeficiência humana, vírus do sarcoma mieloproliferativo e vírus do tumor mamário), por exemplo, um retrovírus gama; ou vírus da imunodeficiência humana (consulte, por exemplo, Miyoshi et al., PNAS 94:10319 23, 1997; Takahashi et al., J Virol 73:7812 7816, 1999); e similares.

[344] Em algumas modalidades, Partículas virais contendo DNA são utilizadas em vez de partículas retrovirais recombinantes. Tais partículas virais podem ser adenovírus, vírus adenoassociados, herpesvírus, citomegalovírus, poxvírus, vírus avipox, vírus influenza, vírus da estomatite vesicular (VSV) ou vírus Sindbis. Um versado na técnica apreciará como modificar os métodos aqui descritos para uso com diferentes vírus e retrovírus. Quando são usadas partículas virais que incluem um genoma de DNA, um versado na técnica apreciará que unidades funcionais podem ser incluídas nesses genomas para induzir a integração da totalidade ou de uma porção do genoma de DNA da partícula viral no genoma de uma célula T e/ou célula NK transduzida com esse vírus. Alternativamente, o DNA funcional pode ser entregue a uma célula T e/ou célula NK que é expressa na célula, mas não está integrada ao genoma da célula T e/ou da célula NK.

[345] Em modalidades ilustrativas, o vetor usado em um aspecto de troca de pH da presente revelação é uma partícula retroviral recombinante e, em certas modalidades, uma partícula lentiviral recombinante. Tal partícula

retroviral tipicamente inclui um genoma retroviral dentro de um capsídeo que está localizado dentro de um envelope viral. A presente revelação em diversas seções aqui apresentadas fornece diversas modalidades de partículas retrovirais recombinantes que revelam elementos que podem ser incluídos na superfície ou no interior e/ou no genoma de uma partícula retroviral recombinante. Qualquer uma dessas modalidades de partículas retrovirais recombinantes pode ser usada nos aspectos de comutação de pH aqui fornecidos.

[346] Em qualquer das modalidades reveladas acima, o antígeno cognato ao qual o CAB-CAR se liga pode ser um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo. Em algumas modalidades, o antígeno cognato pode ser um polipeptídeo com pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 %, ou 100% de identidade de sequência com uma extensão de pelo menos 10, 15, 20 ou todos os aminoácidos de um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo ou para um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo. Como aqui revelado, o CAB-CAR com capacidade de se ligar a um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo tipicamente liga o seu antígeno cognato com uma maior afinidade de ligação a um pH de 6,7 do que um pH de 7,4. Assim, tais CAB-CAR anti-ROR2 e anti-AXL da presente revelação ligam-se tipicamente ao seu antígeno cognato com uma afinidade de ligação superior em um microambiente tumoral do que um tecido normal com um pH fisiológico.

#### Métodos de tratamento

[347] A presente revelação fornece vários métodos para tratar um distúrbio que inclui um CAB-CAR anti-Axl ou anti-Ror2 aqui fornecido. Em algumas modalidades, os métodos aproveitam o fato de um CAB-CAR da presente revelação, quando presente e expresso por um linfócito T ou uma célula NK, pode mediar a citotoxicidade em relação a uma célula-alvo. Um CAB-CAR da presente revelação liga-se a um antígeno presente em uma célula-alvo em certas condições alvo, mediando desse modo a morte de uma célula-alvo por um

linfócito T ou uma célula NK geneticamente modificada para produzir o CAB-CAR. O ASTR do CAB-CAR tipicamente se liga a um antígeno presente na superfície de uma célula-alvo.

[348] As células-alvo incluem, mas sem limitação, células cancerígenas. Assim, a presente revelação fornece métodos para matar ou inibir o crescimento de uma célula cancerosa alvo, em que o método envolve entrar em contato com uma célula efetora imune citotóxica (por exemplo, uma célula T citotóxica ou uma célula NK) que é geneticamente modificada para produzir um CAR de tópico, de modo que o linfócito T ou célula NK reconheça um antígeno presente na superfície de uma célula cancerígena alvo, e medie a morte da célula-alvo. Aspectos ilustrativos de tais métodos fornecem métodos para o tratamento do câncer. Os CAB-CARs não estão limitados a usos para o tratamento de câncer ou células tumorais ou cancerígenas, mas podem ser apropriados para uma ou mais indicações, incluindo o tratamento de perturbações circulatórias, artrite, esclerose múltipla, doenças autoimunes, distúrbios dermatológicos, doenças virais e distúrbios e uso em vários formatos de diagnóstico.

[349] Em certos aspectos, a presente revelação fornece um método de tratamento do câncer em um indivíduo com câncer. Como tal, a presente revelação fornece métodos para terapia celular adoptiva contra o câncer, especialmente um câncer que expressa Axl ou Ror2, que usam os CAB-CAR anti-Axl e Anti-Ror2 aqui fornecidos. Assim, em um aspecto, o método inclui o seguinte: A. introduzir um vetor de expressão configurado para expressar uma sequência polinucleotídica que codifica um CAB-CAR dirigido a Axl ou Ror2, como aqui fornecido, em células de sangue periférico obtidas do indivíduo para produzir uma célula citotóxica geneticamente modificada (como uma célula T ou célula NK); e B. administrar a célula citotóxica geneticamente modificada ao indivíduo. Métodos detalhados para processar células T para ativar, transduzir e tipicamente expandir tais células que fornecem modalidades ilustrativas da etapa A acima são aqui fornecidos.

[350] O câncer expressa tipicamente Ror2 ou Axl, respectivamente, e em modalidades ilustrativas, o câncer é qualquer câncer em que as células de tal câncer expressam Ror2 e/ou Axl, como carcinoma de células renais. O CAR pode ser qualquer um dos CAB-CAR que reconhece Axl ou Ror2 aqui revelados, especialmente aqueles que são citotóxicos para células cancerígenas que expressam esses antígenos. O vetor de expressão que codifica um CAB-CAR anti-Axl ou CAB-CAR anti-Ror2 pode ser introduzido em células do sangue periférico por transdução de leucócitos do sangue periférico que incluem células T e/ou células NK com o vetor. Em certas modalidades ilustrativas, o vetor é um vírus recombinante, como um retrovírus recombinante que, em algumas modalidades, é um lentivírus recombinante. Em algumas modalidades, o câncer é um sarcoma de tecido mole ou mesotelioma que expressa células Ror2 e T e/ou células NK do sujeito (por exemplo, paciente de sarcoma de tecido mole ou mesotelioma) são transduzidos com um CAR anti-Ror2, por exemplo, um anti-Ror2 CAB-CAR aqui revelado.

[351] Os métodos para o tratamento de um distúrbio aqui fornecidos incluem tipicamente a administração de células T ou células NK geneticamente modificadas que expressam CAB-CAR anti-Axl ou anti-Ror2 aqui fornecidas, a um indivíduo. A administração pode ser, por exemplo, administração intravenosa, administração subcutânea ou administração intratumoral. Nos métodos em que células T e/ou células NK geneticamente modificadas são administradas intravenosamente, tipicamente entre  $1 \times 10^4$  células/kg e  $1 \times 10^8$  células/kg de células são entregues em um tampão adequado para administração parentérica. Nos métodos em que células T e/ou células NK geneticamente modificadas são administradas intratumoralmente, tipicamente entre  $1 \times 10^6$  células e  $5 \times 10^8$  células são distribuídas em uma solução isotônica.

[352] Em algumas modalidades, a administração é precedida, acompanhada e/ou seguida pela administração de uma interleucina ou uma versão modificada da mesma. Por exemplo, algumas modalidades aqui

fornechas incluem a coadministração de IL-2, ou uma versão modificada de IL-2 que tem liberação sustentada e/ou se liga a certos receptores de IL-2 que tendem a ativar a proliferação e/ou atividade de morte de células T. Por exemplo, a IL-2 modificada em modalidades é uma IL-2 peguilada e pode ser NKTR-214 (Nektar Therapeutics, São Francisco, CA, EUA). Em outras modalidades, a IL-2 modificada é ALKS 4230 (Alkermes, Inc.).

[353] Os carcinomas que podem ser passíveis de terapia por um método aqui descrito incluem, sem limitação, carcinoma esofágico, carcinoma hepatocelular, carcinoma basocelular (uma forma de câncer da pele), carcinoma de células escamosas (vários tecidos), carcinoma da bexiga, incluindo transicional carcinoma celular (uma neoplasia maligna da bexiga), carcinoma broncogênico, carcinoma do cólon, carcinoma colorretal, carcinoma gástrico, carcinoma pulmonar, incluindo carcinoma de pequenas células e carcinoma de células não pequenas do pulmão, carcinoma adrenocortical, carcinoma de tireoide, carcinoma pancreático, mama carcinoma, carcinoma do ovário, carcinoma da próstata, adenocarcinoma, carcinoma da glândula sudorípara, carcinoma das glândulas sebáceas, carcinoma papilífero, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma de células renais, carcinoma ductal *in situ* ou carcinoma do ducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, Wilm tumor, carcinoma cervical, carcinoma uterino, carcinoma testicular, carcinoma osteogênico, carcinoma epitelial e carcinoma nasofaríngeo.

[354] Os sarcomas que podem ser passíveis de terapia por um método aqui descrito incluem, sem limitação, fibrossarcoma, mixossarcoma, condrossarcoma, cordoma, sarcoma osteogênico, osteossarcoma, angiossarcoma, endotelioarcoma, linfangiossarcoma, linfangioendotelioarcoma, sinovioma, mesotelioma, sarcoma de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma e outros sarcomas de partes moles.

[355] Outros tumores sólidos que podem ser passíveis de terapia por um método aqui divulgado incluem, sem limitação, glioma, astrocitoma,

meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma e retinoblastoma.

[356] Leucemias que podem ser passíveis de terapia por um  
 5 método aqui descrito incluem, sem limitação, a) síndromes mieloproliferativas crônicas (desordens neoplásicas de células estaminais hematopoiéticas multipotenciais); b) leucemias mielogênicas agudas (transformação neoplásica de uma célula-tronco hematopoiética multipotencial ou uma célula hematopoiética de potencial de linhagem restrita; c) leucemias linfocíticas  
 10 crônicas (CLL; proliferação clonal de linfócitos pequenos imunologicamente imaturos e funcionalmente incompetentes), incluindo CLL C, leucemia prolinfocítica CLL e célula T e leucemia de células pilosas; e d) leucemias linfoblásticas agudas (caracterizadas pelo acúmulo de linfoblastos). Os linfomas que podem ser tratados com o uso de um método em questão incluem, sem  
 15 limitação, linfomas de células B (por exemplo, linfoma de Burkitt); Linfoma de Hodgkin; linfoma não-Hodgkin e similares.

[357] Outros cânceres que podem ser passíveis de tratamento de acordo com os métodos aqui divulgados incluem meningioma atípico (cérebro), carcinoma das células das ilhotas (pâncreas), carcinoma medular (tiroide),  
 20 mesenquimoma (intestino), carcinoma hepatocelular (fígado), hepatoblastoma (fígado), carcinoma de células claras (rim) e neurofibroma mediastino.

#### Terapia de combinação

[358] Em algumas modalidades, uma célula CAR é administrada como uma terapia adjuvante para uma terapia padrão de câncer. As terapias de  
 25 câncer incluem cirurgia (por exemplo, remoção cirúrgica de tecido canceroso), terapia de radiação, transplante de medula óssea, tratamento quimioterápico, tratamento com anticorpo, tratamento modificador da resposta biológica e certas combinações do precedente.

[359] A radioterapia inclui, sem limitação, raios-x ou raios gama  
 30 que são fornecidos por uma fonte aplicada externamente, como um feixe, ou pela

implantação de pequenas fontes radioativas.

[360] Anticorpos adequados para uso no tratamento de câncer incluem, sem limitação, anticorpos nus, por exemplos, trastuzumab (Herceptin), bevacizumab (Avastin™), cetuximab (Erbix™), panitumumab (Vectibix™),  
 5 Ipilimumab (Yervoy™), rituximab (Rituxan), alemtuzumab (Lemtrada™), Ofatumumab (Arzerra™), Oregovomab (OvaRex™), Lambrolizumab (MK-3475), pertuzumab (Perjeta™), ranibizumab (Lucentis™) etc., e anticorpos conjugados, por exemplo, gemtuzumab ozogamicin (Mylortarg™), ibritumomab maracod com Brentuximab vedotin <sup>90</sup>Y-tiuxetan (Zevalin™), tositumoma marcado com <sup>131</sup>I  
 10 (Adcetris™), (Bexxar™), etc. Anticorpos adequados para uso no tratamento do câncer incluem, sem limitação, anticorpos criados contra antígenos associados a tumores. Tais antígenos incluem, sem limitação, CD20, CD30, CD33, CD52, EpCAM, CEA, gpA33, Mucins, TAG-72, CAIX, PSMA, proteína de ligação a Folato, Gangliosídeos (por exemplo, GD2, GD3, GM2, etc.), Le<sup>y</sup>, VEGF, VEGFR,  
 15 Integrina alfa-V-beta-3, Integrina alfa-5-beta-1, EGFR, ERBB2, ERBB3, MET, IGFR, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, PAP, Tenascin, etc.

[361] Modificadores de resposta biológica adequados para uso em ligação com os métodos da presente revelação incluem, sem limitação, (1) inibidores da atividade de tirosina-quinase (RTK); (2) inibidores da atividade da  
 20 serina/treonina quinase; (3) antagonistas de antígeno associados a tumores, tais como anticorpos que se ligam especificamente a um antígeno tumoral; (4) agonistas do receptor da apoptose; (5) interleucina-2; (6) interferon-α (7) interferon-γ; (8) fatores estimulantes de colônias; (9) inibidores da angiogênese; e (10) antagonistas do fator de necrose tumoral.

25 [362] Os agentes quimioterápicos são compostos não peptídicos (isto é, não proteicos) que reduzem a proliferação de células cancerígenas e abrangem agentes citotóxicos e agentes citostáticos. Exemplos não limitativos de agentes quimioterápicos incluem agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, antibióticos antitumorais, alcaloides vegetais (vinca) e  
 30 hormônios esteroides.

[363] Os agentes que atuam para reduzir a proliferação celular são conhecidos na técnica e amplamente usados. Tais agentes incluem agentes alquilantes, como mostardas de azoto, nitrosoureas, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos e triazenos, incluindo, mas sem limitação, mecloretamina, ciclofosfamida (Cytosan<sup>TM</sup>), melfalano (L-sarcolisina), carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU), estreptozocina, clorozotocina, mostarda de uracila, clormetina, ifosfamida, clorambucil, pipobroman, trietilenomelamina, trietilenotiofosforamina, bussulfano, dacarbazina e temozolomida.

[364] Os agentes antimetabólitos incluem análogos do ácido fólico, análogos da pirimidina, análogos da purina e inibidores da adenosina-desaminase, incluindo, mas sem limitação citarabina (CYTOSAR-U), arabinosido citosina, fluoruracila (5-FU), floxuridina (FudR), 6-tioguanina, 6-mercaptopurina (6-MP), pentostatina, 5-fluorouracil (5-FU), metotrexato, 10-propargil-5,8-dideazafolato (PDDF, CB37-1), ácido 5,8-dideazatetrahidrofólico (DDATHF), leucovorina, fosfato de fludarabina, pentostatina e gemcitabina.

[365] Produtos naturais adequados e seus derivados (por exemplo, alcaloides de vinca, antibióticos antitumorais, enzimas, linfocinas e epipodofilotoxinas), incluem, sem limitação, Ara-C, paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), docetaxel (Taxotere<sup>®</sup>), desoxicoformicina, mitomicina-C, L-asparaginase, azatioprina; brequinar; alcaloides, por exemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, etc.; podofilotoxinas, por exemplo, etoposide, teniposide, etc.; antibióticos, por exemplo, antraciclina, cloridrato de daunorrubicina (daunomicina, rubidomicina, cerubidina), idarrubicina, doxorubicina, derivados de epirubicina e morfolino, etc.; bisciclopéptidos fenoxizona, por exemplo, dactinomicina; glicopeptídeos básicos, por exemplo, bleomicina; glicosídeos de antraquinona, por exemplo, plicamicina (mitramicina); antracenodionas, por exemplo, mitoxantrona; indoledionas azirinopirrol, por exemplo, mitomicina; imunossuppressores macrocíclicos, por exemplo, ciclosporina, FK-506 (tacrolimus, programaf), rapamicina, etc.; e similares.

[366] Outros agentes citotóxicos antiproliferativos são navelbene, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosfamida e droloxafina.

[367] Os agentes que afetam os microtúbulos que têm atividade  
 5 antiproliferativa também são adequados para uso e incluem, sem limitação, alocolchicina (NSC 406042), Halicondrina B (NSC 609395), colchicina (NSC 757), derivados de colchicina (por exemplo, NSC 33410), dolastatina. 10 (NSC 376128), maitansina (NSC 153858), rizoxina (NSC 332598), paclitaxel (Taxol®), derivados Taxol®, docetaxel (Taxotere®), tiocolchicina (NSC 361792),  
 10 tritilcisteína, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, natural e epotilonas sintéticas incluindo, sem limitação, eoptilona A, epotilona B, discodermolida; estramustina, nocodazole e similares.

[368] Os moduladores e esteroides hormonais (incluindo análogos sintéticos) que são adequados para uso incluem, sem limitação,  
 15 adrenocorticosteroides, por exemplo, prednisona, dexametasona, etc.; estrogênios e progestinas, por exemplo, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, estradiol, clomifeno, tamoxifeno; etc.; e supressores adrenocorticais, por exemplo, aminoglutetimida; 7-etinilestradiol; dietilestilbestrol, testosterona, fluoximesterona, propionato de  
 20 dromostanolona, testolactona, metilprednisolona, metil-testosterona, prednisolona, triancinolona, clorotrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustina, acetato de medroxiprogesterona, leuprolide, Flutamida (Drogenil), Toremifene (Fareston) e Zoladex®. Os estrogênios estimulam a proliferação e a diferenciação, portanto compostos que se ligam ao  
 25 receptor de estrogênio são usados para bloquear essa atividade. Os corticosteroides podem inibir a proliferação de células T.

[369] Outros agentes quimioterápicos incluem complexos metálicos, por exemplo, cisplatina (cis-DDP), carboplatina, etc.; ureias, por exemplo, hidroxiureia; e hidrazinas, por exemplo, N-metil-hidrazina;  
 30 epidofilotoxina; um inibidor de topoisomerase; procarbazina; mitoxantrona;

leucovorina; tegafur; etc. Outros agentes antiproliferativos de interesse incluem imunossupressores, por exemplo, ácido micofenólico, talidomida, desoxispergualina, azasporina, leflunomida, mizoribina, azaspirano (SKF 105685); Iressa® (ZD 1839, 4-(3-cloro-4-fluorofenilamino) -7-metoxi-6-(3-(4-morfolinil)propoxi) quinazolina); etc.

[370] “Taxanos” incluem paclitaxel, bem como qualquer derivado taxano ativo ou pró-fármaco. “Paclitaxel” (que deve ser entendido aqui como incluindo análogos, formulações e derivados como, por exemplo, docetaxel, TAXOLTM, TAXOTERETM (uma formulação de docetaxel), análogos 10-desacetil de paclitaxel e análogos de paclitaxel de 3’N-desbenzoil-3’N-t-butoxicarbonila) podem ser facilmente preparados com o uso de técnicas conhecidas pelos versados na técnica (consulte também os documentos WO 94/07882, WO 94/07881, WO 94/07880, WO 94/07876, WO 93/23555, WO 93/10076; Patente n° US 5.294.637; 5.283.253; 5.279.949; 5.274.137; 15 5.202.448; 5.200.534; 5.229.529; e EP 590.267), ou obtido de uma variedade de fontes comerciais, incluindo, por exemplo, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. (T7402 de *Taxus brevifolia*; ou T-1912 de *Taxus yannanensis*).

[371] O paclitaxel deve ser entendido como se referindo não apenas à forma comumente disponível quimicamente de paclitaxel, mas a 20 análogos e derivados (por exemplo, Taxotere™ docetaxel, como observado acima) e paclitaxel (por exemplo, paclitaxel-PEG, paclitaxel-dextran ou paclitaxel-xilose).

[372] Também estão incluídos no termo “taxano” uma variedade de derivados conhecidos, incluindo derivados hidrofílicos e derivados 25 hidrofóbicos. Os derivados de taxano incluem, sem limitação, derivados de galactose e manose descritos no pedido de patente internacional n° WO 99/18113; piperazina e outros derivados descritos em WO 99/14209; derivados de taxano descritos nos documentos WO 99/09021, WO 98/22451 e Patente n° US No. 5.869.680; derivados 6-tio descritos no documento WO 98/28288; 30 derivados de sulfenamida descritos na Patente n° US 5.821.263; e o derivado de

taxol descrito na Patente nº US 5.415.869. Inclui ainda pró-fármacos de paclitaxel incluindo, sem limitação, aqueles descritos nos documentos WO 98/58927; WO 98/13059; e Patente nº US 5.824.701.

#### Indivíduos Adequados para Tratamento

5           [373]           Uma variedade de indivíduos é adequada para o tratamento com um método de tratamento do câncer. Indivíduos adequados incluem qualquer indivíduo, por exemplo, um animal humano ou não humano que tenha câncer, que tenha sido diagnosticado com câncer, que esteja em risco de desenvolver câncer, que tenha câncer e esteja em risco de recorrência do  
10   câncer, que tenha sido tratado com um agente para o câncer e não respondeu a esse tratamento, ou que foi tratado com um agente para o câncer, mas recidivou após a resposta inicial a tal tratamento.

          [374]           Os indivíduos adequados para o tratamento com um método imunomodulador incluem indivíduos que têm um distúrbio autoimune; indivíduos  
15   que são receptores de transplantes de órgãos ou tecidos; e similares; indivíduos imunocomprometidos; e indivíduos que estão infectados com um patógeno.

#### Modalidades exemplificadoras

          [375]           A presente revelação fornece receptores de antígenos quiméricos (CARs) e ácidos nucleicos que compreendem as sequências de  
20   nucleotídeos que codificam os CARs que se ligam a Axl e/ou Ror2, e CARs condicionalmente ativos que se ligam a Axl e Ror2. A presente revelação fornece células geneticamente modificadas para produzir os CARs e métodos para produzir tais células. Os CARs da presente revelação podem ser usados em  
25   vários métodos, que são também fornecidos, incluindo métodos para realizar terapia celular adoptiva, como terapia de CAR, por exemplo, terapia de CAR contra câncer, por exemplo, carcinoma de células renais.

          [376]           Algumas modalidades exemplares não limitadoras que são aspectos da presente revelação são fornecidas nas Modalidades a seguir:

          [377]           Modalidade 1. Um receptor de antígeno quimérico (CAR)  
30   para ligação Axl ou Ror2, que compreende:

[378] a) uma região de direcionamento específica de antígeno (ASTR) condicionalmente ativa que exibe uma ligação aumentada a Axl ou Ror2 a um pH de 6,7 em comparação com um pH de 7,4;

[379] b) um domínio transmembranar; e

5 [380] c) um domínio de ativação intracelular.

[381] Modalidade A1. Um receptor de antígeno quimérico (CAR) para ligação Axl ou Ror2, que compreende:

[382] a) uma região de direcionamento específica de antígeno condicionalmente ativa (ASTR) que exibe um aumento (isto é, maior) na  
10 atividade em um microambiente tumoral e/ou em uma condição de ensaio substituto de tumor *in vitro*, em comparação com um ambiente fisiológico normal, em que o ASTR se liga a Axl ou Ror2;

[383] b) um domínio transmembranar; e

[384] c) um domínio de ativação intracelular.

15 [385] Modalidade A2. O CAR de qualquer uma das Modalidades 1 ou A1, ou de acordo com qualquer outra Modalidades fornecida aqui exceto se explicitamente recitado em contrário, em que o ASTR é selecionado de um anticorpo, um antígeno, um ligante, um domínio de ligação a receptor de um ligante, um receptor, um domínio de ligação a ligante de um receptor, e um  
20 aficorpo.

[386] Modalidade A3. O CAR da Modalidade A2, ou de acordo com qualquer outra Modalidades fornecida aqui exceto se explicitamente recitado em contrário, em que o ASTR é um fragmento de anticorpo.

[387] Modalidade A4. O CAR de qualquer uma das Modalidades 1  
25 ou A1 a A3, ou de acordo com qualquer outra Modalidades fornecida aqui exceto se explicitamente recitado em contrário, em que o ASTR condicionalmente ativo exibe um aumento em ligação a antígeno em um microambiente tumoral e/ou em uma condição de ensaio substituto de tumor *in vitro* em relação a uma condição fisiológica correspondente, em que o microambiente tumoral e/ou as condições  
30 de ensaio substituto de tumor *in vitro* são selecionadas do grupo que consiste

em hipóxia, pH ácido, maior concentração de ácido láctico, maior concentração de ácido hialurônico, maior concentração de albumina, maior concentração de adenosina, maior concentração de R-2-hidroxioglutarato e menor disponibilidade de nutrientes.

5                    [388]            Modalidade A5. O CAR de qualquer uma das Modalidades A1 a A4, ou de acordo com qualquer outra Modalidades fornecida aqui exceto se explicitamente recitado em contrário, em que o ASTR condicionalmente ativo exibe um aumento em (ou maior) ligação a antígeno a um pH de 6,7 em comparação com um pH de 7,4.

10                   [389]            Modalidade A6. O CAR de qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 a A5, ou de acordo com qualquer outra Modalidades fornecida aqui exceto se explicitamente recitado em contrário, em que o domínio de ativação intracelular é um domínio de ativação de CD3Z humano, um domínio de ativação de CD3D humano, um domínio de ativação de CD3E humano, um domínio de  
15                   ativação de CD3G humano, um domínio de ativação de CD28 humano, um domínio de ativação de CD79A humano, um domínio de ativação de DAPIO humano, um domínio de ativação de DAP12 humano Domínio de ativação de FCERIG, um domínio de ativação de CD137 humano, ou um domínio de ativação de ZAP70 humano.

20                   [390]            Modalidade A7. O CAR de qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 a A6, ou de acordo com qualquer outra Modalidades fornecida aqui exceto se explicitamente recitado em contrário, que compreende adicionalmente um primeiro, segundo, terceiro ou quarto domínio coestimulador que tem uma sequência de aminoácidos diferente daquela do domínio de entrada intracelular.

25                   [391]            Modalidade A8. O CAR da Modalidade A7, ou de acordo com qualquer outra Modalidades fornecida aqui exceto se explicitamente recitado em contrário, em que o primeiro, segundo, terceiro e/ou quarto domínios coestimuladores compreendem um domínio coestimulador de 4-IBB (CD137), B7-H3, CD2, CD7, CD27, CD28, CD28 deletado para a ligação de Lck (ICA),  
30                   ICOS, OX40, BTLA, CD27, CD30, CD40, GITR, HVEM, LFA-1, LIGHT, NKG2C,

PD-1, TILR2, TILR4, TILR7, TILR9, cadeia gama do receptor Fc, cadeia  $\epsilon$  do receptor Fc, ou um ligante que liga-se especificamente a CD83.

[392] Modalidade A9. O CAR da Modalidade A7, ou de acordo com qualquer outra Modalidades fornecida aqui exceto se explicitamente recitado em contrário, em que o primeiro domínio coestimulador retém uma atividade coestimuladora e é um domínio coestimulador CD137 humano, um domínio coestimulador CD28 humano, um domínio coestimulador humano ICA, um domínio coestimulador ICOS humano, um domínio coestimulador, um domínio coestimulador de BTLA humano, um domínio coestimulador de CD27 humano, um domínio coestimulador de CD30 humano, um domínio coestimulador GITR humano, ou um domínio coestimulador humano HVEM.

[393] Modalidade B1. Uma partícula retroviral recombinante incompetente de replicação que compreende um genoma retroviral que compreende uma ou mais sequências de ácidos nucleicos operativamente ligadas a um promotor ativo em células T e/ou células NK, em que a uma ou mais sequências de ácidos nucleicos codificam o CAR de qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 a A9, ou de qualquer Modalidade aqui fornecida exceto se explicitamente recitado em contrário.

[394] Modalidade B2. Uma célula T ou célula NK recombinante isolada geneticamente modificada com a partícula retroviral recombinante incompetente de replicação da Modalidade B1.

[395] Modalidade B3. Uma célula T recombinante isolada geneticamente modificada com a partícula retroviral recombinante incompetente de replicação da Modalidade B1.

[396] Modalidade B4. Uma mistura de reação que compreende a partícula retroviral recombinante incompetente de replicação da Modalidade B1, e uma célula T e/ou uma célula NK.

[397] Modalidade B5. Uma mistura de reação que compreende a partícula retroviral recombinante incompetente de replicação da Modalidade B1, e uma célula T.

[398] Modalidade C1. Uma célula T ou célula NK isolada (por exemplo, recombinante ou geneticamente modificada), que compreende um genoma que compreende uma ou mais sequências de ácidos nucleicos (por exemplo, dois ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, ou seis ou mais sequências de ácidos nucleicos) operativamente ligadas a um promotor ativo em células T e/ou células NK, em que a uma ou mais (ou duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, ou seis ou mais) sequências de ácidos nucleicos codificam o CAR de qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 a A8, ou de qualquer outra Modalidade aqui fornecida exceto se explicitamente recitado em contrário.

[399] Modalidade C2. Uma célula T ou célula NK isolada (por exemplo, recombinante ou geneticamente modificada) da Modalidade C1, em que a célula isolada é uma célula T.

[400] Modalidade C3. Uma célula T ou célula NK isolada (por exemplo, recombinante ou geneticamente modificada) ou (em certas modalidades ilustrativas, uma célula T) que compreende uma ou mais sequências de ácidos nucleicos operativamente ligadas a um promotor ativo em células T e/ou células NK, em que a uma ou mais sequências de ácidos nucleicos codificam um receptor de antígeno quimérico (CAR) para a ligação de Axl ou Ror2, que compreende:

[401] a) uma região de direcionamento específica de antígeno (ASTR) condicionalmente ativa que exibe uma ligação aumentada a Axl ou Ror2 a um pH de 6,7 em comparação com um pH de 7,4;

[402] b) um domínio transmembranar; e

[403] c) um domínio de ativação intracelular.

[404] Modalidade D1. Um método para ligar uma célula T e/ou NK a uma célula-alvo de mamífero que compreende colocar a célula-alvo de mamífero em contato com a célula T e/ou a célula NK em um microambiente a um pH inferior a 7,4 (por exemplo, menos de 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8 ou 6,9, ou na faixa de 5,8 a 7,0, em modalidades ilustrativas na faixa

de 6,0 a 6,8, na faixa de 6,1 a 6,9, na faixa de 6,2 a 6,8, ou entre 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 e 6,5 na extremidade inferior da faixa e 6,6, 6,7, 6,8 e 6,9 na extremidade superior da faixa), em que a célula T e/ou célula NK expressa o CAR de qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 a A8, ou de qualquer outra Modalidade aqui  
 5 fornecida, exceto se explicitamente descrita de outro modo, e a célula-alvo de mamífero expressa Axl e/ou Ror2.

[405] Modalidade D2. Um método para ligar uma célula T ou célula NK a uma célula-alvo de mamífero que compreende colocar a célula-alvo de mamífero em contato com a célula T e/ou a célula NK em um microambiente a  
 10 um pH inferior a 7,4 (por exemplo, inferior a 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8 ou 6,9, ou na faixa de 5,8 a 7,0, em modalidades ilustrativas na faixa de 6,0 a 6,8, na faixa de 6,2 a 6,8, ou entre 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 e 6,5 na extremidade inferior da faixa e 6,6, 6,7, 6,8 e 6,9 na extremidade superior da faixa), em que a célula-alvo de mamífero expressa Axl ou Ror2 e em que a célula  
 15 T ou célula NK expressa um receptor de antígeno quimérico (CAR) para a ligação Axl ou Ror2, respectivamente, em que o CAR compreende:

[406] a) uma região de direcionamento específica de antígeno (ASTR) condicionalmente ativa que exibe uma ligação aumentada a Axl ou Ror2 a um pH de 6,7 em comparação com um pH de 7,4;

20 [407] b) um domínio transmembranar; e

[408] c) um domínio de ativação intracelular.

[409] Modalidade D3. O método de qualquer uma das Modalidades D1 a D3, em que a ligação ativa a célula T e/ou célula NK.

[410] Modalidade D4. Um método para ativar uma célula T ou  
 25 célula NK que compreende colocar uma célula-alvo de mamífero em contato com a célula T e/ou a célula NK em um microambiente a um pH inferior a 7,4 (por exemplo, inferior a 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8 ou 6,9, ou na faixa de 5,8 a 7,0, em modalidades ilustrativas na faixa de 6,0 a 6,8, na faixa de 6,2 a 6,8, ou entre 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 e 6,5 na extremidade inferior da faixa e  
 30 6,6, 6,7, 6,8 e 6,9 na extremidade superior), em que a célula-alvo de mamífero

expressa Axl ou Ror2 e em que a célula T ou célula NK expressa um receptor de antígeno quimérico (CAR) para a ligação Axl ou Ror2, respectivamente, em que o CAR compreende:

[411] a) uma região de direcionamento específica de antígeno (ASTR) condicionalmente ativa que exibe uma ligação aumentada a Axl ou Ror2 a um pH de 6,7 em comparação com um pH de 7,4;

[412] b) um domínio transmembranar; e

[413] c) um domínio de ativação intracelular.

[414] Modalidade D5. O método da Modalidade D5, em que o CAR é qualquer um dos CARs fornecidos em uma outra Modalidade em exemplos ilustrativos não limitantes, Modalidades 1 ou A1 a A8.

[415] Modalidade D6. O método da Modalidade D5, em que o CAR é um CAR fornecido em qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 a A8.

[416] Modalidade D7. O método de qualquer uma das Modalidades D3 a D6, em que a ativação compreende expressão e/ou produção e/ou secreção aumentada de uma citocina.

[417] Modalidade D8. O método de qualquer uma das Modalidades D3 a D7, em que, depois da ativação, a célula T e/ou célula NK aumenta a expressão de IL-2 ou IFN- $\gamma$ .

[418] Modalidade D9. O método da Modalidade D8, em que a expressão de IL-2 ou IFN- $\gamma$  é aumentada em pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 75%, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, ou mais de 10 vezes, em comparação com a quantidade de IL-2 ou IFN- $\gamma$  produzido pela célula T ou célula NK antes do contato.

[419] Modalidade D10. O método da Modalidade D8, que a secreção de IL-2 ou IFN- $\gamma$  é aumentada em pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 75%, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo

menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, ou mais que 10 vezes, comparado com a quantidade de IL-2 ou IFN- $\gamma$  secretada pela célula T ou célula NK antes do contato.

[420] Modalidade D11. O método de qualquer uma das  
5 Modalidades D3 a D7, em que após ativação, a atividade citotóxica das células T ou NK é aumentada em pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 75%, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, ou mais de 10 vezes, em comparação com a atividade  
10 citotóxica da célula T ou célula NK antes de entrar em contato.

[421] Modalidade D12. O método de qualquer uma das modalidades D1 a D11, em que a célula-alvo de mamífero é lisada após a ativação da célula T ou célula NK.

[422] Modalidade D13. O método de qualquer uma das  
15 Modalidades D1 a D12, que compreende adicionalmente antes do contato, transduzir a célula T ou a célula NK com a partícula retroviral recombinante incompetente de replicação de qualquer uma das Modalidades B1 ou B2 para modificar geneticamente a célula T ou NK para expressar o CAR.

[423] Modalidade D14. O método da Modalidade D13, em que a  
20 transdução é realizada *ex vivo*.

[424] Modalidade D15. O método de qualquer uma das Modalidades D1 a D14, que compreende adicionalmente aumentar o pH do microambiente para um pH igual ou superior a 7,0 (por exemplo, acima de 7,1, 7,2, ou 7,3), diminuindo assim a ativação da célula T ou célula NK.

25 [425] Modalidade D16. O método de qualquer uma das Modalidades D1 a D14, que compreende adicionalmente aumentar o pH do microambiente para um pH igual ou superior a 7,0 (por exemplo, acima de 7,1, 7,2, ou 7,3), desativando desse modo a célula T ou célula NK.

[426] Modalidade D17. O método de qualquer uma das  
30 Modalidades D1 a D16, em que o microambiente é um tumor.

[427] Modalidade D18. O método da reivindicação D17, em que o tumor é em um indivíduo humano.

[428] Modalidade D19. O método de qualquer uma das Modalidades D1 a D16, em que o microambiente é *in vitro* ou *ex vivo*.

5 [429] Modalidade E1. Método para modificar geneticamente um linfócito que compreende colocar uma célula T e/ou célula NK em contato com uma partícula retroviral recombinante incompetente para replicação que compreende no seu genoma um polinucleotídeo que compreende uma ou mais sequências de ácidos nucleicos (por exemplo, dois ou mais, três ou mais, quatro  
10 ou mais, cinco ou mais, ou seis ou mais sequências de ácidos nucleicos) operativamente ligadas a um promotor ativo em células T e/ou células NK, em que uma ou mais (ou duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, ou seis ou mais) sequências de ácidos nucleicos codificam o receptor de antígeno quimérico de qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 a A8, ou de  
15 qualquer outra Modalidades aqui fornecida, a menos que explicitamente especificado de outro modo, em que o dito contato facilita a transdução da célula T e ou célula NK pela partícula retroviral recombinante incompetente para replicação, produzindo desse modo uma célula T geneticamente modificada e/ou uma célula NK.

20 [430] Modalidade F1. Partícula retroviral recombinante incompetente para replicação para uso em um método para modificar geneticamente um linfócito, em que a partícula retroviral recombinante incompetente para replicação compreende no seu genoma um polinucleotídeo que compreende uma ou mais sequências de ácido nucleico (por exemplo, dois  
25 ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, ou seis ou mais sequências de ácido nucleico) operativamente ligadas a um promotor ativo em células T e/ou células NK, em que uma ou mais (ou duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, ou seis ou mais) sequências de ácidos nucleicos codificam o receptor de antígeno quimérico de qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 a A8,  
30 ou de qualquer outra Modalidade aqui fornecida, exceto se explicitamente

indicado de outro modo, em que o método compreende entrar em contato com uma célula T e/ou célula NK, e o dito contato facilita a transdução da célula T e/ou célula NK pelas partículas retrovirais recombinantes incompetentes para a replicação, produzindo assim uma célula T geneticamente modificada e/ou célula NK.

[431] Modalidade G1. Partícula retroviral recombinante incompetente para replicação para uso em um método para modificar geneticamente uma célula T e/ou célula NK, para tratar crescimento tumoral, em que o método compreende colocar a célula T e/ou célula NK em contato com uma replicação recombinante incompetente de partículas retrovirais que compreende o seu genoma um polinucleotídeo que compreende uma ou mais sequências de ácidos nucleicos (por exemplo, dois ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, ou seis ou mais sequências de ácidos nucleicos) ligadas operativamente a um promotor ativo em células T e/ou células NK, em que a uma ou mais (ou duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, ou seis ou mais) sequências de ácidos nucleicos codificam o receptor de antígeno quimérico de qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 a A8 ou de qualquer outra Modalidade aqui fornecida, exceto se explicitamente descrito de outro modo, em que o dito contato facilita a transdução da célula T e/ou da célula NK pelas partículas retrovirais recombinantes incompetentes para a replicação, produzindo assim uma célula T geneticamente modificada e/ou célula NK.

[432] Modalidade H1. Uso de uma partícula retroviral recombinante incompetente para replicação na fabricação de um kit para modificar geneticamente uma célula T e/ou célula NK, em que p uso do kit compreende colocar a célula T e/ou a célula NK em contato com uma partícula retroviral recombinante incompetente para replicação que compreende no seu genoma um polinucleotídeo que compreende uma ou mais sequências de ácidos nucleicos (por exemplo, dois ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, ou seis ou mais sequências de ácidos nucleicos) ligadas operativamente a um promotor ativo em células T e/ou células NK, em que a uma ou mais (ou

duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, ou seis ou mais) sequências de ácidos nucleicos codificam o receptor de antígeno quimérico de qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 para A8, ou de qualquer outra Modalidade aqui fornecida, exceto se explicitamente indicado de outro modo, em  
5 que o dito contato facilita a transdução da célula T e/ou célula NK pelas partículas retrovirais recombinantes incompetentes para a replicação, produzindo assim uma célula T geneticamente modificada e/ou célula NK.

[433] Modalidade I1. Recipiente comercial contendo uma partícula retroviral recombinante incompetente para replicação e instruções para uso da  
10 mesma, em que a partícula retroviral recombinante incompetente para replicação compreende no seu genoma um polinucleotídeo que compreende uma ou mais sequências de ácidos nucleicos (por exemplo, dois ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, ou seis ou mais sequências de ácido nucleico) operativamente ligadas a um promotor ativo em células T e/ou células NK, em  
15 que uma ou mais (ou duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, ou seis ou mais) sequências de ácidos nucleicos codificam o receptor de antígeno quimérico de qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 a A8, ou de qualquer outra Modalidade aqui fornecida, a menos que explicitamente recitado de outro modo.

[434] Modalidade J1. Um kit contendo um recipiente contendo uma partícula retroviral recombinante incompetente para replicação e instruções uso do mesmo, em que as instruções instruem um método para ligar uma célula T e/ou célula NK a uma célula-alvo de mamífero, em um método que compreende:

[435] a) transduzir a célula T e/ou célula NK com a partícula retroviral recombinante incompetente para replicação que compreende no seu genoma um polinucleotídeo que compreende uma ou mais sequências de ácidos nucleicos (por exemplo, dois ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, ou seis ou mais sequências de ácidos nucleicos) operativamente ligadas  
25 a um promotor ativo em células T e/ou células NK, em que a uma ou mais (ou  
30

duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, ou seis ou mais) sequências de ácido nucleico codificam o CAR de qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 a A8, ou de qualquer outra Modalidade aqui fornecida, exceto se explicitamente recitado de outro modo; e

5           [436]           b) colocar a célula-alvo de mamífero em contato com a célula T transduzida e/ou a célula NK em um microambiente a um pH inferior a 7,4 (por exemplo, inferior a 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8 ou 6,9, ou na faixa de 5,8 a 7,0, mais comumente na faixa de 6,0 a 6,8, na faixa de 6,2 a 6,8, ou entre 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 e 6,5 na extremidade inferior da faixa e  
10   6,6, 6,7, 6,8 e 6,9 na extremidade superior da faixa), em que a célula T e/ou a célula NK expressam o CAR de qualquer uma das modalidades 1 ou A1 a A8, e o alvo célula de mamífero expressa Axl e/ou Ror2.

          [437]           Modalidade K1. Um método para ativar uma célula T e/ou célula NK que compreende colocar uma célula-alvo de mamífero em contato com  
15   a célula T e/ou a célula NK em um microambiente a um pH inferior a 7,4 (por exemplo, inferior a 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8 ou 6,9, ou na faixa de 5,8 a 7,0, mais comumente na faixa de 6,0 a 6,8, na faixa de 6,2-6,8, ou entre 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 e 6,5 na extremidade inferior da faixa e 6,6, 6,7, 6,8 e 6,9 na extremidade superior da faixa), em que a célula T e/ou célula NK  
20   expressa o receptor de antígeno quimérico de qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 a A8, ou de qualquer outra Modalidades aqui fornecida, a menos que seja explicitamente especificado de outro modo, e a célula-alvo de mamífero expressa Axl e/ou Ror2.

          [438]           Modalidade K2. O método da Modalidade K1 que  
25   compreende adicionalmente, antes do contato, transduzir a célula T e/ou a célula NK com a partícula retroviral recombinante incompetente para replicação de qualquer uma das Modalidades B1 ou B2.

          [439]           Modalidade K3. O método da Modalidade K1, em que, após a ativação, a célula T e/ou célula NK induz a expressão e/ou a produção e/ou a  
30   secreção de uma citocina.

[440] Modalidade K4. O método da Modalidade K3, em que a citocina é escolhida do grupo que consiste em IL-2 ou IFN- $\gamma$ .

[441] Modalidade L1. Método para induzir a expressão e/ou produção de uma citocina em uma célula T e/ou célula NK e/ou induzir a secreção de uma citocina de uma célula T e/ou célula NK que compreende colocar uma célula-alvo de mamífero em contato com a célula T e/ou a célula NK em um microambiente a um pH inferior a 7,4 (por exemplo, inferior a 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8 ou 6,9, ou no intervalo de 5,8 a 7,0, mais comumente na faixa de 6,0 a 6,8, na faixa de 6,2 a 6,8, ou entre 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 e 6,5 na extremidade inferior da faixa, e 6,6, 6,7, 6,8 e 6,9 na extremidade alta da faixa), em que a célula T e/ou célula NK expressa o receptor de antígeno quimérico de qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 a A8, ou de qualquer outra Modalidade aqui fornecida, exceto se explicitamente recitado de outro modo, e a célula-alvo de mamífero expressa Axl e/ou Ror2.

[442] Modalidade L2. O método da Modalidade L1 que compreende adicionalmente, antes do contato, transduzir a célula T e/ou a célula NK com a partícula retroviral recombinante incompetente para replicação de qualquer uma das Modalidades B1 ou B2.

[443] Modalidade M1. Um ácido nucleico isolado que codifica um receptor de antígeno quimérico para a ligação de Axl ou Ror2 de acordo com qualquer das Modalidades 1 ou A1 a A8, ou de qualquer outra Modalidade aqui fornecida, exceto se explicitamente recitado de outro modo.

[444] Modalidade M2. Ácido nucleico isolado da Modalidade M1, em que o ácido nucleico compreende ainda um promotor ativo em células T e/ou células NK e em que as sequências de ácidos nucleicos que codificam o CAR estão operativamente ligadas ao promotor.

[445] Modalidade M3. O ácido nucleico isolado da Modalidade M2, em que a sequência de ácidos nucleicos isolada codifica ainda um domínio de reconhecimento.

[446] Modalidade M4. O ácido nucleico isolado da Modalidade M3,

em que ácidos nucleicos que codificam o domínio de reconhecimento são separados de ácidos nucleicos que codificam CAR por uma sequência de salto ribossomal.

[447] Modalidade M5. O ácido nucleico isolado da Modalidade M4,  
5 em que a sequência de salto ribossomal é 2A-1.

[448] Modalidade M6. Uma partícula retroviral recombinante incompetente de replicação que compreende qualquer um dos ácidos nucleicos da Modalidades M1 a M5.

[449] Modalidade M7. A partícula retroviral recombinante  
10 incompetente de replicação da Modalidade M6, em que a partícula retroviral recombinante incompetente de replicação é uma partícula lentiviral.

[450] Modalidade N1. Um vetor de expressão que compreende um ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico de acordo com qualquer uma das Modalidades 1 ou A1 a A8, ou de qualquer outra Modalidade  
15 aqui fornecida, exceto se explicitamente recitado de outro modo, operativamente ligada a um promotor.

[451] Modalidade O1. Célula de mamífero infectada com qualquer um dos vetores de expressão da Modalidade N1.

[452] Modalidade P1. Célula de mamífero que expressa qualquer  
20 um dos receptores de antígenos quiméricos das Modalidades 1 ou A1 a A8, de qualquer outra Modalidade aqui fornecida, exceto se explicitamente recitado em contrário.

[453] Modalidade Q1. Método para a produção de uma célula condicionalmente ativável que compreende um receptor de antígeno quimérico  
25 (CAR) para ligar condicionalmente Axl ou Ror2, em que o método compreende modificar geneticamente uma célula de mamífero com um vetor de expressão que compreende um promotor operativamente ligado a sequências de nucleotídeos que codificam o CAR, em que CAR compreende:

[454] a) uma região de direcionamento específica de antígeno  
30 condicionalmente ativa (ASTR) que exibe um aumento na atividade em um

ambiente tumoral e/ou em uma condição de ensaio substituto de tumor *in vitro*, em comparação com um ambiente fisiológico normal, em que o ASTR se liga a Axl ou Ror2;

[455] b) um domínio transmembranar; e

5 [456] c) um domínio de ativação intracelular.

[457] Modalidade R1. Um método para tratar um câncer em um indivíduo que compreende as etapas de:

[458] a) introduzir um vetor de expressão que compreende um ácido nucleico que codifica qualquer dos CARs das Modalidades 1 ou A1 a A8, ou de qualquer outra Modalidade aqui fornecida, exceto se explicitamente descrito de outro modo, em células citotóxicas obtidas do indivíduo para produzir células citotóxicas geneticamente modificadas; e

10

[459] b) administrar as células citotóxicas geneticamente modificadas ao indivíduo.

15 [460] Modalidade S1. Um método *ex vivo* para produzir células T e/ou células NK ativáveis condicionalmente que compreende um receptor de antígeno quimérico (CAR) para ligação condicional de Axl ou Ror2, em que o método compreende:

[461] a) enriquecer células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) para isolar PBMCs que compreendem células T e/ou células NK de sangue isolado;

20

[462] b) ativar células T e/ou células NK das PBMC enriquecidas sob condições eficazes;

[463] c) transduzir as células T e/ou células NK ativadas com partículas retrovirais recombinantes incompetentes para replicação em condições eficazes, produzindo assim células T e/ou células NK geneticamente modificadas, em que as partículas retrovirais recombinantes incompetentes para replicação compreendem cada uma um genoma retroviral que compreende um ou mais sequências de ácido nucleico operativamente ligadas a um promotor ativo em células T e/ou células NK, em que uma primeira sequência de ácido

25

30

nucleico de uma ou mais sequências de ácido nucleico codifica um CAR de qualquer das Modalidades 1 ou A1 até A8 ou de qualquer outra Modalidade aqui fornecida, exceto se explicitamente recitado em contrário; e

[464] d) expandir as células T geneticamente modificadas e/ou as células NK, tornando assim as células T e/ou as células NK condicionalmente ativáveis.

[465] Modalidade T1. Uma célula T modificada produzida por um método de qualquer das Modalidades D3, E1, K2, Q1, R1 ou S1.

[466] Modalidade U1. Célula NK modificada produzida por um método de qualquer das Modalidades D3, E1, K2, Q1, R1 ou S1.

[467] Em qualquer das modalidades aqui incluídas que incluem um receptor de antígeno quimérico (CAR), a região de direcionamento específica de antígeno (ASTR) pode ser selecionada de um anticorpo, um antígeno, um ligante, um domínio de ligação de um ligante, um receptor, um domínio de ligação ao ligante de um receptor e um anticorpo. Em qualquer das modalidades da presente invenção que inclui um CAR, o ASTR pode ser um anticorpo selecionado de um anticorpo inteiro, um anticorpo de cadeia simples, um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento (Fab')<sub>2</sub>, um fragmento Fv e um anticorpo divalente de cadeia simples ou um diacorpo. Em qualquer uma das modalidades aqui incluídas que incluem um CAR, o ASTR pode incluir uma cadeia pesada e uma cadeia leve de um anticorpo. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que inclui um anticorpo, o anticorpo pode ser um fragmento variável de cadeia única com uma cadeia pesada e uma cadeia leve. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que inclui a cadeia pesada e a cadeia leve de um anticorpo, as cadeias pesada e leve podem ser separadas por um ligante, e o ligante pode ser entre 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 aminoácidos de comprimento na extremidade inferior da faixa e 20, 25, 30, 40, 50, 60 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, ou 200 aminoácidos de comprimento na extremidade superior da faixa. Em algumas modalidades, o ASTR pode ser um fragmento variável de cadeia única

que compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que as cadeias pesadas e leves são separadas por um ligante, em que o ligante tem entre 6 e 100 aminoácidos de comprimento. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que inclui um fragmento variável de cadeia única

5 que inclui uma cadeia pesada e uma cadeia leve, as cadeias pesada e leve podem ser separadas por um ligante e o ligante pode ser entre 6 e 100 aminoácidos de comprimento, e o ASTR pode incluir uma cadeia pesada de anticorpo condicionalmente ativo ou uma cadeia leve de anticorpo condicionalmente ativo e a outra da cadeia pesada de anticorpo ou cadeia leve

10 de anticorpo pode ser do tipo selvagem.

[468] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que inclui uma cadeia pesada e uma cadeia leve de um anticorpo, a cadeia pesada pode ser posicionada N-terminal em relação à cadeia leve no receptor de antígeno quimérico ou a cadeia leve pode ser posicionada N-terminal

15 em relação à cadeia pesada no receptor de antígeno quimérico. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que inclui uma cadeia pesada e uma cadeia leve de um anticorpo, a cadeia pesada e a cadeia leve pode ser de um anticorpo condicionalmente ativo. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR, o CAR pode incluir um ASTR biespecífico.

20 Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR, o ASTR pode ser um ASTR condicionalmente ativo. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR condicionalmente ativo, o ASTR condicionalmente ativo pode exibir um aumento em ligação a antígeno em um microambiente tumoral e/ou em uma condição de ensaio substituto de tumor *in vitro* em relação

25 a uma condição fisiológica correspondente, em que o microambiente tumoral e/ou condições de ensaio substituto de tumor *in vitro* podem ser selecionadas do grupo que consiste em hipóxia, pH ácido, maior concentração de ácido láctico, maior concentração de ácido hialurônico, maior concentração de albumina, maior concentração de adenosina, maior concentração de R-2-hidroxiglutarato e

30 menor disponibilidade de nutrientes. Em qualquer uma das modalidades aqui

que inclui um CAR com um ASTR condicionalmente ativo, o ASTR condicionalmente ativo pode exibir um aumento em ligação a antígeno a um pH de 6,7 em comparação com um pH de 7,4. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR condicionalmente ativo, o ASTR condicionalmente ativo pode exibir um aumento em ligação a antígeno a um pH de 6,0 (em vez de ou além de um pH de 6,7) em comparação com um pH de 7,4.

[469] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR, o ASTR pode ligar-se a Axl. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Axl, o ASTR pode se ligar ao mesmo epítipo de Axl como um anticorpo que compreende a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:79 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:80.

[470] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Axl, e em modalidades ilustrativas se liga ao mesmo epítipo de Axl como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:79 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:80, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia pesada de anticorpo com três regiões determinantes de complementaridade que têm sequências H1, H2 e H3, em que: a) a sequência H1 é X<sub>1</sub>GX<sub>2</sub>TMN (SEQ ID NO:87); b) a sequência H2 é LIKPSNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:88); e c) a sequência H3 é GX<sub>3</sub>YX<sub>4</sub>SYX<sub>5</sub>AMDY (SEQ ID NO:89), em que X<sub>1</sub> é T ou W; X<sub>2</sub> é H ou A; X<sub>3</sub> é H ou D; X<sub>4</sub> é E ou H; e X<sub>5</sub> é E ou F. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Axl, e em modalidades ilustrativas se liga ao mesmo epítipo de Axl como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:79 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:80, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia leve de anticorpo com três regiões determinantes de complementaridade que têm sequências L1, L2 e L3, em que: d) a sequência L1 é KASQDVX6SAVA (SEQ ID NO:90); e) a sequência L2 é WX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>TRX<sub>9</sub>T (SEQ ID NO:91); e f) a sequência L3 é QEHFSX<sub>10</sub>PLX<sub>11</sub> (SEQ ID NO:92), em que X<sub>6</sub> é S ou V; X<sub>7</sub> é A ou Q; X<sub>8</sub> é S ou D; X<sub>9</sub> é H ou D; X<sub>10</sub> é T ou P; e X<sub>11</sub> é T ou R. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um

CAR com um ASTR que se liga a Axl, e em modalidades ilustrativas se liga ao mesmo epítopo de Axl como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:79 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:80, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia pesada de anticorpo com três

5 regiões determinantes de complementaridade que têm sequências H1, H2 e H3, em que: a) a sequência H1 é  $X_1GX_2X_3MX_4$  (SEQ ID NO:134); b) a sequência H2 é  $LIKX_5SNGGTX_6YNQKFKG$  (SEQ ID NO:135); e c) a sequência H3 é  $X_1$  é T, A, ou W;  $X_2$  é H ou A;  $X_3$  é T ou I;  $X_4$  é N ou I;  $X_5$  é P ou N;  $X_6$  é S, I, ou T;  $X_7$  é H, D, E, P, R, ou W;  $X_8$  é Y ou N;  $X_9$  é E, A, D, F, G, H, I, L, M, N, R, V, ou Y;  $X_{10}$  é

10 S, D, M, N, ou Q;  $X_{11}$  é Y, C, E, ou P;  $X_{12}$  é F, E, N, S, T, ou V;  $X_{13}$  é A, D, G, L, ou Y;  $X_{14}$  é M, E, ou F;  $X_{15}$  é W, A, D, H, L, N, P, R, ou T; e  $X_{16}$  é G ou H. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Axl, e em modalidades ilustrativas se liga ao mesmo epítopo de Axl como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:79 e a

15 cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:80, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia leve de anticorpo com três regiões determinantes de complementaridade que têm sequências de L1, L2 e L3, em que: d) a sequência L1 é  $KASQDX_{17}X_{18}SX_{19}VX_{20}$  (SEQ ID NO:137); e) a sequência L2 é  $X_{21}X_{22}X_{23}TRX_{24}T$  (SEQ ID NO:138); e f) a sequência L3 é

20  $QEX_{25}X_{26}SX_{27}X_{28}X_{29}X_{30}$  (SEQ ID NO:139), em que  $X_{17}$  é V, D, G, N, ou W;  $X_{18}$  é S ou V;  $X_{19}$  é A, L, ou M;  $X_{20}$  é A, D, N, ou Q;  $X_{21}$  é W ou F;  $X_{22}$  é A, I, N, P, ou Q;  $X_{23}$  é S ou D;  $X_{24}$  é H ou D;  $X_{25}$  é H, C, F, I, L, Q, S, T, V, ou Y;  $X_{26}$  é F, C, D, E, G, N, ou S;  $X_{27}$  é T, C, ou P;  $X_{28}$  é P, A, C, D, E, H, K, S, T, V, ou W;  $X_{29}$  é L, G, ou R; e  $X_{30}$  é T, I, ou R. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui

25 um CAR com um ASTR que se liga a Axl e inclui uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia leve pode ser selecionada de SEQ ID NO:108-111. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Axl e inclui uma região variável de cadeia pesada, em que a região variável de cadeia pesada pode ser selecionada de SEQ ID

30 NO:112-114.

[471] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAB-CAR que se liga a Axl, a cadeia pesada pode ser N-terminal em relação à cadeia leve. Nessas modalidades, o ASTR pode incluir uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:129, ou SEQ ID NO:159.

5 [472] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAB-CAR que se liga a Axl, a cadeia leve pode ser N-terminal em relação à cadeia pesada. Nessas modalidades, o ASTR pode compreender uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:160 ou SEQ ID NO:161.

[473] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR, 10 o ASTR pode ligar-se a Ror2. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, o ASTR pode ligar-se ao mesmo epítipo de Ror2 como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84 e/ou o ASTR pode ligar-se ao mesmo epítipo de Ror2 como um fragmento de 15 anticorpo variável de cadeia única que compreende a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:151 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152. Em qualquer uma das modalidades que inclui um CAR, o ASTR pode ligar-se a Ror2. Em qualquer uma das modalidades que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, o ASTR pode ligar-se ao mesmo epítipo de Ror2 como um 20 anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84 e/ou o ASTR pode ligar-se ao mesmo epítipo de Ror2 como um fragmento de anticorpo variável de cadeia única que compreende a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:151 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152. Em qualquer uma das 25 modalidades que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia pesada com três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências H1, H2 e H3, em que: a) a sequência H1 é GYTX<sub>1</sub>TEX<sub>2</sub>TX<sub>3</sub>H (SEQ ID NO:95) ou X4GYSITTGYWVN (SEQ ID NO:96); b) a sequência H2 é 30 GX<sub>5</sub>NX<sub>6</sub>NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:97) ou YITYDGSKNYPNPSLKN (SEQ

ID NO:98); e c) a sequência H3 é GSLYSYGNSYFDY (SEQ ID NO:99) ou FEGVWX<sub>7</sub>GLDY (SEQ ID NO:100), em que X<sub>1</sub> é F ou E; X<sub>2</sub> é Y ou D, X<sub>3</sub> é M ou D; X<sub>4</sub> é T ou S; X<sub>5</sub> é E ou I; X<sub>6</sub> é T ou D; e X<sub>7</sub> é Y ou G. Em qualquer uma das modalidades que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, e em

5 modalidades ilustrativas se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:151 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia pesada com três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências H1, H2 e H3, em que: a) a sequência H1 é

10 GX<sub>5</sub>NX<sub>6</sub>NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:97); e c) a sequência H3 é GSLYSYGNSYFDY (SEQ ID NO:99), em que X<sub>1</sub> é F ou E; X<sub>2</sub> é Y ou D, X<sub>3</sub> é M ou D; X<sub>5</sub> é E ou I; e X<sub>6</sub> é T ou D. Em qualquer uma das modalidades que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, e em modalidades ilustrativas se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de

15 anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia pesada com três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências H1, H2, e H3, em que: a) a sequência H1 é X<sub>4</sub>GYSITTGYWYN (SEQ ID NO:96); b) a sequência H2 é YITYDGSKNYPNPSLKN (SEQ ID NO:98); e c) a

20 sequência H3 é FEGVWX<sub>7</sub>GLDY (SEQ ID NO:100), em que X<sub>4</sub> é T ou S; e X<sub>7</sub> é Y ou G. Em qualquer uma das modalidades que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia leve com três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências L1, L2 e L3, em que: a) a sequência L1 é SATSSX<sub>8</sub>SYMH (SEQ ID

25 NO:101) ou RASESVDRYGNSFIH (SEQ ID NO:102); b) a sequência L2 é X<sub>9</sub>TSNLAS (SEQ ID NO:103) ou RTYNLES (SEQ ID NO:104); e c) a sequência L3 é QQRSSYPFT (SEQ ID NO:105) ou QQTNEDPWT (SEQ ID NO:106), em que X<sub>8</sub> é E ou V; e X<sub>9</sub> é G ou H. Em qualquer uma das modalidades que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, e em modalidades ilustrativas se liga

30 ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de

anticorpo de SEQ ID NO:151 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia leve com três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências L1, L2 e L3, em que: a) a sequência L1 é SATSSX<sub>8</sub>SYMH (SEQ ID NO:101); b) a sequência L2 é X<sub>9</sub>TSNLAS (SEQ ID NO:103); e c) a sequência L3 é QQRSSYPFT (SEQ ID NO:105), em que X<sub>8</sub> é E ou V; e X<sub>9</sub> é G ou H. Em qualquer uma das modalidades que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, e em modalidades ilustrativas se liga ao mesmo epítipo de Ror2 como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia leve com três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências L1, L2 e L3, em que: a) a sequência L1 é RASESVDRYGNSFIH (SEQ ID NO:102); b) a sequência L2 é RTYNLES (SEQ ID NO:104); e c) a sequência L3 é QQTNEDPWT (SEQ ID NO:106).

[474] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia pesada que inclui três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências H1, H2 e H3, em que: a) a sequência H1 é GYTX<sub>1</sub>TEX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>H (SEQ ID NO:140) ou GYSITTGX<sub>29</sub>YWN (SEQ ID NO:141); b) a sequência H2 é X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:142) ou YITYDGSX<sub>30</sub>NYNPSLKN (SEQ ID NO:143); e c) a sequência H3 é X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>SX<sub>12</sub>YX<sub>13</sub>YX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>SYFX<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub> (SEQ ID NO:144) ou CSX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>VX<sub>35</sub>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>LDX<sub>38</sub> (SEQ ID NO:145), em que X<sub>1</sub> é F ou E; X<sub>2</sub> é Y ou D; X<sub>3</sub> é T ou C; X<sub>4</sub> é M, D, E, ou Y; X<sub>5</sub> é G ou S; X<sub>6</sub> é I ou E; X<sub>7</sub> é N, C, L, ou V; X<sub>8</sub> é T, D ou E; X<sub>9</sub> é A, M, ou T; X<sub>10</sub> é R ou H; X<sub>11</sub> é G ou E; X<sub>12</sub> é L ou F; X<sub>13</sub> é S ou G; X<sub>14</sub> é G ou D; X<sub>15</sub> é N ou E; X<sub>16</sub> é D ou L; X<sub>17</sub> é Y, C, ou T; X<sub>18</sub> é W ou L; X<sub>29</sub> é Y, E, R, ou T; X<sub>30</sub> é K ou N; X<sub>31</sub> é R, G, H, W, ou Y; X<sub>32</sub> é F, C, N, ou Q; X<sub>33</sub> é E ou S; X<sub>34</sub> é G, E, F, H, M, Q, ou S; X<sub>35</sub> é W, A, I, P, Q, T, ou V; X<sub>36</sub> é Y, G, N, ou Q; X<sub>37</sub> é G, S, ou T; e X<sub>38</sub> é Y ou I. Em qualquer uma das modalidades

aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, e em modalidades ilustrativas se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:151 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia pesada que

5 inclui três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências NH1, H2, e H3, em que: a) a sequência H1 é GYTX<sub>1</sub>TEX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>H (SEQ ID NO:140); b) a sequência H2 é X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:142); e c) a sequência H3 é X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>SX<sub>12</sub>YX<sub>13</sub>YX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>SYFX<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub> (SEQ ID NO:144), em que X<sub>1</sub> é F ou E; X<sub>2</sub> é Y ou D; X<sub>3</sub> é T ou C; X<sub>4</sub> é M, D, E, ou Y;

10 X<sub>5</sub> é G ou S; X<sub>6</sub> é I ou E; X<sub>7</sub> é N, C, L, ou V; X<sub>8</sub> é T, D ou E; X<sub>9</sub> é A, M, ou T; X<sub>10</sub> é R ou H; X<sub>11</sub> é G ou E; X<sub>12</sub> é L ou F; X<sub>13</sub> é S ou G; X<sub>14</sub> é G ou D; X<sub>15</sub> é N ou E; X<sub>16</sub> é D ou L; X<sub>17</sub> é Y, C, ou T; e X<sub>18</sub> é W ou L. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, e em modalidades ilustrativas se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que inclui a

15 cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia pesada que inclui três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências H1, H2 e H3, em que: a) a sequência H1 é GYSITTGX<sub>29</sub>YWN (SEQ ID NO:141); b) a sequência H2 é

20 YITYDGSX<sub>30</sub>NYNPSLKN (SEQ ID NO:143); e c) a sequência H3 é CSX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>VX<sub>35</sub>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>LX<sub>38</sub> (SEQ ID NO:145), em que X<sub>29</sub> é Y, E, R, ou T; X<sub>30</sub> é K ou N; X<sub>31</sub> é R, G, H, W, ou Y; X<sub>32</sub> é F, C, N, ou Q; X<sub>33</sub> é E ou S; X<sub>34</sub> é G, E, F, H, M, Q, ou S; X<sub>35</sub> é W, A, I, P, Q, T, ou V; X<sub>36</sub> é Y, G, N, ou Q; X<sub>37</sub> é G, S, ou T; e X<sub>38</sub> é Y ou I.

25 [475] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia leve que inclui três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências L1, L2 e L3, em que: a) a sequência L1 é SATSSX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>MX<sub>22</sub> (SEQ ID NO:146) ou RASESVDRYGNX<sub>39</sub>IH (SEQ ID

30 NO:147); b) a sequência L2 é X<sub>23</sub>TSNLAS (SEQ ID NO:148) ou X<sub>40</sub>TYX<sub>41</sub>LES

(SEQ ID NO:149); e c) a sequência L3 é QX<sub>24</sub>X<sub>25</sub>SX<sub>26</sub>YPFX<sub>27</sub>X<sub>28</sub> (SEQ ID NO:150) ou QQX<sub>42</sub>NX<sub>43</sub>DPX<sub>44</sub>TX<sub>45</sub> (SEQ ID NO:85), em que X<sub>19</sub> é V ou E; X<sub>20</sub> é S ou D; X<sub>21</sub> é Y, C, ou D; X<sub>22</sub> é H, G, ou L; X<sub>23</sub> é G, C, H, ou P; X<sub>24</sub> é Q ou E; X<sub>25</sub> é R ou H; X<sub>26</sub> é S, D, G, I, Q, ou V; X<sub>27</sub> é T ou D; X<sub>28</sub> é F, D, ou E; X<sub>39</sub> é F, S, ou T; X<sub>40</sub> é R, C, D, E, ou W; X<sub>41</sub> é N ou D; X<sub>42</sub> é T, I, ou P; X<sub>43</sub> é E ou V; X<sub>44</sub> é W ou T; e X<sub>45</sub> é F ou T. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, e em modalidades ilustrativas se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:151 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia leve que inclui três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências L1, L2 e L3, em que: a) a sequência L1 é SATSSX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>MX<sub>22</sub> (SEQ ID NO:146); b) a sequência L2 é X<sub>23</sub>TSNLAS (SEQ ID NO:148); e c) a sequência L3 é QX<sub>24</sub>X<sub>25</sub>SX<sub>26</sub>YPFX<sub>27</sub>X<sub>28</sub> (SEQ ID NO:150), em que X<sub>19</sub> é V ou E; X<sub>20</sub> é S ou D; X<sub>21</sub> é Y, C, ou D; X<sub>22</sub> é H, G, ou L; X<sub>23</sub> é G, C, H, ou P; X<sub>24</sub> é Q ou E; X<sub>25</sub> é R ou H; X<sub>26</sub> é S, D, G, I, Q, ou V; X<sub>27</sub> é T ou D; e X<sub>28</sub> é F, D, ou E. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, e em modalidades ilustrativas se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84, o ASTR pode incluir uma região variável de cadeia leve que inclui três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências L1, L2 e L3, em que: a) a sequência L1 é RASESVDRYGNSX<sub>39</sub>IH (SEQ ID NO:147); b) a sequência L2 é X<sub>40</sub>TYX<sub>41</sub>LES (SEQ ID NO:149); e c) a sequência L3 é QQX<sub>42</sub>NX<sub>43</sub>DPX<sub>44</sub>TX<sub>45</sub> (SEQ ID NO:85), em que X<sub>39</sub> é F, S, ou T; X<sub>40</sub> é R, C, D, E, ou W; X<sub>41</sub> é N ou D; X<sub>42</sub> é T, I, ou P; X<sub>43</sub> é E ou V; X<sub>44</sub> é W ou T; e X<sub>45</sub> é F ou T.

[476] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, em modalidades ilustrativas em que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma

cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84, a região variável de cadeia pesada pode compreender uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:120 ou SEQ ID NO:121.

5           [477]           Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, em modalidades ilustrativas em que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84, a região variável de cadeia pesada pode  
10           compreender uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83.320. O receptor de antígeno quimérico da reivindicação 2931, em que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84, e em que a região variável de cadeia  
15           leve compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:86.

          [478]           Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, em modalidades ilustrativas em que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e uma cadeia  
20           leve de anticorpo de SEQ ID NO:84, a região variável de cadeia leve pode compreender uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:84.

          [479]           Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, em modalidades ilustrativas em que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma  
25           cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84, a região variável de cadeia pesada pode compreender uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:120, ou SEQ ID NO:121.

          [480]           Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR  
30           com um ASTR que se liga a Ror2, em modalidades ilustrativas em que o ASTR

se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84, a região variável de cadeia pesada pode compreender uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83.

[481] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, em modalidades ilustrativas em que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84, a ASTR pode compreender uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:131, ou SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:157, ou SEQ ID NO:158.

[482] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, em modalidades ilustrativas em que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152, a região variável de cadeia leve pode compreender uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO: 124, ou SEQ ID NO:152.

[483] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, em modalidades ilustrativas em que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152, a região variável de cadeia leve pode compreender uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:152.

[484] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, em modalidades ilustrativas em que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152, a região variável de cadeia pesada pode compreender uma

sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:119, ou SEQ ID:151.

[485] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, em modalidades ilustrativas em que o ASTR se liga ao mesmo epítipo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152, a região variável de cadeia pesada pode compreender uma sequência de aminoácidos de SEQ ID:151.

[486] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um ASTR que se liga a Ror2, em modalidades ilustrativas em que o ASTR se liga ao mesmo epítipo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152, a ASTR pode compreender uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:155 ou SEQ ID NO:156.

[487] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR, o domínio transmembranar pode ter pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de SEQ ID NO:46, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio transmembranar CD8, por exemplo, SEQ ID NO:47 ou 75, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio transmembranar CD4, por exemplo, SEQ ID NO:48, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio transmembranar CD3 zeta, por exemplo, SEQ ID NO:49, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio transmembranar CD28, por exemplo, SEQ ID NO:50 ou 76, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio transmembranar OX40, por exemplo, SEQ ID NO:51, pelo menos 50%, 60%,

70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio transmembranar CD134, ou pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio transmembranar CD7, por exemplo, SEQ ID NO:52, e o ASTR condicionalmente ativo pode reter uma ligação aumentada a Ror2 ou Axl em um microambiente tumoral e/ou em uma condição de ensaio substituto de tumor *in vitro* em relação a uma condição fisiológica correspondente quando o ASTR fizer parte do CAR. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR, a membrana pode ser o domínio transmembranar CD8 ou o domínio transmembranar CD28. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR, o domínio transmembranar pode estar localizado entre o ASTR e o domínio de ativação intracelular. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR, o domínio de ativação intracelular pode reter uma atividade de ativação e ter pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio de ativação CD3Z, por exemplo, SEQ ID NO:11-16, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio de ativação CD3D, por exemplo, SEQ ID NO:17-19, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio de ativação CD3E, por exemplo, SEQ ID NO:20-21, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio de ativação CD3G, por exemplo, SEQ ID NO:22-23, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio de ativação CD28, por exemplo, SEQ ID NO:35, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio de ativação CD79A, por exemplo, SEQ ID NO:24-26, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio de ativação DAP10, por exemplo, SEQ ID NO:34, pelo menos 50%, 60%, 70%,

75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio de ativação DAP12, por exemplo, SEQ ID NO:27-31, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio de ativação FCER1G, por exemplo, SEQ ID NO:32-33, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio de ativação CD137, ou pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio de ativação ZAP70, por exemplo, SEQ ID NO:36.

[488] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR, o CAR pode incluir adicionalmente um domínio stalk. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR, o CAR pode incluir adicionalmente um domínio coestimulador. Em algumas modalidades, o CAR pode incluir um domínio stalk e um domínio coestimulador. Em algumas modalidades, o CAR pode incluir de amino terminal a carbóxi terminal, um ASTR, um domínio stalk, um domínio transmembranar, um domínio coestimulador e um domínio de ativação intracelular.

[489] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um domínio stalk, o domínio stalk pode ter pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com qualquer domínio stalk CD8 conhecido na técnica, por exemplo, SEQ ID NO:125, ou pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com qualquer domínio stalk CD28 conhecido na técnica, por exemplo, SEQ ID NO:126, e a região de direcionamento específica de antígeno condicionalmente ativa pode reter uma ligação aumentada a Ror2 ou Axl em um microambiente tumoral e/ou uma condição de ensaio substituto de tumor *in vitro* em relação a uma condição fisiológica correspondente quando o ASTR fizer parte do CAR.

[490] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR, o CAR pode incluir adicionalmente um domínio coestimulador. Em qualquer uma

das modalidades aqui que inclui um CAR com um domínio coestimulador, o domínio coestimulador intracelular pode incluir uma cadeia de sinalização do tipo DAP10/CD28 ou um polipeptídeo de sinalização intracelular contendo motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM). Em qualquer uma das

5 modalidades aqui que inclui um CAR com um domínio coestimulador, o CAR pode incluir um domínio coestimulador que tem uma sequência de aminoácidos diferente do domínio de ativação intracelular. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um domínio coestimulador, o domínio coestimulador pode ter pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%,  
 10 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio coestimulador CD137, por exemplo, SEQ ID NO:1, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio coestimulador CD28, por exemplo, SEQ ID NO:2, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%  
 15 de identidade de sequência com o domínio coestimulador ICA $\Delta$ , por exemplo, SEQ ID NO:3, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio coestimulador ICOS, por exemplo, SEQ ID NO:4, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de  
 20 sequência com o domínio coestimulador OX40, por exemplo, SEQ ID NO:5, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio coestimulador BTLA, por exemplo, SEQ ID NO:7, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio  
 25 coestimulador CD27, por exemplo, SEQ ID NO:6, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio coestimulador CD30, por exemplo, SEQ ID NO:8, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio coestimulador GITR, por  
 30 exemplo, SEQ ID NO:9, ou pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%,

95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com o domínio coestimulador HVEM, por exemplo, SEQ ID NO:10. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um domínio coestimulador, o domínio coestimulador pode ser o domínio coestimulador CD28 ou o domínio coestimulador CD137. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um domínio coestimulador, o domínio coestimulador pode ser o domínio coestimulador ICΔ. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um domínio coestimulador, o domínio coestimulador pode ser um domínio coestimulador ICΔ e o domínio de ativação intracelular pode ser um domínio de ativação CD3Z. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um domínio stalk e um domínio coestimulador, o domínio stalk pode ser um domínio stalk CD8 ou um domínio stalk CD28, o domínio transmembranar pode ser um domínio transmembranar CD8 ou um domínio transmembranar CD28, o domínio de ativação intracelular pode ser um domínio de ativação CD3Z, e o domínio coestimulador pode ser um domínio coestimulador CD137, um domínio coestimulador ICΔ, ou um domínio coestimulador CD28, ou o domínio coestimulador pode incluir tanto um domínio coestimulador CD137 como um domínio coestimulador ICΔ.

[491] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR, o CAR pode incluir adicionalmente um domínio de reconhecimento. Em qualquer uma das modalidades que inclui um CAR com um domínio de reconhecimento, o domínio de reconhecimento pode ser expresso no mesmo polipeptídeo que o CAR. Em qualquer uma das modalidades que inclui um CAR com um domínio de reconhecimento no mesmo polipeptídeo que o CAR, o domínio de reconhecimento pode estar em ou próximo ao N-terminal, como em 10, 20, 30, 40, ou 50 aminoácidos do N-terminal. Em qualquer uma das modalidades que inclui um CAR com um domínio de reconhecimento no mesmo polipeptídeo que o CAR, o domínio de reconhecimento pode estar em ou próximo ao C-terminal, como em 10, 20, 30, 40, ou 50 aminoácidos do C-terminal. Em qualquer uma das modalidades que inclui um CAR com um domínio de reconhecimento no mesmo

polipeptídeo que o CAR, o domínio de reconhecimento pode ser entre qualquer um dos domínios do CAR, como entre os domínios stalk e transmembrar. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um domínio de reconhecimento, o domínio de reconhecimento pode ser expresso de modo que

5 seja covalentemente ligado ao CAR e o domínio de reconhecimento possa ser separado do CAR por um sinal de clivagem ou uma sequência de salto ribossomal. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um domínio de reconhecimento com uma sequência de salto ribossomal, a sequência de salto ribossomal pode ser 2A-1, por exemplo, SEQ ID NO:77. Em

10 qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com um domínio de reconhecimento, o domínio de reconhecimento pode ser pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 aminoácidos contíguos de EGFR. Em qualquer uma das modalidades que inclui um CAR com um domínio de reconhecimento, o domínio de reconhecimento pode ser oepítopo FLAG (SEQ ID NO:38).

15 [492] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR, o CAR pode incluir adicionalmente uma sequência de sinalização. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR com uma sequência de sinalização, a sequência de sinalização pode ser um tag epitópico, um domínio de afinidade e/ou um polipeptídeo que produz um sinal detectável. Em qualquer

20 uma das modalidades aqui que inclui um CAR com uma sequência de sinalização, a sequência de sinalização pode ser no amino terminal.

[493] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um vetor de expressão que inclui um ácido nucleico que codifica um CAR, o vetor de expressão pode incluir adicionalmente nucleotídeos que codificam um domínio

25 de reconhecimento. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um vetor de expressão que inclui a ácido nucleico que codifica um CAR e nucleotídeos que codificam um domínio de reconhecimento, os nucleotídeos que codificam o domínio de reconhecimento podem codificar pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 aminoácidos contíguos de EGFR. Em qualquer uma das

30 modalidades aqui que inclui um vetor de expressão que inclui a ácido nucleico

que codifica um CAR e nucleotídeos que codificam um domínio de reconhecimento, os nucleotídeos que codificam o domínio de reconhecimento podem ser separados dos nucleotídeos que codificam o CAR por um sítio de entrada de ribossoma interno. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui  
5 um vetor de expressão que inclui a ácido nucleico que codifica um CAR e nucleotídeos que codificam um domínio de reconhecimento, o domínio de reconhecimento pode ser expresso como parte de um único polipeptídeo que inclui adicionalmente o CAR e o domínio de reconhecimento no único polipeptídeo pode ser separado do CAR por um sinal de clivagem ou uma  
10 sequência de salto ribossomal, que pode ser uma sequência 2A-1, por exemplo, SEQ ID NO:77. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um vetor de expressão, o vetor de expressão pode ser um vetor viral. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um vetor de expressão que é um vetor viral, o vetor viral pode ser partícula retroviral recombinante incompetente de replicação,  
15 partícula lentiviral recombinante incompetente para replicação, um vírus vaccinia, um poliovírus, um vírus adenoassociado, SV40, um vírus herpes simplex, um retrovírus gama, um vírus da imunodeficiência humana, um lentivírus ou um adenovírus.

[494] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui uma  
20 célula de mamífero que expressa um CAR, a célula pode ser um linfócito. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um linfócito que expressa um CAR, o linfócito pode ser uma célula T. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui uma célula T que expressa um CAR, a célula T pode ser uma célula T CD4+ ou a célula T pode ser uma célula T CD8+. Em qualquer uma das  
25 modalidades aqui que inclui a linfócito que expressa um CAR, o linfócito pode ser uma célula citotóxica que preferencialmente mata células de expressão de antígeno em um microambiente tumoral, e o linfócito pode incluir um ácido nucleico que codifica qualquer um dos CARs das Modalidades 1 ou A1 a A8.

[495] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um kit  
30 contendo um recipiente contendo uma partícula retroviral recombinante

incompetente de replicação, e instruções para uso do mesmo, as instruções podem indicar adicionalmente aumentar o pH do microambiente após entrar em contato com a célula-alvo de mamífero introduzindo um agente farmacológico modulador de pH ao microambiente em quantidade suficiente, afetando assim a

5 ligação da célula-alvo de mamífero com o célula T e/ou célula NK. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um kit contendo um recipiente contendo uma partícula retroviral recombinante incompetente de replicação, e instruções para uso do mesmo, em que o kit pode incluir adicionalmente um agente farmacológico modulador de pH. Em qualquer das modalidades aqui incluídas

10 que inclui um kit contendo um recipiente contendo uma partícula retroviral recombinante incompetente para replicação e instruções para uso do mesmo, as instruções podem incluir uma etapa de introdução da célula T e/ou célula NK com capacidade de expressar o CAR em um indivíduo antes do contato, em que após a introdução, a célula T e/ou a célula NK incluindo uma ou mais sequências

15 de ácidos nucleicos que codificam o CAR expressam o CAR e se ligam à célula-alvo de mamífero que expressa o antígeno cognato no sujeito.

[496] Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui tratar o câncer, o câncer pode ser carcinoma de célula renal. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui tratar o câncer, o câncer pode ser sarcoma de tecido

20 mole ou mesotelioma. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui tratar um câncer e inclui um CAR com um domínio de reconhecimento, o método pode, adicionalmente, administrar uma dose de anticorpos dirigidos contra o domínio de reconhecimento depois de administrar a molécula citotóxica geneticamente modificada ao indivíduo. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui tratar

25 um câncer, o câncer pode expressar Axl e o CAR pode incluir um ASTR que liga Axl. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui tratar um câncer, o câncer pode expressar Ror2 e o CAR pode incluir um ASTR que liga Ror2. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui tratar um câncer, as células citotóxicas podem ser células T e/ou células NK. Em qualquer uma das modalidades aqui

30 que inclui tratar um câncer, as células citotóxicas podem ser células T. Em

qualquer uma das modalidades aqui que inclui expandir células T e/ou células NK, o método pode incluir adicionalmente colher as células T e/ou células NK geneticamente modificadas após a expansão. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui colher células T e/ou células NK, o método pode

5 incluir adicionalmente criopreservar as células T e/ou células NK geneticamente modificadas colhidas. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui criopreservar células T e/ou células NK, as células T e células NK geneticamente modificadas criopreservadas podem ser descongeladas. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui colher células T e/ou células NK, o método pode

10 incluir adicionalmente introduzir as células T e/ou células NK geneticamente modificadas colhidas em um indivíduo.

[497] Exemplos de CARs condicionalmente ativos (CAB-CARs) que têm ligação aumentada a Axl a pH 6,7 em comparação com pH 7.4 são encontrados no Exemplo 1 aqui. Em modalidades ilustrativas, o CAR ou ASTR

15 podem ligar-se ao mesmo epítipo de Axl como um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples compreendendo uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 79 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 80. Em modalidades adicionais de tais modalidades ilustrativas, o CAR ou ASTR anti-Axl compreende ou é um fragmento variável de cadeia simples (scFv). Em

20 exemplos ilustrativos adicionais, o scFv anti-Axl compreende quer uma cadeia pesada que é N-terminal para uma cadeia leve ou uma cadeia leve que é N-terminal para uma cadeia pesada. Em qualquer uma das modalidades aqui incluídas, que inclui uma CAR e em modalidades ilustrativas liga-se ao mesmo epítipo de Axl como um anticorpo que inclui a cadeia pesada de anticorpo de

25 SEQ ID NO: 79 e a cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 80, O ASTR pode incluir qualquer uma das SEQ ID NO: 128, 129, 159, 160 ou 161. Além disso, os CARs anti-Axl de qualquer das modalidades aqui descritas podem incluir qualquer um dos componentes CAR aqui fornecidos. Em certas modalidades exemplificativas, os CARs anti-Axl podem incluir os componentes CAR listados

30 na Tabela 1 e podem ser qualquer um dos CARs na Tabela 1. Mais tipicamente

para quaisquer modalidades aqui incluídas que incluem um CAR anti-Axl, o CAR é um CAB-CAR e, em modalidades ilustrativas não limitativas, pode incluir, por exemplo, qualquer um dos componentes CAB-CAR e CAB-CARs fornecidos na Tabela 1 que demonstrou atividade citotóxica. Por exemplo, o CAB-CAR anti-Axl

5 pode incluir um peptídeo de sinalização CD8, um domínio stalk/transmembranar CD8 ou CD28, um CD137, ICA, ou um domínio coestimulador IC4 e um domínio coestimulador CD137 e/ou um domínio de ativação CD3Z. Além disso, os CAR ilustrativos para qualquer uma das modalidades aqui incluídas que incluem um CAR anti-Axl e especialmente um CAB-CAR anti-Axl, em modalidades

10 ilustrativas não limitativas incluem qualquer CAB-CARs anti-Axl que demonstrou atividade citotóxica condicional na Tabela 1. Tais CAB-CARs ilustrativos incluem F1-2-1, F1-2-2, F1-2-3, F1-2-6, F1-2-8, F1-2-10, F1-2-13, F1-2-14, F1-2-15, F1-2-22, ou F1-2-23 da Tabela 1. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um ASTR, o ASTR pode incluir o ASTR de F1-2-1, F1-2-2, F1-2-3, F1-2-6, F1-2-

15 8, F1-2-10, F1-2-13, F1-2-14, F1-2-15 F1-2-22 ou F1-2-23. Além disso, os CAR ilustrativos para qualquer uma das modalidades da presente invenção que incluem um CAR anti-Axl e especialmente um CAB-CAR anti-Axl, em modalidades ilustrativas não limitativas incluem qualquer CAB-CARs anti-Axl que demonstrou alta atividade citotóxica condicional na Tabela 1. Tais CAB-

20 CARs ilustrativos incluem F1-2-13, F1-2-15, F1-2-22 ou F1-2-23. Consequentemente, em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um ASTR, o ASTR pode incluir o ASTR de F1-2-1, F1-2-2, F1-2-3, F1-2-6, F1-2-8, F1-2-10, F1-2-13, F1-2-14, F1-2-15, F1-2-22 ou F1-2-23.

[498] Exemplos de CARs condicionalmente ativos (CAB-CARs)

25 que têm ligação aumentada a Ror2 a pH 6,7 em comparação com pH 7,4 são encontrados no Exemplo 1 aqui. Em modalidades ilustrativas, o CAR ou ASTR podem ligar-se ao mesmo epítipo de Ror2 como um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 82 ou SEQ ID NO: 83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID

30 NO: 84 ou o CAR ou ASTR podem ligar-se ao mesmo epítipo de Ror2 como um

fragmento de anticorpo variável de cadeia simples que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 152. Em modalidades adicionais de tais modalidades ilustrativas, o CAR anti-Ror2 ou ASTR compreende ou um fragmento variável de cadeia simples (scFv) e em exemplos ilustrativos adicionais, compreende uma cadeia leve que está N-terminal em relação a uma cadeia pesada, ou compreende uma cadeia pesada que está N-terminal em relação a uma cadeia leve. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um CAR ou ASTR, e em modalidades ilustrativas liga-se ao mesmo epítipo de Ror2 como um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 82 ou SEQ ID NO: 83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 84 ou se liga ao mesmo epítipo de Ror2 como um fragmento de anticorpo variável de cadeia simples que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO: 152, O ASTR pode incluir qualquer uma das SEQ ID NO: 130-132 ou 153-158. Além disso, CARs anti-Ror2 de qualquer uma das modalidades aqui descritas podem incluir qualquer um dos componentes CAR aqui fornecidos. Em certas modalidades exemplificativas, os CARs anti-Ror2 podem incluir os componentes do CAR listados na Tabela 2 e podem ser qualquer um dos CARs na Tabela 2. Mais tipicamente para quaisquer modalidades aqui incluídas que incluem um CAR anti-Ror2, o CAR é um CAB-CAR e, em modalidades ilustrativas não limitativas, pode incluir, por exemplo, qualquer um dos componentes CAB-CAR e CAB-CARs fornecidos na Tabela 2 que demonstrou atividade citotóxica. Por exemplo, o CAB-CAR anti-Ror2 pode incluir um peptídeo de sinalização CD8, um domínio de stalk/transmembrana CD8 ou CD28, um domínio coestimulador CD137 e/ou um domínio de ativação CD3Z. Além disso, os CARs ilustrativos para qualquer uma das modalidades aqui, que incluem uma CAR anti-Ror2 e especialmente uma CAB-CAR anti-Ror2, em modalidades ilustrativas não limitativas incluem qualquer CAB-CARs anti-Ror2 que demonstrou atividade citotóxica condicional na Tabela. 2 Tais CAB-CARs ilustrativos incluem F1-1-9, F1-1-10, F1-1-11, F1-

1-12, F1-1-15, F1-1-17, F1-1-18, F1-1-19, F1-1-20, F1-1-21, F1-1-23, F1-1-25 ou F1-1-26. Em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um ASTR anti-Ror2, o ASTR pode incluir o ASTR de F1-1-9, F1-1-10, F1-1-11, F1-1-12, F1-1-15, F1-1-17, F1-1-18, F1-1-19, F1-1-20, F1-1-21, F1-1-23, F1-1-25 ou F1-1-26 da Tabela 2. Além disso, os CARs ilustrativos para qualquer uma das modalidades aqui que incluem um CAR anti-Ror2 e especialmente um CAB-CAR anti-Ror2, em modalidades ilustrativas não limitativas incluem qualquer CAB-CARs anti-Ror2 que demonstrou alta atividade citotóxica condicional na Tabela 2. Tais CAB-CARs ilustrativos incluem F1-1-11, F1-1-12, F1-1-15, F1-1-17, F1-1-19, F1-1-20 ou F1-1-23. Consequentemente, em qualquer uma das modalidades aqui que inclui um ASTR anti-Ror2, o ASTR pode incluir o ASTR de F1-1-11, F1-1-12, F1-1-15, F1-1-17, F1-1-19, F1-1-20, F1-1-23.

[499] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método para modular a ligação de uma célula T ou célula NK que expressa o receptor de antígeno quimérico condicionalmente ativo (CAB-CAR) condicionalmente a uma célula que expressa um antígeno cognato do CAB-CAR em um indivíduo, incluindo:

[500] a. introduzir uma célula T e/ou célula NK incluindo um ácido nucleico que codifica o CAB-CAR no indivíduo, em que após a introdução, a célula T e/ou a célula NK incluindo o ácido nucleico que codifica o CAB-CAR expressa o CAB-CAR e se liga à célula que expressa o antígeno cognato no indivíduo, e em que o antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo; e

[501] b. administrar um agente farmacológico ao indivíduo em quantidade suficiente para aumentar o pH sanguíneo e/ou o pH de um tecido e/ou pH de um microambiente, em que a administração é realizada antes, durante ou após a introdução e em que o pH aumentado do sangue, do tecido e/ou do microambiente modulam a ligação da célula T e/ou célula NK que expressa CAB-CAR à célula que expressa o antígeno cognato no sangue, no tecido ou no microambiente com o aumento do pH.

[502] Em um outro aspecto, é fornecido aqui um método para

aliviar uma toxicidade de tumor fora do alvo em um indivíduo, incluindo:

[503] a. introduzir um ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico biológico condicionalmente ativo (CAB-CAR) em uma célula T ou célula NK do indivíduo para produzir uma célula T e/ou célula NK incluindo um ácido nucleico que codifica o CAB-CAR;

[504] b. introduzir a célula T e/ou célula NK incluindo o ácido nucleico que codifica o CAB-CAR no indivíduo, em que após a introdução, a célula T e/ou a célula NK incluindo o ácido nucleico que codifica o CAB-CAR expressa o CAB-CAR e se liga à célula que expressa um antígeno cognato no indivíduo, em que o antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um epítopo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítopo do mesmo; e

[505] c. administrar um agente farmacológico ao indivíduo em quantidade suficiente para aumentar o pH sanguíneo e/ou o pH de um tecido e/ou pH de um microambiente para modular a ligação do CAB-CAR ao seu antígeno cognato no sangue, no tecido e/ou o microambiente com o aumento do pH, aliviando assim o alvo da toxicidade do tumor no indivíduo.

[506] Em algumas modalidades, o ácido nucleico pode ser um vetor. Em modalidades ilustrativas, o vetor é um retroviral vetor.

[507] Em um outro aspecto, é fornecido aqui um método para controlar a ligação de uma célula T e/ou célula NK a uma célula-alvo de mamífero, incluindo:

[508] a. colocar a célula-alvo de mamífero em contato com a célula T e/ou célula NK em um microambiente, em que a célula-alvo de mamífero expressa um antígeno cognato, e a célula T e/ou célula NK expressa um receptor de antígeno quimérico biológico condicionalmente ativo (CAB-CAR) que se liga ao antígeno cognato diferencialmente a pH 6,7 em comparação com pH 7,4, em que o antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um epítopo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítopo do mesmo; e

[509] b. aumentar o pH do microambiente por meio da introdução de um agente farmacológico no microambiente em uma quantidade suficiente,

controlando assim a ligação da célula T e/ou célula NK à célula-alvo de mamífero.

[510] Em um outro aspecto, é fornecido aqui um método para controlar a ligação da uma célula T e/ou célula NK que expressa um receptor de antígeno quimérico biológico condicionalmente ativo (CAB-CAR) a uma célula-alvo de mamífero em um indivíduo *in vivo*, incluindo administrar um agente farmacológico modulador de pH ao indivíduo através de um regime de dosagem eficaz que aumenta o pH de um microambiente em um indivíduo, em que o indivíduo inclui a célula T e/ou a célula NK que expressa o CAB-CAR, em que o CAB-CAR se liga ao seu antígeno cognato diferencialmente a pH 6,7 em comparação com pH 7,4, em que o antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo, em que o microambiente inclui a célula-alvo de mamífero, em que a célula-alvo de mamífero expressa o antígeno cognato em sua superfície, e em que a célula T e/ou célula NK se liga à célula-alvo de mamífero diferencialmente antes versus depois de o pH do microambiente ser aumentado, controlando assim a ligação da célula T e/ou célula NK à célula-alvo de mamífero em um indivíduo *in vivo*.

[511] Em qualquer um dos aspectos fornecidos imediatamente acima, que incluem um agente farmacológico e um CAB-CAR, o CAB-CAR pode reduzir a ligação ao seu antígeno cognato em um pH do que em um pH diferente. Em modalidades ilustrativas em que os valores de pH ilustrativos para ligação diferencial de um CAB-CAR não são já fornecidos no aspecto mais amplo e alternativamente para outras modalidades em vez dos valores para tais aspectos, o CAB-CAR pode ter uma ligação reduzida a um pH mais elevado do que a um pH mais baixo. Por exemplo, o CAB-CAR pode ter ligação reduzida ao seu antígeno cognato a um pH acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ou 7,5 do que em um pH abaixo de 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ou 7,0. Em outras modalidades, o CAB-CAR pode ter uma ligação reduzida a um pH mais elevado do que a um pH mais baixo. Por exemplo, o CAB-CAR pode ter ligação reduzida ao seu antígeno cognato a um pH abaixo de 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ou 7,0 do que a um pH

acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ou 7,5. Em algumas modalidades ilustrativas, o CAB-CAR exibe ligação aumentada a um pH de 6,5 a 6,7 em comparação com pH 7,4 a 7,6. Em outras modalidades ilustrativas, o CAB-CAR exibe ligação aumentada a um pH de 6,7 em comparação com um pH de 7,4. Em outras modalidades, o CAB-CAR exibe ligação aumentada no pH de um tumor em comparação com o pH do sangue. Em algumas modalidades, o CAB-CAR pode incluir uma região de direcionamento específica do antígeno, um stalk e um domínio de ativação intracelular. Em algumas modalidades, o CAB-CAR também pode incluir um domínio coestimulador. Em algumas modalidades, o CAB-CAR pode se ligar a um antígeno associado ao tumor.

[512] Em qualquer dos aspectos fornecidos imediatamente acima que incluem um agente farmacológico e um CAB-CAR, o pH do microambiente pode ser aumentado de um pH abaixo de 7,0 para um pH acima de 7,0. Por exemplo, o pH pode ser aumentado a partir de um pH abaixo de 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ou 7,0 para um pH acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 ou 7,4. Em algumas modalidades, o CAB-CAR pode se ligar ao antígeno cognato no aumento do pH, mas não no pH do microambiente antes da introdução do agente farmacológico. Em certas modalidades, o pH pode ser aumentado de abaixo de 7,0 para um pH de 7,1 a 8,0 ou para um pH de 7,1 a 7,8 ou para um pH de 7,2 a 7,8 ou um pH de 7,2 a 7,6 ou um pH de 7,3 a 7,6 ou a um pH de 7,4 a 7,8 ou a um pH de 7,4 a 7,6. Tal aumento no pH pode ocorrer por menos de 1, 2, 4, 6, 8, 12 ou 24 horas ou por mais de 1, 2, 4, 6, 8, 12 ou 24 horas, dependendo do tipo e dose de agente farmacológico administrado. Em certas modalidades, o agente farmacológico administrado é tal modo que o pH permanece acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ou 7,5; ou entre 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 no limite inferior do intervalo e 7,4, 7,5, 7,6, 7,7 ou 7,8 no limite superior do intervalo, no tecido-alvo, tal como um tumor e, por exemplo, em pelo menos uma superfície de um microambiente de tecido-alvo (por exemplo, tumor), em pelo menos uma porção de um microambiente de tecido-alvo (por exemplo, tumor), e em modalidades ilustrativas ao longo de um microambiente de tecido-alvo (por exemplo, tumor).

[513] Em qualquer um dos aspectos fornecidos imediatamente acima, que incluem um agente farmacológico e um CAB-CAR, o microambiente pode ser um microambiente *in vivo*, como um tumor, um tecido, um tecido não tumoral, um tecido normal ou um tecido que sofreu um desvio transitório do pH.

5 Por exemplo, os tecidos que tipicamente sofrem alterações transitórias do pH incluem um tecido muscular em condições anaeróbicas ou tecido muscular submetido a exercício ou um tecido inflamado ou um tecido a experimentar inflamação. Em algumas modalidades que incluem uma célula-alvo de mamífero, a célula-alvo de mamífero pode ser uma célula tumoral ou uma célula não  
10 tumoral ou normal.

[514] Em qualquer um dos aspectos fornecidos imediatamente acima que incluem um agente farmacológico e um CAB-CAR, o agente farmacológico pode ser bicarbonato de sódio, tris-hidroximetilaminometano, uma solução hipertônica equimolar de bicarbonato de sódio e carbonato de  
15 sódio, ou inibidores da bomba de prótons tais esomeprazol, esomeprazol e naproxeno, lansoprazol, omeprazol e rabeprazol.

[515] Em qualquer modalidade fornecida imediatamente acima que inclui uma partícula retroviral recombinante incompetente para replicação em um método que inclui um CAB-CAR e um agente farmacológico, o  
20 polinucleotídeo que inclui uma unidade de transcrição operativamente ligada a um promotor ativo em células T e/ou células NK que codificam o CAB-CAR é absorvida pela célula T (ou células T) e/ou célula NK (ou células NK) de modo que essa célula (ou células) tenha a capacidade de expressar o CAB-CAR. Em modalidades ilustrativas, a célula T (ou células) e/ou célula NK (ou células NK)  
25 integram o polinucleotídeo a seu genoma.

[516] Em qualquer modalidade fornecida imediatamente acima que inclui uma partícula retroviral recombinante incompetente de replicação em um método que inclui um CAB-CAR e um agente farmacológico, a partícula retroviral recombinante incompetente de replicação pode incluir em sua  
30 superfície um domínio de reconhecimento de um anticorpo monoclonal aprovado

biológico. Por exemplo, o domínio de reconhecimento pode incluir um polipeptídeo que é reconhecido por um anticorpo que reconhece EGFR, ou um epítipo do mesmo.

[517] Em um outro aspecto, é fornecido aqui um agente farmacológico modulador de pH para uso em um método para controlar a ligação de a célula T e/ou célula NK a uma célula-alvo de mamífero em um indivíduo *in vivo*, incluindo administrar o agente farmacológico modulador de pH ao indivíduo através de um regime de dosagem eficaz que aumenta o pH de um microambiente em um indivíduo, em que o indivíduo inclui a célula T e/ou a célula NK, em que a célula T e/ou célula NK expressa um receptor de antígeno quimérico biológico condicionalmente ativo (CAB-CAR) que se liga a seu antígeno cognato diferencialmente a pH 6,7 em comparação com pH 7,4, em que o antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo, em que a célula T e/ou célula NK expressa o CAB-CAR, em que o microambiente inclui a célula-alvo de mamífero, em que a célula-alvo de mamífero expressa o antígeno cognato em sua superfície, e em que a célula T e/ou célula NK se liga à célula-alvo de mamífero diferencialmente antes versus depois de o pH do microambiente ser aumentado pela administração do agente farmacológico modulador de pH controlando assim a ligação da célula T e/ou célula NK à célula-alvo de mamífero em um indivíduo *in vivo*.

[518] Em um outro aspecto, é fornecido aqui um agente farmacológico para uso em um método para modular a ligação de um receptor de antígeno quimérico biológico condicionalmente ativo (CAB-CAR) que expressa célula T ou célula NK a uma célula que expressa um antígeno cognato do CAB-CAR em um indivíduo, para tratar crescimento de tumor, em que o método inclui:

[519] a. introduzir uma célula T e/ou célula NK com capacidade de expressar o CAB-CAR no indivíduo, em que o antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um

epítopo do mesmo, em que o CAB-CAR se liga à célula que expressa o antígeno cognato no indivíduo, em que após a introdução, a célula T e/ou a célula NK que inclui o ácido nucleico que codifica o CAB-CAR expressa o CAB-CAR e se liga à célula que expressa o antígeno cognato no indivíduo; e

5           [520]       b. administrar o agente farmacológico ao indivíduo em quantidade suficiente para aumentar o pH sanguíneo e/ou um pH tecidual e/ou um pH do microambiente para modular a ligação da célula T que expressa CAB-CAR e/ou célula NK que expressa o antígeno cognato no sangue, no tecido ou no microambiente com o aumento do pH.

10          [521]       Em um outro aspecto, é fornecido aqui um agente farmacológico para uso em um método para aliviar a toxicidade de tumor fora do alvo em um indivíduo, em que o método inclui:

            [522]       a. introduzir um ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico biológico condicionalmente ativo (CAB-CAR) em uma célula  
15   T ou célula NK do indivíduo, para produzir uma célula T e/ou célula NK com capacidade de expressar o CAB-CAR;

            [523]       b. introduzir a célula T e/ou célula NK com capacidade de expressar o CAB-CAR no indivíduo, em que após a introdução, a célula T e/ou a célula NK que inclui o ácido nucleico que codifica o CAB-CAR expressa o CAB-  
20   CAR e se liga à célula que expressa o antígeno cognato no indivíduo; e

            [524]       c. administrar o agente farmacológico ao indivíduo em uma quantidade suficiente para aumentar o pH sanguíneo e/ou pH tecidual e/ou um microambiente pH para modular a ligação do CAB-CAR a um antígeno cognato no sangue, no tecido e/ou no microambiente com o pH aumentado, em que o  
25   antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um epítopo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítopo do mesmo, aliviando assim a toxicidade de tumor fora do alvo no indivíduo.

            [525]       Em um outro aspecto, é fornecido aqui um agente farmacológico para uso em um método para controlar a ligação de uma célula T  
30   e/ou célula NK que expressa um receptor de antígeno quimérico biológico

condicionalmente ativo (CAB-CAR) a uma célula-alvo de mamífero, para tratar crescimento de tumor, em que o método inclui:

[526] a. colocar a célula-alvo de mamífero em contato com a célula T e/ou célula NK que expressa o CAB-CAR em um microambiente, em que a célula-alvo de mamífero expressa um antígeno cognato, em que o antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo, e em que a célula T e/ou célula NK expressa o CAB-CAR que se liga ao antígeno cognato diferencialmente a pH 6,7 em comparação com pH 7,4; e

[527] b. aumentar o pH do microambiente através da introdução do agente farmacológico no microambiente em quantidade suficiente, controlando desse modo a ligação da célula T e/ou da célula NK que expressa o CAB-CAR na célula-alvo de mamífero.

[528] Em um outro aspecto, é fornecido aqui um agente farmacológico para uso em um método para controlar a ligação de a célula T e/ou célula NK que expressa um receptor de antígeno quimérico biológico condicionalmente ativo (CAB-CAR) a uma célula-alvo de mamífero em um indivíduo *in vivo*, para tratar crescimento de tumor, em que o agente farmacológico é um agente farmacológico modulador de pH, e em que o método inclui administrar o agente farmacológico modulador de pH ao indivíduo através de um regime de dosagem eficaz que aumenta o pH de um microambiente em um indivíduo, em que o indivíduo inclui a célula T e/ou célula NK que expressa CAB-CAR, em que o CAB-CAR se liga a seu antígeno cognato diferencialmente a pH 6,7 em comparação com pH 7,4, em que o antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo, em que o microambiente inclui a célula-alvo de mamífero, em que a célula-alvo de mamífero expressa o antígeno cognato em sua superfície, e em que a célula T e/ou célula NK se liga à célula-alvo de mamífero diferencialmente antes versus após o pH do microambiente ser aumentado.

[529] Em um outro aspecto, é fornecido aqui um agente

farmacológico modulador de pH para uso em um método para controlar a ligação de uma célula T e/ou célula NK que expressa um receptor de antígeno quimérico biológico condicionalmente ativo (CAB-CAR) a uma célula-alvo de mamífero em um indivíduo *in vivo*, para tratar crescimento de tumor, em que o método inclui

5 administrar o agente farmacológico modulador de pH ao indivíduo através de um regime de dosagem eficaz que aumenta o pH de um microambiente em um indivíduo, em que o indivíduo inclui a célula T e/ou célula NK que expressa o CAB-CAR, em que o CAB-CAR se liga a seu antígeno cognato diferencialmente a pH 6,7 em comparação com pH 7,4, em que o antígeno cognato é um

10 polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo, em que o microambiente inclui a célula-alvo de mamífero, em que a célula-alvo de mamífero expressa o antígeno cognato em sua superfície, e em que a célula T e/ou célula NK se liga à célula-alvo de mamífero diferencialmente antes versus após o pH do microambiente ser aumentado pela

15 administração do agente farmacológico modulador de pH.

[530] Em um outro aspecto, é fornecido aqui um uso de um agente farmacológico modulador de pH para uso na fabricação de um medicamento para controlar uma ligação de uma célula T e/ou célula NK que expressa um receptor de antígeno quimérico biológico condicionalmente ativo (CAB-CAR) a

20 uma célula-alvo de mamífero em um indivíduo *in vivo*, em que o agente farmacológico modulador de pH deve ser administrado ao indivíduo através de um regime de dosagem eficaz que aumenta o pH de um microambiente em um indivíduo, em que o indivíduo inclui a célula T e/ou célula NK que expressa o CAB-CAR, em que o CAB-CAR se liga a seu antígeno cognato diferencialmente

25 a pH 6,7 em comparação com pH 7,4, em que o antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo, em que o microambiente inclui a célula-alvo de mamífero, em que a célula-alvo de mamífero expresse o antígeno cognato em sua superfície, e em que a célula T se liga à célula-alvo de mamífero diferencialmente

30 antes versus após o pH do microambiente é aumentado pela administração do

agente farmacológico modulador de pH.

[531] Em qualquer um dos aspectos imediatamente acima que inclui um agente farmacológico modulador de pH ou um agente farmacológico para uso em um método e um CAB-CAR ou inclui o uso de um agente farmacológico modulador de pH e um CAB-CAR, o CAB-CAR pode ter ligação 5 reduzida a seu antígeno cognato a um pH diferente daquele pH. Em modalidades ilustrativas em que os valores de pH ilustrativos para ligação diferencial de um CAB-CAR não são já fornecidos no aspecto mais amplo e alternativamente para outras modalidades em vez dos valores para tais aspectos, o CAB-CAR pode ter uma ligação reduzida a um pH mais elevado do que a um pH mais baixo. Por 10 exemplo, o CAB-CAR pode ter ligação reduzida ao seu antígeno cognato a um pH acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ou 7,5 do que em um pH abaixo de 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ou 7,0. Em outras modalidades, o CAB-CAR pode ter uma ligação reduzida a um pH mais elevado do que a um pH mais baixo. Por exemplo, 15 o CAB-CAR pode ter ligação reduzida ao seu antígeno cognato a um pH abaixo de 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ou 7,0 do que a um pH acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ou 7,5. Em algumas modalidades ilustrativas, o CAB-CAR exibe ligação aumentada a um pH de 6,5 a 6,7 em comparação com pH 7,4 a 7,6. Em outras modalidades ilustrativas, o CAB-CAR exibe ligação aumentada a um pH de 6,7 20 em comparação com um pH de 7,4. Em outras modalidades, o CAB-CAR exibe ligação aumentada no pH de um tumor em comparação com o pH do sangue. Em algumas modalidades, o CAB-CAR pode incluir uma região de direcionamento específica do antígeno, um stalk e um domínio de ativação intracelular. Em algumas modalidades, o CAB-CAR também pode incluir um 25 domínio coestimulador. Em algumas modalidades, o CAB-CAR pode se ligar a um antígeno associado ao tumor.

[532] Em qualquer um dos aspectos imediatamente acima que incluem um agente farmacológico modulador de pH ou um agente farmacológico para uso em um método e um CAB-CAR ou incluem o uso de um agente 30 farmacológico modulador de pH e um CAB-CAR, o pH do microambiente pode

ser aumentando de um pH abaixo de 7,0 para um pH acima de 7,0. Por exemplo, o pH pode ser aumentado a partir de um pH abaixo de 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ou 7,0 para um pH acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 ou 7,4. Em algumas modalidades, o CAB-CAR pode se ligar ao antígeno cognato no aumento do pH, mas não no pH do microambiente antes da introdução do agente farmacológico. Em certas modalidades, o pH pode ser aumentado de abaixo de 7,0 para um pH de 7,1 a 8,0 ou para um pH de 7,1 a 7,8 ou para um pH de 7,2 a 7,8 ou um pH de 7,2 a 7,6 ou um pH de 7,3 a 7,6 ou a um pH de 7,4 a 7,8 ou a um pH de 7,4 a 7,6. Tal aumento no pH pode ocorrer por menos de 1, 2, 4, 6, 8, 12 ou 24 horas ou por mais de 1, 2, 4, 6, 8, 12 ou 24 horas, dependendo do tipo e dose de agente farmacológico administrado. Em certas modalidades, o agente farmacológico administrado é tal modo que o pH permanece acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ou 7,5; ou entre 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 no limite inferior do intervalo e 7,4, 7,5, 7,6, 7,7 ou 7,8 no limite superior do intervalo, no tecido-alvo, tal como um tumor e, por exemplo, em pelo menos uma superfície de um microambiente de tecido-alvo (por exemplo, tumor), em pelo menos uma porção de um microambiente de tecido-alvo (por exemplo, tumor), e em modalidades ilustrativas ao longo de um microambiente de tecido-alvo (por exemplo, tumor).

[533] Em qualquer um dos aspectos imediatamente acima que incluem um agente farmacológico modulador de pH ou um agente farmacológico para uso em um método e um CAB-CAR ou incluem o uso de um agente farmacológico modulador de pH e um CAB-CAR, em que o antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo; o microambiente pode ser um microambiente *in vivo*, como um tumor, um tecido, um tecido não tumoral, um tecido normal, ou um tecido que sofreu um desvio transitório do pH. Por exemplo, os tecidos que tipicamente sofrem alterações transitórias do pH incluem um tecido muscular em condições anaeróbicas ou tecido muscular submetido a exercício ou um tecido inflamado ou um tecido a experimentar inflamação. Em algumas modalidades que incluem uma célula-alvo de mamífero, a célula-alvo de mamífero pode ser uma célula

tumoral ou uma célula não tumoral ou normal.

[534] Em qualquer um dos aspectos imediatamente acima que incluem um agente farmacológico modulador de pH ou um agente farmacológico para uso em um método e um CAB-CAR ou incluem o uso de um agente  
5 farmacológico modulador de pH e um CAB-CAR, em que o antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo, o agente farmacológico pode ser bicarbonato de sódio, tris-hidroximetilaminometano, uma solução hipertônica equimolar de bicarbonato de sódio e carbonato de sódio, ou inibidores da bomba de prótons tais como  
10 esomeprazol, esomeprazol e naproxeno, lansoprazol, omeprazol, e rabeprazol.

[535] Em qualquer um dos aspectos imediatamente acima que incluem um agente farmacológico modulador de pH ou um agente farmacológico para uso em um método e um CAB-CAR ou incluem o uso de um agente farmacológico modulador de pH e um CAB-CAR, em que o antígeno cognato é  
15 um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo, o agente farmacológico pode ser usado em um método para o tratamento de câncer, tumores, crescimento tumoral ou distúrbio proliferativo celular.

[536] Em um outro aspecto, é fornecido aqui um kit que contém  
20 um recipiente que contém uma partícula retroviral recombinante incompetente de replicação, e instruções para uso do mesmo para tratar crescimento de tumor, em que as instruções instruem um método para controlar a ligação de uma célula T e/ou célula NK a uma célula-alvo de mamífero, em um método que inclui:

[537] a. transduzir a célula T e/ou célula NK com a partícula  
25 retroviral recombinante incompetente de replicação que inclui em seu genoma um receptor de antígeno quimérico biológico condicionalmente ativo (CAB-CAR) que se liga ao antígeno cognato diferencialmente a pH 6,7 em comparação com pH 7,4 para produzir uma célula T e/ou célula NK com capacidade de expressar o CAB-CAR, em que o antígeno cognato é um polipeptídeo Axl ou um epítipo  
30 do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo;

[538] b. introduzir a célula T e/ou célula NK com capacidade de expressar o CAB-CAR no indivíduo, em que após a introdução, a célula T e/ou a célula NK que inclui o ácido nucleico que codifica o CAB-CAR expressa o CAB-CAR e se liga à célula que expressa o antígeno cognato no indivíduo;

5 [539] c. colocar a célula-alvo de mamífero em contato com a célula T que expressa CAB-CAR e/ou célula NK em um microambiente, em que a célula-alvo de mamífero expressa um antígeno cognato do CAB-CAR, e a célula T e/ou célula NK expressa o CAB-CAR; e

[540] d. aumentar o pH do microambiente através da introdução  
10 de um agente farmacológico modulador de pH no microambiente em quantidade suficiente, afetando desse modo a ligação da célula-alvo de mamífero com a célula T e ou célula NK.

[541] Em algumas modalidades, o kit pode incluir adicionalmente um agente farmacológico modulador de pH.

15 [542] Em algumas modalidades do kit, o CAB-CAR pode ter ligação reduzida a um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo a um pH do que em um pH diferente. Em modalidades ilustrativas em que os valores de pH ilustrativos para ligação diferencial de um CAB-CAR não são já fornecidos no aspecto mais amplo e  
20 alternativamente para outras modalidades em vez dos valores para tais aspectos, o CAB-CAR pode ter uma ligação reduzida a um pH mais elevado do que a um pH mais baixo. Por exemplo, o CAB-CAR pode ter ligação reduzida ao seu antígeno cognato a um pH acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ou 7,5 do que em um pH abaixo de 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ou 7,0. Em outras modalidades, o  
25 CAB-CAR pode ter uma ligação reduzida a um pH mais elevado do que a um pH mais baixo. Por exemplo, o CAB-CAR pode ter ligação reduzida ao seu antígeno cognato a um pH abaixo de 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ou 7,0 do que a um pH acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ou 7,5. Em algumas modalidades ilustrativas, o CAB-CAR exibe ligação aumentada a um pH de 6,5 a 6,7 em comparação com  
30 pH 7,4 a 7,6. Em outras modalidades ilustrativas, o CAB-CAR exibe ligação

aumentada a um pH de 6,7 em comparação com um pH de 7,4. Em outras modalidades, o CAB-CAR exibe ligação aumentada no pH de um tumor em comparação com o pH do sangue. Em algumas modalidades, o CAB-CAR pode incluir uma região de direcionamento específica do antígeno, um stalk e um domínio de ativação intracelular. Em algumas modalidades, o CAB-CAR também pode incluir um domínio coestimulador. Em algumas modalidades, o CAB-CAR pode se ligar a um antígeno associado ao tumor.

[543] Em algumas modalidades do kit, o pH do microambiente pode ser aumentado de um pH abaixo de 7,0 para um pH acima de 7,0. Por exemplo, o pH pode ser aumentado a partir de um pH abaixo de 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ou 7,0 para um pH acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 ou 7,4. Em algumas modalidades, o CAB-CAR pode se ligar ao antígeno cognato no aumento do pH, mas não no pH do microambiente antes da introdução do agente farmacológico. Em certas modalidades, o pH pode ser aumentado de abaixo de 7,0 para um pH de 7,1 a 8,0 ou para um pH de 7,1 a 7,8 ou para um pH de 7,2 a 7,8 ou um pH de 7,2 a 7,6 ou um pH de 7,3 a 7,6 ou a um pH de 7,4 a 7,8 ou a um pH de 7,4 a 7,6. Tal aumento no pH pode ocorrer por menos de 1, 2, 4, 6, 8, 12 ou 24 horas ou por mais de 1, 2, 4, 6, 8, 12 ou 24 horas, dependendo do tipo e dose de agente farmacológico administrado. Em certas modalidades, o agente farmacológico administrado é tal modo que o pH permanece acima de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ou 7,5; ou entre 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 no limite inferior do intervalo e 7,4, 7,5, 7,6, 7,7 ou 7,8 no limite superior do intervalo, no tecido-alvo, tal como um tumor e, por exemplo, em pelo menos uma superfície de um microambiente de tecido-alvo (por exemplo, tumor), em pelo menos uma porção de um microambiente de tecido-alvo (por exemplo, tumor), e em modalidades ilustrativas ao longo de um microambiente de tecido-alvo (por exemplo, tumor). Em algumas modalidades, o microambiente pode ser um microambiente *in vivo*, como um tumor, um tecido, um tecido não tumoral, um tecido normal, ou um tecido que sofreu um desvio transitório do pH. Por exemplo, os tecidos que tipicamente sofrem alterações transitórias do pH incluem um tecido muscular em condições anaeróbicas ou

tecido muscular submetido a exercício ou um tecido inflamado ou um tecido a experimentar inflamação. Em algumas modalidades que incluem uma célula-alvo de mamífero, a célula-alvo de mamífero pode ser uma célula tumoral ou uma célula não tumoral ou normal.

5           [544]       Em algumas modalidades do kit, o agente farmacológico pode ser bicarbonato de sódio, tris-hidroximetilaminometano, uma solução hipertônica equimolar de bicarbonato de sódio e carbonato de sódio, ou inibidores da bomba de prótons como esomeprazol, esomeprazol e naproxeno, lansoprazol, omeprazol e rabeprazol.

10           [545]       Conforme revelado acima, o antígeno cognato a qual o CAB-CAR se liga pode ser um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo. Em algumas modalidades, o antígeno cognato pode ser um polipeptídeo com pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de  
15   identidade de sequência com um estiramento de pelo menos 10, 15, 20, ou todos os aminoácidos de um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo ou a um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo. Como aqui revelado, o CAB-CAR com capacidade de se ligar a um polipeptídeo Axl ou um epítipo do mesmo, ou um polipeptídeo Ror2 ou um epítipo do mesmo tipicamente liga o seu antígeno  
20   cognato com uma maior afinidade de ligação a um pH de 6,7 do que um pH de 7,4.

              [546]       Um especialista reconhecerá que quando o relatório descritivo se refere a “Axl CAB” ou “Axl CAB-CAR”, o “Axl” se refere a um ASTR que reconhece Axl ou um epítipo do mesmo. De modo similar, um versado na  
25   técnica reconhecerá que quando o relatório descritivo se refere a “Ror2 CAB” ou “Ror2 CAB-CAR”, o “Ror2” se refere a um ASTR que reconhece Ror2 ou um epítipo do mesmo.

              [547]       Quaisquer cabeçalhos de seção usados aqui são apenas para fins organizacionais e não devem ser interpretados como limitando de  
30   qualquer forma a matéria descrita.

### Exemplos

[548] Os exemplos seguintes são apresentados de modo a fornecer aos versado na técnica uma revelação e descrição completas de como produzir e usar a presente invenção, e não pretendem limitar o escopo do que os inventores consideram como sendo a sua invenção, nem pretendem representar que os experimentos abaixo são todos ou os únicos experimentos realizados. Esforços têm sido feitos para assegurar precisão em relação aos números usados (por exemplo, quantidades, temperatura, etc.), mas alguns erros e desvios experimentais devem ser levados em conta. Salvo indicação em contrário, as partes são partes em peso, o peso molecular é o peso molecular médio ponderado, a temperatura é em graus Celsius e a pressão é próxima da atmosférica. Abreviaturas padrão podem ser usadas, por exemplo, bp, par de base (ou pares de base); kb, quilobase (ou quilobases); pl, picolitro (ou picolitros); s ou seg, segundo (ou segundos); min, minuto (ou minutos); h, hora (ou horas); aa, aminoácido (ou aminoácidos); kb, quilobase (ou quilobases); pb, par de bases (ou pares de base); nt, nucleotídeo (ou nucleotídeos); i.m., intramuscularmente; i.p., intraperitonealmente; s.c., subcutaneamente; i.v., intravenosamente; e similares.

#### Exemplo 1: produção e análise de receptores de antígeno quimérico para direcionamento de Axl e Ror2

[549] Esse exemplo demonstra métodos para produzir e usar CARs condicionalmente ativos de certas modalidades da presente invenção. Ácidos nucleicos que codificam ASTRs condicionalmente ativos visando Axl e Ror2 foram obtidos e usados para gerar vetores de expressão lentivirais codificando CARs condicionalmente ativos. As células T foram transduzidas com lentivírus contendo esses vetores de expressão e as células transduzidas foram testadas em vários ensaios substitutos de tumores *in vitro* contra células-alvo.

Geração de vetores de expressão lentiviral expressando CAR ativo condicionalmente

[550] Um ácido nucleico que codifica para um ASTR direcionador

ASTER condicionalmente ativo (um construto scFv contendo SEQ ID NOs: 79 e 80) e 3 ácidos nucleicos codificando ASTRs condicionalmente ativos de direcionamento de Ror2 (um construto scFv contendo SEQ ID NOs: 83 e 84, um construto scFv contendo SEQ ID NOs: 82 e 84, e um construto de scFv contendo

5 SEQ ID NOs: 151 e 152) foram obtidos. A descrição detalhada aqui fornece métodos para produzir ASTRs condicionalmente ativos (algumas vezes referidos como biológicos condicionalmente ativos (CABs)), incluindo métodos para fazer CABs através da evolução e seleção de fragmentos de anticorpos que foram usados para fazer os CABs que foram obtidos. Pequenas modificações nas

10 sequências foram realizadas, incluindo a otimização de códons para expressão em células humanas e a remoção de sítios de doadores e receptores. As cadeias pesadas dos anticorpos de cadeia única (SEQ ID NO: 79, 83 e 82) e as cadeias leves dos anticorpos de cadeia única (SEQ ID NOs: 80 e 84) foram unidas por ligantes de vários comprimentos (SEQ ID NO: 53, 54, e 55) e incorporados em

15 vetores de expressão lentiviral com os outros domínios para tornar os CARs candidatos listados nas Tabelas 1 e 2.

#### Produção de lentivírus

[551] Os lentivírus foram produzidos por transfecção transiente de células 293T (Lenti-X 293T, Clontech) com os vetores de expressão lentivirais.

20 As células foram adaptadas a cultura de suspensão por crescimento em série em Meio de Expressão de Estilo Livre 293 (Thermo Fisher Scientific). As células em suspensão foram transfectadas usando PEI (Polysciences) dissolvido em ácido fraco. As células (30 ml) foram cultivadas a  $1 \times 10^6$  células/ml em um frasco Erlenmeyer de 125 ml.

25 [552] O DNA plasmídico foi diluído em 1,5 ml de meio Opti-MEM para 30 ml de células. O DNA total (1 µg/ml de volume de cultura) foi uma mistura de 4 plasmídeos com as seguintes razões molares: 2x plasmídeo genômico, 1x plasmídeo contendo Rev, 1x plasmídeo contendo VSVg e 1x plasmídeo contendo Gagpol. Separadamente, o PEI foi diluído em 1,5 ml de Opti-MEM para

30 2 µg/ml (volume de cultura, razão de 2:1 para DNA). Após uma incubação a

temperatura ambiente de 5 minutos, misturaram-se bem as duas soluções e incubaram-se à temperatura ambiente durante mais 20 minutos. O volume final (3 ml) foi adicionado às células. As células foram então incubadas a 37 °C durante 72 horas com rotação a 120 rpm e com CO<sub>2</sub> a 5 a 8%.

5 [553] Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado por centrifugação a 1.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi decantado para um tubo novo e foi adicionado ¼ do volume sobrenadante em solução de PEG (PEG-IT, System Biosciences). O vírus foi precipitado por incubação durante a noite a 4 °C, seguido de centrifugação a 1.500 g durante 20 minutos a 4 °C. O  
10 sobrenadante foi removido e o vírus foi ressuspensão em volume de 1:100 de meio Ex-Vivo15. Os vírus foram titulados por GFP em células HT1080 ou por expressão de eTAG em células Jurkat.

#### Transdução/expansão de células T para Axl e Ror2

[554] Em um método inicial para a transdução e expansão de  
15 células T, as células Pan-T foram obtidas junto à All Cells (Allcells, PB009-1F). As partículas lentivirais recombinantes anti-Axl CAB-CAR e Anti-ROR2 incompetentes de replicação de CAB-CAR foram produzidas como discutido acima. Dois dias antes da transdução lentiviral, as células foram descongeladas e cultivadas em meio de células T humanas, consistindo em X-VIVO15 (Lonza  
20 nº 04-418Q), soro AB humano a 5% (Valley Biomedical Inc., nº HP1022) e N-acetil L-Cisteína 10 mM (Sigma-Aldrich nº A9165). IL-2 humana recombinante (R & D 202-IL-010) foi adicionada a uma concentração final de 100 IU/ml. Vinte e quatro horas antes da transdução viral, semearam-se células T humanas primárias em uma placa de 12 poços a 0,5x10<sup>6</sup> células/poço e ativaram-se com o  
25 uso do Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Thermo nº 11131D) a uma razão de célula:microesfera de 1:3. No dia da transdução, adicionou-se solução de partícula lentiviral aos poços a MOI 5 para Axl e MOI 20 para Ror2. As células T transduzidas foram mantidas a ~ 10<sup>6</sup>/ml em meio de células T humanas durante 3 dias, depois transferidas para G-Rex de 6 poços com 30 ml/poço de  
30 meio de células T humanas contendo IL-2. As células foram cultivadas durante

pelo menos 10 dias antes das experiências serem conduzidas e a IL-2 foi adicionada em dias alternados.

[555] Certos experimentos de acompanhamento foram realizados com condições de transdução e expansão ligeiramente modificadas. Quando indicado, em vez de células T Pan de AllCells, as células T foram enriquecidas a partir de camadas leucoplaquetas (San Diego Blood Bank) por centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Paque PREMIUM® (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com as instruções do fabricante seguidas de lise de glóbulos vermelhos. Para estudar a morte dependente de CAR condicional das linhas celulares de rim humano Caki-1 e HEK293, as células CD56+ foram depletadas de células T Pan transduzidas (AllCells) com o uso do Kit de Seleção Positiva Easy CDP Human CD56 II (Stem Cell Technologies nº 17855) antes da expansão.

#### Análise FACS de expressão de eTAG

[556] As células T primárias transduzidas ( $0,5 \times 10^6$ ) foram coletadas 8 dias após a transdução, lavadas e ressuspensas em tampão FACS (PBS + FBS a 2% + azida de sódio a 0,1%). As células foram manchadas com 100 µl de tampão FACS contendo 0,9 µg/ml de cetuximab biotinilado (Promab) durante 30 minutos em gelo. As células manchadas foram lavadas com tampão FACS e manchadas com Streptavidin PE (eBioscience, 12-4317-87, 0,2 mg/ml), CD3-BV421 (Biolegend, 317344), CD4-PE-Dazzle 594 (Biolegend, 300548) e CD8-BV570 (Biolegend, 301038) durante 30 minutos no gelo. As células foram lavadas duas vezes em tampão FACS, fixadas em uma mistura de 1:1 do tampão FACS e BD Cytofix (BD nº 554655), processadas com Novocyte (ACEA) e os dados resultantes foram analisados com o software NovoExpress (ACEA).

#### Ensaio de extermínio de célula em tempo real

[557] A atividade citotóxica das células T transduzidas foi medida pelo sistema xCELLigence (ACEA). Resumidamente, as células T primárias transduzidas (células efectoras) foram produzidas como acima, armazenadas congeladas, descongeladas e repousadas durante 2 dias em meio de células T

humanas contendo 100 IU/ml de IL-2. As células-alvo incluíram células CHO (ATCC) e células CHO estavelmente transfectadas para expressar Axl humano (CHO-Axl) ou ROR2 (CHO-ROR2) ou, em outros experimentos, linhas de carcinoma de células renais humanas Caki-1 (fonte) e HEK293 (Lenti- X 293T, Clontech) que apresentou resultados positivos por FACS para Axl e ROR2, respectivamente. As células-alvo foram semeadas em placas E a 20K células/poço um dia antes do experimento com meio de células T humanas contendo HEPES 40 mM e PIPES a pH 6,7 e 7,4 ou a uma faixa de pHs de pH 6,3 a pH 7,4 em incrementos de 0,1 pH. No dia do ensaio, as células efetoras descansadas foram adicionadas a poços experimentais nas razões de célula efetora/célula-alvo (E/T) de 3:1, 1:1 e, em alguns casos, 0,3:1. As leituras de impedância foram realizadas a cada 5 minutos por aproximadamente 40 horas após a adição das células efetoras e a impedância foi relatada como o Índice de Células (IC). A porcentagem de citólise específica foi calculada como se segue

$$\left( \frac{(\text{células T efetoras transduzidas com vírus CI + Alvo}) - (\text{células-alvo CI + T efetoras transduzidas com CARs dirigidas para Axl ou Ror2})}{(\text{células T efetoras transduzidas por vírus CI + Alvo})} \times 100 \right)$$

### Resultados

[558] O receptor de antígeno quimérico (CARs) para ligação de Axl ou Ror2 com atividade aumentada no pH reduzido de um ambiente tumoral comparado ao tecido normal (às vezes referido aqui como (CAB-CARs) foram feitos incorporando as cadeias pesadas e leves de condicionalmente ativo anticorpos de cadeia única em vetores de expressão lentivirais juntamente com outros domínios CAR e um domínio eTag. Os CARs de controle do tipo selvagem e os CARs condicionalmente ativos (CAB) que foram feitos e testados incluíram várias combinações de diferentes módulos/componentes do CAR conforme indicado na Tabela 1 (Axl) e Tabela 2 (Ror2) com informações de sequência detalhadas adicionais fornecidas na Tabela 3. As várias combinações de módulos do terminal amino ao carboxi estão indicadas nas Tabelas 1 e 2. Esses módulos incluíram um peptídeo de sequência de sinalização de CD8 ("sp") (P1)

(SEQ ID NO:74); Axl CAB VH (SEQ ID NO:79), Axl CAB VL (SEQ ID NO:80), Axl VH (SEQ ID NO:93), Axl VL (SEQ ID NO:94), Ror2 VH (SEQ ID NO:107), Ror2 VL (SEQ ID NO:84), Ror2 CAB VL (SEQ ID NO:152) Ror2 CAB1 VH (SEQ ID NO:82), Ror2 CAB2 VH (SEQ ID NO:83), Ror2 CAB3 VH (SEQ ID NO:151) (P2) e (P4); ligante 1 (SEQ ID NO:53), ligante 2 (SEQ ID NO:54), ou ligante 3 (SEQ ID NO:55) (P3); domínio stalk/dobradiça e transmembranar de CD8 (SEQ ID NO:75) ou CD28 (SEQ ID NO:76) (P5); domínio coestimulador de CD137 (SEQ ID NO:1), CD28 (SEQ ID NO:2), ICA $\Delta$  (SEQ ID NO:3), ou ICA $\Delta$  e CD137 (SEQ ID NO:133) (P6); domínio de ativação de CD3Z (SEQ ID NO:13) (P7); uma sequência de salto ribossomal 2A-1 (SEQ ID NO:77) (P8); um eTAG (SEQ ID NO:78) (P9).

[559] As células T primárias foram transduzidas com as partículas lentivirais recombinantes expressando as CARs candidatas das Tabela 1 e 2 e as células percentuais transfectadas foram determinadas por determinação da porcentagem de células que expressam eTag com o uso de FACS. As células T primárias foram transduzidas com sucesso com as partículas lentivirais recombinantes que codificam as CARs candidatas como mostrado para os CARs Axl representativos na Figura 1.

[560] A atividade citotóxica dos CARs candidatos contra células-alvo expressando Axl ou Ror2 foi analisada a um pH de 7,4 (pH fisiológico) ou a um pH de 6,7 (condição de ensaio de tumor substituto). Como explicado em mais detalhes abaixo, muitos dos CARs candidatos foram mais eficazes na lise de células-alvo com um pH de 6,7 do que um pH de 7,4. A atividade de CAB não foi detectada em CARs de controle que incluíam cadeias pesadas e leves de tipo totalmente selvagem (ou seja, ambas as cadeias VH e VL que foram identificadas sob condições fisiológicas e não foram mais evoluídas).

[561] Em certos experimentos iniciais relacionados a Axl, dezoito CAB-CARs anti-Axl (F1-2-1 a F1-2-18) foram testados usando uma primeira cadeia pesada condicionalmente ativa e uma primeira cadeia leve condicionalmente ativa que foram ambas evoluídas de digite cadeia pesada e

leve, respectivamente. Como mostrado na Tabela 1, nove dos dezoito CAB-CARs anti-AXL inicialmente testados tinham atividade citotóxica detectável (indicada na tabela como “atividade da CAB”). Nenhum dos CAB-CARs que tinha apenas cadeias pesadas e leves de anticorpo ASTR do tipo selvagem tinha atividade condicional (identificada na Tabela 1 como “Axl VH” e “Axl VL” (F1-2-19, F1-2-20)). Em experimentos de acompanhamento utilizando as mesmas condições de transdução e expansão fornecidas acima, os CAB-CARs anti-Axl que incluíam diferentes domínios coestimuladores exibiram atividade citotóxica condicional (F1-2-22 e F1-2-23).

[562] Em certos experimentos iniciais relacionados com Ror2, ASTRs condicionalmente ativos contra dois epítomos diferentes foram analisados. No que diz respeito aos Ror2 CAB-CAR contra o epítomo 1 (F1-1-9 a F1-1-24), onze dos dezesseis CAB-CARs anti-Ror2 inicialmente testados apresentavam atividade citotóxica condicional (Tabela 2). Em relação aos Ror2 CAB-CAR contra o epítomo 2, dois (F1-1-25 e F1-1-26) de seis CAB-CARs anti-Ror2 que exibiram atividade de morte nos experimentos iniciais, tinham atividade citotóxica condicional (Tabela 2). Nenhum dos CAB-CARs testados que tinham apenas cadeias pesadas e leves de anticorpo ASTR do tipo selvagem tinha atividade condicional nesses ensaios de morte (identificados na Tabela 2 como “Ror2 VH” e “Ror2 VL”) (F1-1-1 a F1-1 -8)).

[563] Em resumo, muitos dos CAB-CARs candidatos fabricados e testados apresentaram maior atividade citotóxica nas células-alvo em um pH de 6,7 do que em um pH de 7,4. Exemplos de CAB-CARs que eram mais eficazes na lise de células-alvo a um pH de 6,7 do que a um pH de 7,4 incluíam CAB-CAR F1-2-3, que incluía um ASTR anti-Axl (SEQ ID NO: 159), CAB-CAR F1-2-8, que incluiu um ASTR anti-Axl (SEQ ID NO: 160), CAB-CAR F1-2-10, que incluiu um ASTR anti-Axl (SEQ ID NO: 161), CAB-CAR F1-2-13, que incluiu um ASTR anti-Axl (SEQ ID NO: 129), CAB-CAR F1-2-15, que incluiu um ASTR anti-Axl (SEQ ID NO: 128), CAB-CAR F1-1 -9, que incluiu um ASTR anti-Ror2 (SEQ ID NO: 157), CAB-CAR F-1-11, que incluiu um ASTR anti-Ror2 (SEQ ID NO:

153), CAB-CAR F-1-15 que incluiu um ASTR anti-Ror2 (SEQ ID NO: 132), CAB-CAR F-1-17, que incluiu um ASTR anti-Ror2 (SEQ ID NO: 154), CAB-CAR F-1-19, que incluiu um ASTR anti-Ror2 (SEQ ID NO: 130), CAB-CAR F1-1-21, que incluiu um ASTR anti-Ror2 (SEQ ID NO: 158), CAB-CAR F1-1-23, que incluiu um anti-Ror2 ASTR (SEQ ID NO: 131), CAB-CAR F-1-25, que incluiu um ASTR anti-Ror2 (SEQ ID NO: 155) e CAB-CAR F-1-26, que incluiu deduzida uma ASTR anti-Ror2 (SEQ ID NO: 156). Todos os ASTR incluíram pelo menos um módulo de VH ou VL que foi identificado sob condições fisiológicas e foi ainda mais evoluído.

[564] As Figuras 2B-2F mostram a morte *in vitro* representativa de tumores CHO-Axl ao longo do tempo para alguns dos CAB-CARs mais condicionalmente ativos contra o Axl versus um CAR de controle que possui um ASTR do tipo selvagem que não é condicionalmente ativo (Figura 2A). Uma razão de 3:1 de células efetoras para células-alvo foi usada nas Figuras 2A e 2B. Uma razão de 1:1 de efetor para alvo foi usada nas Figuras 2C-2F. De modo similar, as Figuras 3B-3J mostram morte *in vitro* representativa de tumores CHO-Ror2 ao longo do tempo a uma razão de 3:1 de células efetoras para células-alvo para alguns dos CAB-CARs mais condicionalmente ativos contra Ror2 versus um CAR de controle que possui um ASTR de tipo selvagem que não é condicionalmente ativo (FIG. 3A).

[565] A atividade condicional de alguns dos CARs candidatos foi analisada em uma faixa de pHs de 7,4 a 6,7 em incrementos de pH de 0,1 pH (titulação de pH) ao longo do tempo. Como mostrado nas curvas representativas para CAB-CAR F1-2-13 (AXL) na Figura 4A e CAB-CAR F1-1-15 (Ror2) na Figura 5A, todos os CARs candidatos testados (5 CAB-CARs direcionados para cada um de Axl e Ror2) que incluíam ASTRs (CAB-CARs) condicionalmente ativos demonstraram a morte de células CHO dependente de pH expressando seu antígeno cognato, que era baixo em pH fisiológico e aumentou à medida que a cultura se tornou mais ácida. Figura 4B mostra que a morte dependente de pH por CAB-CAR F1-2-13 aumentou de pH 7,4 para pH 7,0 e foi consistentemente

elevada de pH 7,0 para pH 6,5. Figura 5B mostra que a morte dependente de pH por CAB-CAR F1-1-15 aumentou gradualmente de pH 7,4 para pH 6,6.

[566] A morte condicional de candidatas CAB-CARs foi também testada em células de rim humano que expressam níveis endógenos de Axl e Ror2 na ausência de expressão de transgenes dessas proteínas. Figura 6A mostra morte condicional de células Caki-1 que expressam Axl por células T expressando F1-2-15. Figura 6B mostra morte condicional de células HEK293 expressando Ror2 por células T expressando F1-1-15.

[567] Assim, os métodos aqui fornecidos foram eficazes em produzir e identificar CARs condicionalmente ativos contra Axl e Ror2 que demonstraram atividade de morte condicional quando expressa em células T *in vitro*.

Tabela 1. Resultados de análise de células em tempo real para células T que expressam vários CARs anti-Axl.

ID	Módulos									Atividade de CAB
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	
F1-2-1	CD8 sp	Axl CAB VH	Ligante 1	Axl CAB VL	CD8	CD137	CD3 Z	2A-1	eTA G	Médio
F1-2-2	CD8 sp	Axl CAB VH	Ligante 1	Axl CAB VL	CD28	CD137	CD3 Z	2A-1	eTA G	Médio
F1-2-3	CD8 sp	Axl CAB VH	Ligante 2	Axl CAB VL	CD8	CD137	CD3 Z	2A-1	eTA G	Médio
F1-2-4	CD8 sp	Axl CAB VH	Ligante 2	Axl CAB VL	CD28	CD137	CD3 Z	2A-1	eTA G	Nenhum
F1-2-5	CD8 sp	Axl CAB VH	Ligante 3	Axl CAB VL	CD8	CD137	CD3 Z	2A-1	eTA G	Nenhum

F1-2-6	CD8 sp	Axl CAB VH	Ligante 3	Axl CAB VL	CD28	CD137	CD3 Z	2A-1	eTAG	Médio
F1-2-7	CD8 sp	Axl CAB VL	Ligante 1	Axl CAB VH	CD8	CD137	CD3 Z	2A-1	eTAG	Nenhum
F1-2-8	CD8 sp	Axl CAB VL	Ligante 1	Axl CAB VH	CD28	CD137	CD3 Z	2A-1	eTAG	Médio
F1-2-9	CD8 sp	Axl CAB VL	Ligante 2	Axl CAB VH	CD8	CD137	CD3 Z	2A-1	eTAG	Nenhum
F1-2-10	CD8 sp	Axl CAB VL	Ligante 2	Axl CAB VH	CD28	CD137	CD3 Z	2A-1	eTAG	Médio
F1-2-11	CD8 sp	Axl CAB VL	Ligante 3	Axl CAB VH	CD8	CD137	CD3 Z	2A-1	eTAG	Nenhum
F1-2-12	CD8 sp	Axl CAB VL	Ligante 3	Axl CAB VH	CD28	CD137	CD3 Z	2A-1	eTAG	Nenhum
F1-2-13	CD8 sp	Axl CAB VH	Ligante 1	Axl CAB VL	CD28	ICA	CD3 Z	2A-1	eTAG	Elevado
F1-2-14	CD8 sp	Axl CAB VH	Ligante 2	Axl CAB VL	CD28	ICA	CD3 Z	2A-1	eTAG	Médio
F1-2-15	CD8 sp	Axl CAB VH	Ligante 3	Axl CAB VL	CD28	ICA	CD3 Z	2A-1	eTAG	Elevado
F1-2-16	CD8 sp	Axl CAB VL	Ligante 1	Axl CAB VH	CD28	ICA	CD3 Z	2A-1	eTAG	Nenhum
F1-2-17	CD8 sp	Axl CAB VL	Ligante 2	Axl CAB VH	CD28	ICA	CD3 Z	2A-1	eTAG	Nenhum
F1-2-18	CD8 sp	Axl CAB VL	Ligante 3	Axl CAB VH	CD28	ICA	CD3 Z	2A-1	eTAG	Nenhum

F1-2-19	CD8 sp	Axl VH	Ligante 3	Axl VL	CD8	CD137	CD3 Z	2A-1	eTA G	Nenhum
F1-2-20	CD8 sp	Axl VH	Ligante 3	Axl VL	CD28	CD137	CD3 Z	2A-1	eTA G	Nenhum
F1-2-21	CD8 sp	Axl VH	Ligante 3	Axl VL	CD28	ICΔ	CD3 Z	2A-1	eTA G	Nenhum
F1-2-22	CD8 sp	Axl CAB VH	Ligante 3	Axl CAB VL	CD28	ICΔCD137	CD3 Z	2A-1	eTA G	Elevado
F1-2-23	CD8 sp	Axl CAB VH	Ligante 3	Axl CAB VL	CD28	CD28	CD3 Z	2A-1	eTA G	Elevado

Tabela 2. Resultados de análise de célula em tempo real para células T que expressam vários CARs anti-Ror2.

ID	Módulos									Atividade de CAB
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	
F1-1-1	CD8 sp	Ror2 VH	Ligante 1	Ror2 VL	CD8	CD137	CD3 Z	2A-1	eTA G	nenhum
F1-1-2	CD8 sp	Ror2 VH	Ligante 1	Ror2 VL	CD28	CD137	CD3 Z	2A-1	eTA G	nenhum
F1-1-3	CD8 sp	Ror2 VH	Ligante 2	Ror2 VL	CD8	CD137	CD3 Z	2A-1	eTA G	nenhum
F1-1-4	CD8 sp	Ror2 VH	Ligante 2	Ror2 VL	CD28	CD137	CD3 Z	2A-1	eTA G	nenhum
F1-1-5	CD8 sp	Ror2 VL	Ligante 1	Ror2 VH	CD8	CD137	CD3 Z	2A-1	eTA G	nenhum

F1-1-6	CD8 sp	Ror2 VL	Ligante 1	Ror2 VH	CD2 8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTA G	nenhum
F1-1-7	CD8 sp	Ror2 VL	Ligante 2	Ror2 VH	CD8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTA G	nenhum
F1-1-8	CD8 sp	Ror2 VL	Ligante 2	Ror2 VH	CD2 8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTA G	nenhum
F1-1-9	CD8 sp	Ror2 CAB1 VH	Ligante 1	Ror2 VL	CD8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTA G	Médio
F1-1-10	CD8 sp	Ror2 CAB1 VH	Ligante 1	Ror2 VL	CD2 8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTA G	Médio
F1-1-11	CD8 sp	Ror2 CAB1 VH	Ligante 2	Ror2 VL	CD8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTA G	Elevado
F1-1-12	CD8 sp	Ror2 CAB1 VH	Ligante 2	Ror2 VL	CD2 8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTA G	Elevado
F1-1-13	CD8 sp	Ror2 VL	Ligante 1	Ror2 CAB1 VH	CD8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTA G	nenhum
F1-1-14	CD8 sp	Ror2 VL	Ligante 1	Ror2 CAB1 VH	CD2 8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTA G	nenhum
F1-1-15	CD8 sp	Ror2 VL	Ligante 2	Ror2 CAB1 VH	CD8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTA G	elevado
F1-1-16	CD8 sp	Ror2 VL	Ligante 2	Ror2 CAB1 VH	CD2 8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTA G	nenhum
F1-1-17	CD8 sp	Ror2 CAB2 VH	Ligante 1	Ror2 VL	CD8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTA G	Elevado
F1-1-18	CD8 sp	Ror2 CAB2 VH	Ligante 1	Ror2 VL	CD2 8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTA G	Médio

F1-1-19	CD8 sp	Ror2 CAB2 VH	Ligante 2	Ror2 VL	CD8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTAG	Elevado
F1-1-20	CD8 sp	Ror2 CAB2 VH	Ligante 2	Ror2 VL	CD2 8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTAG	Elevado
F1-1-21	CD8 sp	Ror2 VL	Ligante 1	Ror2 CAB2 VH	CD8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTAG	Médio
F1-1-22	CD8 sp	Ror2 VL	Ligante 1	Ror2 CAB2 VH	CD2 8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTAG	nenhum
F1-1-23	CD8 sp	Ror2 VL	Ligante 2	Ror2 CAB2 VH	CD8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTAG	Elevado
F1-1-24	CD8 sp	Ror2 VL	Ligante 2	Ror2 CAB2 VH	CD2 8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTAG	nenhum
F1-1-25	CD8 sp	Ror2 CAB VL	Ligante 1	Ror2 CAB3 VH	CD2 8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTAG	Médio
F1-1-26	CD8 sp	Ror2 CAB VL	Ligante 2	Ror2 CAB3 VH	CD2 8	CD1 37	CD3 Z	2A-1	eTAG	Médio

### Exemplo 2: eliminação de células-alvo que expressam eTAG

#### Efeito de concentração de cetuximab sobre a eliminação

[568] PBMCs foram isoladas de sangue periférico de ACD de um doador saudável por Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare, 45-001-751). Para preparar células-alvo, as PBMCs foram transduzidas com lentivírus, que contêm regiões de codificação para GFP e eTag operativamente ligadas a um promotor, para expressar proteína fluorescente GFP e um alvo eTag. PBMCs ativados e expandidos ao mesmo tempo sem transdução foram usados como células de controle não alvo. Células-alvo expandidas e células de controle não alvo foram armazenadas em meio de congelamento em nitrogênio líquido até o uso. As PBMC isoladas do mesmo dador foram previamente estimuladas durante a noite com 10 ng/ml de huGM-CSF (R & D Systems, 215-GM-010) e usadas como

células efetoras. As células-alvo e as células não alvo foram deixadas a recuperar durante um dia da criopreservação e depois as células de controlo não alvo foram marcadas com CT-Violeta antes do uso. Células-alvo e não alvo foram misturadas na razão de 1:1 e coincubadas com PBMC efetoras na razão

5 de células efetoras: alvo de 50:1 em uma placa de 96 poços de fundo em U, com diferentes concentrações de cetuximab ou controle de isotipo anticorpo. Após incubação por 22 horas, as amostras foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos. As células peletizadas foram ressuspensas em tampão de lavagem FACS (PBS + FBS a 2% + azida de sódio a 0,1%) e fixadas com um volume igual de BD

10 Cytotfix (BD n° 554655) antes da citometria de fluxo. As amostras de controle contendo apenas as células-alvo foram usadas para definir o bloqueio por FACS. Os números de células-alvo e células de controle não alvo foram quantificados. Uma razão entre células-alvo sobreviventes (GFP +) e células de controle não alvo (CT-Violet) foi calculada e normalizada para amostras sem Ab. A

15 porcentagem de depleção foi calculada da seguinte forma:  $1 - ((\text{Alvo}/\text{Não Alvo})/(\text{Alvo sem Ab}/\text{Não Alvo sem Ab}))$ .

#### Efeito de razões de células efetoras:células-alvo em eliminação de cetuximab

[569] O experimento foi realizado como descrito acima, exceto que

20 as PBMCs usadas foram previamente congeladas e as células-alvo e as células de controle não alvo foram misturadas em uma razão de 1:1 e depois coincubadas com PBMCs efetoras a razões de 50:1, 25:1, 5:1 e 1:1 de células efetoras:células-alvo em uma placa de 96 poços de fundo em U, com 1 µg/ml de cetuximab ou controle de isotipo.

#### Resultados

[570] A eficácia da expressão de uma eTag como um domínio de eliminação foi testada em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). As PBMCs foram isoladas e transduzidas com um vetor lentiviral que incluía um eTag operativamente ligado a um promotor. As células de controle não foram

30 transduzidas. As células foram tratadas com Cetuximab em concentrações de 0

a 10 µg/ml e a depleção celular foi detectada às 22 horas após a administração de Cetuximab em todas as concentrações testadas (Figura 7A). Com o uso de uma concentração de 1/ml de cetuximab, observou-se depleção em todas as razões de células efetoras (E) vs controle (T) transduzidas, com depleção  
 5 geralmente crescente com razão crescente de células efetoras (E) transduzidas (Figura 7B). Assim, as células T que expressam uma eTag podem ser eficazmente eliminadas pelo anticorpo para a eTag na presença de PBMCs.

[571] É de salientar que os experimentos de acompanhamento foram realizados com um epítipo FLAG em que o epítipo FLAG foi expresso  
 10 como parte do polipeptídeo CAB-CAR posicionado entre um peptídeo de sinalização CD8 e um ASTR condicionalmente ativo de CAB-CARs F1-1-15 e F1-2-15. Embora ligeiramente diminuídos em alguns casos com esses construtos não otimizados iniciais, esses CAB-CARs mantiveram a sua capacidade de matar células-alvo expressando o seu antígeno cognato e de  
 15 induzir respostas de citocinas. Assim, um domínio de eliminação pode ser expresso como parte de um CAB-CAR sem destruir sua atividade.

### Exemplo 3. Indução de receptor de antígeno quimérico condicionalmente ativo de citocinas

[572] Esse exemplo demonstra a indução de citocinas  
 20 dependentes do pH por receptores de antígenos quiméricos condicionalmente ativos que têm como alvo Axl ou Ror2. Os níveis de citocina de IL-2 e IFN-γ no meio foram medidos após coincubação de pH 6,7 ou pH 7,4 de células CHO controle ou células CHO expressando células Axl (CHO-AXL) ou Ror2 (CHO-ROR2) com T células que expressam um CAB-CAR com um ASTR anti-Axl (F1-  
 25 2-15) ou células T que expressam um CAB-CAR com um ASTR anti-Ror2 (F1-1-15), respectivamente. Os níveis de citocinas dessas coincubações foram comparados com os níveis de citocinas nos controles negativos e positivos.

[573] Células efetoras criopreservadas foram produzidas antecipadamente pela transdução de células T Pan (AllCells) com partículas  
 30 lentivirais que codificam as CAB-CARs F1-1-15 (Ror2), F1-2-15 (Axl), ou eTag

sozinho (F1-0-01) e expandido conforme descrito no Exemplo 1. No Dia 1, as células efetoras foram descongeladas e deixadas recuperar da criopreservação durante 2 dias por cultura a 37 °C e CO<sub>2</sub> a 5% em meio de células T humanas consistindo de X-VIVO15 (Lonza n° 04-418Q), soro AB humano a 5% (Valley Biomedical Inc., n° HP1022), N-acetil L-cisteína 10 mM (Sigma-Aldrich n° A9165) e suplementado com 100 UI/ml de IL2. No Dia 2, semearam-se 3,0x10<sup>4</sup> células-alvo CHO, CHO-Ror2 ou CHO-Axl nos poços de uma placa de cultura de tecidos de fundo plano de 96 poços em 100 µl de meio de células T humanas contendo HEPES/PIPES 40 mM e ajustaram-se a pH 6,7 ou pH 7,4 e cultivados durante a noite a 37 °C e CO<sub>2</sub> de 5%. No Dia 3, as células efetoras descansadas foram adicionadas aos poços experimentais a uma relação célula/célula efetora de 3:1 em 140 µl de meio de células T humanas ao pH apropriado. As células efetoras e alvo foram coincubadas durante a noite a 37 °C e CO<sub>2</sub> a 5% e o sobrenadante foi coletado no dia seguinte e ensaiado para os níveis de citocinas por ELISA. Cada condição experimental foi executada em triplicado.

### Resultados

[574] Conforme mostrado nas Figuras 8A-8D, células T transduzidas com uma partícula lentiviral contendo um ácido nucleico que codifica o CAB-CAR F-2-15 anti-Axl ou o CAB-CAR F-1-15 anti-Ror2 foram ativadas para segregarem citocinas em resposta ao reconhecimento células de CHO que expressam Axl ou Ror2, respectivamente, de um modo dependente do pH. Conforme mostrado na Figura 8A, células T transduzidas com uma partícula lentiviral contendo um ácido nucleico codificando a IL-2 secretada por CAB-CAR F1-2-15 anti-Axl quando cultivadas a um pH de 6,7, mas não a um pH de 7,4 e apenas na presença de células de CHO expressando Axl. De modo similar, conforme mostrado na Figura 8B, células T transduzidas com uma partícula lentiviral contendo um ácido nucléico que codifica o IFN-γ secretado por CAB-CAR F1-2-15 anti-Axl quando cultivadas a um pH de 6,7, mas não a um pH de 7,4, e somente na presença de células de CHO expressando Axl. Conforme mostrado na Figura 8C, as células T que expressam o CAB-CAR F-1-15 anti-

Ror2 secretaram aproximadamente 2,5 vezes mais IL-2 quando cultivadas a pH 6,7 em comparação com pH 7,4 e apenas secretaram quantidades apreciáveis de IL-2 na presença de CHO células expressando Ror2. De modo similar, conforme mostrado na Figura 8D, células T expressando o anti-Ror2 CAB-CAR

5 F-1-15 secretaram aproximadamente 2 vezes mais IFN- $\gamma$  quando cultivadas em pH 6,7 em comparação com pH 7,4, e somente na presença de células de CHO expressando Ror2. As amostras que incluíam células T efetoras que expressaram um polipeptídeo de controle de EGFR em vez dos CAB-CARs anti-Axl ou anti-Ror2 não aumentaram a secreção de IL2 ou IFN- $\gamma$  em resposta a

10 cocultura com qualquer uma das células CHO em qualquer pH. Assim, exemplos de CARs condicionalmente ativas contra Axl e Ror2 aqui identificadas quando expressas em células T *in vitro*, provocaram a secreção condicional de citocinas dessas células T quando expostas ao antígeno cognato de CARs. Além disso, esses experimentos fornecem métodos *in vitro* exemplificadores não limitativos

15 para ativar células T que expressam CAB-CARs aqui fornecidas.

Exemplo 4. Atividade citotóxica de células T que expressam CAR biológico condicionalmente ativas pode ser controlada pela mudança de pH.

[575] O exemplo seguinte ilustra como a atividade citotóxica de células T transduzidas (também referidas como células efetoras) expressando

20 CAB-CARs pode ser modulada por alterações no pH do microambiente. Nesse exemplo, ácidos nucleicos que codificam um CAB-CAR com capacidade de se ligar ao antígeno cognato Axl (anti-Axl) foram usados para gerar partículas lentivirais recombinantes incompetentes para replicação. As células T Pan foram transduzidas com as partículas lentivirais e a atividade citotóxica das células

25 efetoras foi comparada com o uso de Análise de Células em Tempo Real (RTCA) antes e depois da alteração do pH do meio.

#### Produção de células T efetoras de CAB-CAR

[576] Partículas lentivirais que codificam um CAB-CAR dirigido a Axl (F1-2-15) e um controle negativo (C1) contendo um eTag (SEQ ID NO: 78),

30 mas sem um CAR (F1-0-01), foram produzidas como descrito em Exemplo 1.

Essas partículas lentivirais foram usadas para transduzir células T Pan (AllCells) e as células T transduzidas foram deixadas a expandir durante 10 a 12 dias como descrito no Exemplo 1. Essas células T transduzidas foram criopreservadas para uso posterior como células efetoras.

5            Ensaio de citotoxicidade de desvio de pH

[577]            A atividade citotóxica de células T transduzidas antes e depois da alteração de pH por adição de  $\text{NaHCO}_3$  ou  $\text{NaOH}$  foi medida com o uso do sistema xCELLigence. Resumidamente, um dia antes do experimento, as células-alvo (células de CHO estavelmente transfectadas com um construto para expressar Axl na superfície celular (células CHO-Axl)), foram semeadas em uma placa E de 96 poços (ACEA; San Diego, CA, EUA) a 10.000 células/poço com meio X-VIVO 15 contendo HEPES 40 mM e PIPES 40 mM, pH 6,7. Células efetoras criopreservadas previamente transduzidas com partículas lentivirais contendo o ácido nucleico que codifica F1-2-15 ou C1 (F1-2-15-VP e C1VP, respectivamente) produzidas como discutido acima, foram descongeladas e cultivadas durante dois dias em X-VIVO 15 meios contendo 100 UI/ml de IL-2 (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA). No dia do experimento, as células transduzidas com F1-2-15-VP ou C1VP foram lavadas e ressuspensas em meio X-VIVO 15 contendo HEPES 40 mM e PIPES 40 mM, pH 6,7 e depois adicionadas aos poços experimentais na razão de célula efetora/célula-alvo (E/T) de 1:1.

[578]            As leituras de impedância medidas no Sistema xCELLigence (ACEA) foram tomadas a cada 5 minutos e relatadas como o Índice de Células (CI) para quantificar a confluência celular como medida de proliferação celular/lise celular. Aproximadamente 3 horas após a adição das células efetoras, 8 µl de  $\text{NaHCO}_3$  a 7,5% ou 14 µl de  $\text{NaOH}$  0,5 M foram adicionados aos poços com meio X-VIVO 15 contendo 40 mM HEPES e 40 mM PIPES, pH 6,7 para aumentar o pH de 6,7 para 7,4. As leituras de impedância foram continuadas por aproximadamente 20 horas após a adição das células efetoras.

30    A porcentagem de citólise específica foi calculada como se segue ((CI alvo +

células T efetoras transduzidas com C1VP) - (CI alvo + células T efetoras transduzidas F1-2-15-VP)) / (CI alvo + Células T efetoras transduzidas com C1VP) x 100.

#### Comutação de HCl em ensaio de morte de RTCA

5 [579] A atividade citotóxica de células T transduzidas antes e após a alteração do pH por adição de HCl foi medida com o uso do sistema xCELLigence. Resumidamente, um dia antes do experimento, as células de CHO-Axl foram semeadas em uma placa E de 96 poços a 10.000 células/poço com meio X-VIVO 15 contendo HEPES 40 mM e PIPES 40 mM, pH 7,4. Células  
10 efetoras criopreservadas previamente transduzidas com C1VP ou F1-2-15-VP, foram descongeladas e cultivadas por dois dias em meio X-VIVO 15 contendo 100 UI/ml de IL-2. No dia do experimento, as células transduzidas com F1-2-15-VP ou C1VP foram lavadas e ressuspensas em meio X-VIVO 15 contendo HEPES 40 mM e PIPES 40 mM, pH 7,4 e depois adicionadas a poços  
15 experimentais na razão de célula efetora/célula-alvo (E/T) de 1:1.

[580] Leituras de impedância foram tomadas a cada 5 minutos e relatadas como o Índice de Células (IC). Aproximadamente 3 horas após a adição das células efetoras, 8 µl de HCl 1 M foram adicionados aos poços com meio X-VIVO 15 contendo HEPES 40 mM e PIPES 40 mM, pH 7,4 para mudar  
20 o pH de 7,4 para 6,7. As leituras de impedância foram continuadas por aproximadamente 20 horas após a adição das células efetoras. A porcentagem de citólise específica foi calculada como se segue ((CI alvo + células T efetoras transduzidas com C1VP) - (CI alvo + células T efetoras transduzidas F1-2-15-VP))/(CI alvo C1VP) x 100.

#### 25 Resultados

[581] A atividade citotóxica de um CAB-CAR com capacidade de se ligar ao antígeno cognato Axl com atividade aumentada em pH reduzido foi comparada em pH 6,7 e pH 7,4. As células T que foram transduzidas com partículas lentivirais continuando um ácido nucleico que codifica F1-2-15, um  
30 CAB-CAR anti-Axl, foram usadas para matar células CHO que expressam Axl, e

então o pH foi aumentado para determinar se a atividade citotóxica poderia ser inibida por um desvio de pH. Conforme mostrado nas Figuras 9A e 9B, a adição de  $\text{NaHCO}_3$  ou  $\text{NaOH}$  ao microambiente de células CAR-T ativas para aumentar o pH do meio inibiu a atividade citotóxica das células T expressando o CAB-CAR.

- 5 Esses resultados mostram que as células T que expressam CAB-CAR ativas podem matar as células que expressam o alvo e depois essa atividade de morte pode ser inibida aumentando o pH do microambiente.

[582] A capacidade da atividade citotóxica de células T que expressam o CAB-CAR a ser ativado por uma alteração de pH foi também  
10 determinada. Conforme mostrado na Figura 9C, a atividade citotóxica de células T que expressam CAB-CAR anti-Axl em células CHO-Axl foi baixa a um pH de 7,4 e foi aumentada pela adição de HCl para reduzir o pH do microambiente.

[583] Resultados similares foram obtidos quando esses experimentos foram repetidos usando F1-2-22 (CAB-CAR dirigido a Axl) e F1-1-  
15 15 (CAB-CAR direcionado a Ror2). Cumulativamente, esses resultados demonstram que a atividade citotóxica de células T expressando CAB-CARs pode ser modulada por uma mudança no pH dentro do microambiente, tanto pela redução da atividade citotóxica após um aumento no pH e aumento da atividade citotóxica após uma diminuição no pH. Nesse exemplo não limitativo, o pH foi  
20 aumentado de pH 6,7 e diminuiu de 7,4.

Exemplo 5. Administração de bicarbonato pode aumentar o pH do microambiente tumoral em camundongos.

[584] O exemplo seguinte demonstra que o pH de um microambiente tumoral *in vivo* pode ser modulado pela administração de um  
25 agente farmacológico. Nesse exemplo, o agente farmacológico é bicarbonato de sódio e o microambiente tumoral é um tumor de xenoenxerto de CHO em camundongos. O exemplo inclui dois métodos de medição do pH de um microambiente tumoral, tanto *in vivo* como *ex vivo*.

[585] O microambiente extracelular da maioria dos tumores  
30 sólidos é ácido, com um pH tipicamente entre 6,5 e 6,9. Pelo contrário, o pH

normal do tecido é básico, com um pH tipicamente entre 7,2 e 7,5. No entanto, medir diretamente o pH *in vivo* de um microambiente tumoral pode ser difícil. Felizmente, a atividade relativa da protease da catepsina é maior em pH mais baixo e menor em pH mais alto. Portanto, a medição da atividade da catepsina intratumoral pode servir como uma medida substituta do pH do microambiente tumoral. Para medir as atividades *in vivo* das catepsinas B, L, S, K, V e D, foi usada a sonda ProSense 750 FAST (PerkinElmer) de quase infravermelho. Para confirmar ainda a modulação do pH no microambiente do tumor por administração de bicarbonato de sódio, os tumores removidos foram tratados com vermelho de fenol e a cor foi anotada. O vermelho de fenol é um indicador de pH que sofre uma transição de cor dependente do pH. O sal de sódio do vermelho de fenol é amplamente usado em meios de cultura de células para identificar valores de pH. Uma solução de vermelho de fenol tem uma cor amarela a um pH de 6,4 ou abaixo, uma cor laranja em torno de pH 7,0, uma cor vermelha em torno de pH 7,4 e uma cor púrpura acima de pH 7,8.

[586] Os camundongos foram tratados de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais. Os xenoinxertos tumorais de ovário de hamster chinês subcutâneos (sc) foram estabelecidos no flanco posterior de camundongos fêmeas NOD-PrkdcscidIl2rgtm1/Begen (B-NSG) com 12-14 semanas de idade (Beijing Biocytogen Co. Ltd.). Resumidamente, células CHO cultivadas (ATCC, Manassas, VA) foram lavadas em DPBS (Thermo Fisher), contadas, ressuspensas em DPBS frio e misturadas com um volume apropriado de Matrigel ECM (Corning; concentração final 5 mg/ml) a uma concentração de  $1,5 \times 10^6$  células/200 µl no gelo.

[587] Os animais foram preparados para injeção com o uso de anestesia aprovada padrão com depilação (Nair) antes da injeção. 200 µl da suspensão de células em ECM foi injetado sc nos flancos traseiros dos camundongos. Uma vez que os tumores eram palpáveis, os tumores foram medidos usando calibres 2 vezes/semana. O volume do tumor foi calculado

usando a seguinte equação:  $(\text{diâmetro mais longo} \times \text{diâmetro mais curto}^2)/2$ . Quando o volume médio do tumor atingiu 200 mm<sup>3</sup>, os camundongos foram aleatoriamente designados para os respectivos grupos de tratamento.

[588] Dois dias antes da administração de bicarbonato, a água potável para os camundongos B-NSG foi alterada de água purificada autoclavada com pH ácido a regular. No dia seguinte, a sonda FAST ProSense 750 foi administrada a 6 camundongos portadores de tumor de xenoenxerto CHO através de 100 µl de injeção na veia da cauda (4 nmol de sonda ProSense 750 FAST/100 µl de PBS). Um grupo separado de camundongos com tumor de xenoenxerto de CHO foi deixado sem tratamento. No dia seguinte, administrou-se bicarbonato de sódio e realizou-se imagiologia dos camundongos tratados com a sonda ProSense 750 FAST com o uso de um Calibre IVIS Lumina XR. Resumidamente, os camundongos foram anestesiados usando O<sub>2</sub> 2 l/min de isoflurano em gás carreador de O<sub>2</sub> a 2 l/min e, em seguida, colocados com cones de nariz fornecendo isoflurano a 1,5% para camundongos anestesiados durante a imagem. As aquisições de imagens consistiram em uma exposição de 5 segundos para sondas de infravermelho próximo (745/810 nm de comprimento de onda de excitação/emissão). As imagens de fluorescência foram sobrepostas em imagens de luz normais dos camundongos. Imagens do tempo 0 (pré-tratamento) foram capturadas antes da administração de PBS (controle) ou bicarbonato de sódio. Os camundongos foram então administrados com 1 ml/PBS de camundongo (controle, ThermoFisher) ou 1 ml/bicarbonato de sódio 1 M de camundongo (Shanghai Experiment Reagent Co., LTD) por injeção intraperitoneal (ip). Os camundongos foram então imageados 30 min após a administração de PBS ou bicarbonato. As imagens de fluorescência coletadas foram ajustadas para ter os mesmos valores mínimos, máximos e limiares. As contagens de fótons foram definidas nesse estudo como unidades de fluorescência relativa (RFU). O RFU foi calculado normalizando as contagens de fótons do ponto de tempo de 30 minutos para o ponto de tempo de pré-tratamento (tempo 0; 100%) em cada camundongo. Devido à variabilidade entre

os valores de fluorescência em cada camundongo no tempo 0 do valor de pré-tratamento, os valores da intensidade de fluorescência observada em diferentes pontos temporais foram normalizados apenas para o camundongo individual e não para um valor médio de pré-tratamento.

5           [589]       Em um braço separado do experimento, os 6 camundongos que não receberam a sonda de catepsina NIR foram eutanasiados por deslocação cervical a 1,5 hora após a administração ip de PBS ou bicarbonato de sódio. O tumor de xenoenxerto de CHO foi excisado de cada camundongo. Os tumores xenoenxertados foram divididos em duas metades com um bisturi e  
10 colocados em uma placa de petri. As metades do tecido tumoral foram então cortadas/fatiadas repetidamente usando o bisturi. Adicionou-se, gota a gota, água ou solução de vermelho de fenol a 0,05% (50 mg de vermelho de fenol/100 ml de água) a cada metade do tumor, respectivamente. A cor foi anotada e foram tiradas imagens dos xenoenxertos de tumor tratados e da solução de vermelho  
15 de fenol remanescente na placa de petri assim que as amostras de xenoenxerto de tumor foram removidas.

### Resultados

          [590]       Figura 10 mostra os resultados de RFU (média com SEM) da atividade de catepsina intratumoral de imageamento em camundongos com  
20 tumor de xenoenxerto de CHO antes e depois da administração de PBS (controle; n = 3) ou bicarbonato (n = 3). Esses resultados sugerem que a administração de bicarbonato de sódio pode aumentar o pH do microambiente do tumor *in vivo*, como evidenciado pela diminuição da atividade de catepsina observada após a administração de bicarbonato de sódio ip.

25           [591]       Observou-se uma alteração da cor do indicador vermelho de fenol de amarelo/laranja para vermelho utilizando o tecido de tumor excisado de camundongos tratados com bicarbonato de sódio (n = 3) em relação aos camundongos tratados com PBS (n = 3). Esses resultados suportam que a  
30 administração de bicarbonato de sódio aumentou o pH do microambiente do tumor *in vivo* após a administração ip como evidenciado pela mudança de cor do

indicador vermelho de fenol de amarelo/laranja para vermelho.

Exemplo 6. Morte dependente de alvo de tumores *in vivo* por cab-cars dirigidos a Ror2 e Axl.

[592] Foram realizados experimentos que demonstraram que  
 5 CAB-CARs com atividade citotóxica condicional contra células que expressam  
 Axl ou Ror2 em ensaios *in vitro*, apresentavam atividade citotóxica contra células  
 tumorais que expressam Axl ou Ror2 *in vivo*. Utilizou-se um modelo de  
 xenoenxerto com o uso de camundongos NSG ou NOD Scid Gamma que não é  
 reativo com alvos anti-scFv humanos como um mecanismo para sondar a  
 10 especificidade e eficácia de CAB-CAR. O NSG é uma cepa de camundongos  
 que não possuem células T maduras, células NK e células B e está entre os mais  
 imunodeficientes descritos até o momento. A remoção desses componentes  
 celulares é necessária para permitir que as células mononucleares derivadas do  
 sangue periférico humano enxertem sem as respostas imunes inatas, humorais  
 15 ou adaptativas do hospedeiro. Concentrações de citocinas homeostáticas  
 normalmente presentes apenas após a quimioterapia de radiação ou  
 linfodepletação em seres humanos são alcançadas devido à ausência da cadeia  
 gama comum extracelular murina, que permite que células humanas transferidas  
 de forma adoptiva recebam tais citocinas. Ao mesmo tempo, esses animais  
 20 podem também ser usados para enxertar alvos de xenoenxerto tumoral para  
 examinar a eficácia de CARs para matar tumores que expressam alvos. Embora  
 a presença de antígenos do receptor de células T xeno-reativas no produto  
 celular efetor resultem eventualmente em doença do enxerto versus hospedeiro,  
 esses modelos permitem uma avaliação de curto prazo da farmacologia animal  
 25 e tolerabilidade aguda.

[593] Células parentais de ovário de hamster chinês (CHO) e  
 células CHO transgênicas estavelmente transfectadas para expressar ROR2  
 humano (CHO-ROR2) ou Axl humano (CHO-Axl) foram usadas para gerar um  
 tumor-alvo uniforme para determinar a especificidade e eficácia do efetor de  
 30 CAB-CAR células para matar tumores cognatos que expressam antígenos.

Como todas as 3 linhagens celulares têm os mesmos antígenos leucocitários humanos xenoativos (HLAs) e outros antígenos não específicos, a especificidade das células CAB-CAR para alvos tumorais no microambiente tumoral pode ser examinada sem considerar variações na reatividade HLA de

5 linfócitos doadores e células tumorais alvo. As variantes parental e transgênica de CHO cresceram rapidamente com malignidade disseminada após administração subcutânea em camundongos NSG em combinação com membrana basal artificial de Matrigel.

[594] As PBMCs foram isoladas de sangue periférico-DAC de

10 voluntários saudáveis com consentimento informado por centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Paque™ (General Electric) com o uso de um kit CS-900.2 (BioSafe; 1008) em um dispositivo Sepax 2 S-100 (Biosafe; 14000) de acordo com as instruções do fabricante.  $5,0 \times 10^7$  PBMCs viáveis foram

15 semeadas em 1 l de G-Rex (Wilson-Wolf) e o volume foi levado a 100 ml com SFM de Expansão de Células T Complete OpTmizer™ CTS™ suplementado com 100 IU/ml (IL-2) (Novoproteína), 10 ng/ml (IL-7) (Novoprotein) e 50 ng/ml de anticorpo anti-CD3 (OKT3, Novoprotein) para ativar as PBMCs para transdução viral. Após incubação durante a noite a 37 °C e CO<sub>2</sub> a 5%, partículas lentivirais que codificam construtos de CAR fabricados como descrito no Exemplo 1 foram

20 adicionadas diretamente às PBMCs ativadas e incubadas durante a noite a 37 °C e CO<sub>2</sub> a 5%. No dia seguinte, o volume de meio de cada G-Rex chegou a 1 l com SFM de Expansão de Células T CTS™ Complete OpTmizer™ suplementado com NAC 10 mM. Adicionalmente, 100 UI/ml de IL-2 (Novoprotein) e 10 ng/ml de IL-7 (Novoprotein) foram adicionados a cada poço no Dia 2 e a

25 cada 48 horas daí em diante. As células foram deixadas a expandir até o Dia 12 a partir da coleta de sangue original (Dia 0) antes de serem coletadas.

[595] Para examinar CAB-CARs direcionados a ROR2, camundongos fêmeas NOD-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1</sup>/Begen (B-NSG) (Beijing Biocytogen Co. Ltd.) com 12-14 semanas de idade foram inoculados subcutaneamente com

30 células CHO parentais ou com células CHO-ROR2 em Matrigel ECM a uma

concentração de  $1,5 \times 10^6$  células/200  $\mu$ l em gelo, como descrito no Exemplo 5. Os camundongos foram dosados por via intravenosa (IV) por injeção na veia da cauda com  $4 \times 10^6$  células T transduzidas com partícula lentiviral contendo um ácido nucleico que codifica F1-1-15 (n = 6) ou F1-0-01 (n = 6). Exemplos 1 e 3 para detalhes de construto) preparados com o uso do protocolo de processamento de células fornecido no parágrafo acima, ou com PBS (n = 6), quando os tumores atingiram  $>200 \text{ mm}^3$  para modelar uma terapia pesada de carga tumoral. Os tumores foram medidos usando calibre 3 vezes por semana e o volume do tumor foi calculado usando a seguinte equação: (diâmetro mais longo \* diâmetro mais curto<sup>2</sup>)/2. Todos os animais atingiram as diretrizes de necropsia da carga tumoral no Dia 13.

[596] Para examinar CAB-CARs dirigidos a AXL, camundongos B-NSG fêmeas com 7-9 semanas de vida foram inoculados subcutaneamente com células CHO parentais ou células CHO-AXL em Matrigel ECM (concentração final 5 mg/ml) a uma concentração de  $1,5 \times 10^6$  células/200  $\mu$ l em gelo, como descrito no exemplo 5. A administração IV ou intratumoral (IT) de células efetoras começou quando os tumores atingiram  $>100 \text{ mm}^3$  para modelar uma terapia pesada de carga tumoral. Um primeiro grupo de camundongos foi dosado IV por injeção na veia da cauda com  $8 \times 10^6$  células T transduzidas com partícula lentiviral contendo um ácido nucleico que codifica F1-2-15 (n = 6), F1-2-22 (n = 6), ou F1-0-01 (n = 6) (consulte Exemplos 1 e 3 para detalhes de construto) preparados com o uso do protocolo de processamento de células fornecido no parágrafo acima, ou com PBS (n = 6). Um segundo grupo de camundongos foi dosado IT com  $8 \times 10^6$  células T transduzidas com partícula lentiviral contendo um ácido nucleico que codifica F1-2-15 (n = 6), F1-2-22 (n = 6), ou F1-0-01 (n = 6) ou com PBS (n = 6). Um terceiro grupo de camundongos foi dosado IV por injeção na veia da cauda com  $8 \times 10^6$  células T transduzidas com partícula lentiviral contendo um ácido nucleico que codifica F1-2-15 (n = 6), F1-2-22 (n = 6), ou F1-0-01 (n = 6), ou com PBS ((n = 6) e os ratos receberam injeções subcutâneas de IL-2 (50KIU) no sítio subcutâneo contralateral afastado do tumor

todos os dias durante os primeiros 3 dias. Os tumores foram medidos usando calibre 3 vezes por semana e o volume do tumor foi calculado usando a seguinte equação:  $(\text{diâmetro mais longo} \times \text{diâmetro mais curto}^2)/2$ . Todos os animais foram eutinizados de acordo com as diretrizes de necropsia da carga tumoral.

## 5      Resultados

[597]      A atividade de morte de células tumorais *in vivo* de alguns CAR-CAB representativos revelados no Exemplo 1 foi testada em um modelo de camundongo com o uso de células tumorais enxertadas expressando Ror2, Axl ou nenhum. Em relação a CAB-CARs anti-Ror2, conforme mostrado na Figura 10 11A, camundongos dosados IV com  $4 \times 10^6$  linfócitos T transduzidos com uma partícula lentiviral contendo um ácido nucléico que codifica F1-1-15 não tiveram efeito sobre o crescimento tumoral negativo de ROR2 em comparação com controles PBS ou apenas células T transduzidas com lentivírus E-Tag (F1-0-01). Em contrapartida, conforme mostrado na Figura 11B, a dosagem IV das mesmas 15 preparações celulares em tumores que expressam Ror2 humanos demonstrou supressão tumoral significativa de tumores positivos para Ror2 apenas por F1-1-15. Esses dados demonstram que o microambiente tumoral reproduzido *in vivo* nesse modelo de camundongo tumoral enxertado e que as células T geneticamente modificadas que expressam um CAB-CAR anti-Ror2 20 exemplificativo aqui fornecido tiveram a capacidade de acessar o tumor sólido e dirigir a morte de células-alvo *in vivo* apesar o rápido tempo de duplicação do alvo enxertado células tumorais.

[598]      Em relação a CAB-CARs anti-Axl, conforme mostrado na Figura 12A, camundongos administrados intratumoralmente (IT) com  $8 \times 10^6$  25 células T transduzidas com uma partícula lentiviral contendo um ácido nucleico codificando F1-2-15 ou F1-2-22 não tiveram efeito no crescimento tumoral negativo de Axl em comparação com controles PBS ou E-Tag apenas células T transduzidas com partículas lentivirais (F1-0-01). Em contrapartida, conforme mostrado na Figura 12B, a dosagem de TI das mesmas preparações celulares 30 em tumores humanos expressando Axl demonstrou supressão tumoral

significativa de tumores Axl positivos por F1-2-15 e F1-2-22. Enquanto as células que expressam F1-2-15 ou F1-2-22 foram equipotentes em ensaios de morte *in vitro* contra tumores que expressam Axl em comparação com a capacidade de as células que expressam F1-1-15 de matar os tumores que expressam Ror2, a inibição do crescimento tumoral *in vivo* não foi como sustentada ao longo do tempo após a administração IV em comparação com a injeção local (Figura 13A controle vs Figura 13B). A administração de IL-2 sistêmico em animais por 3 dias (Figura 14A controle vs Figura 14B) levou a uma melhor atividade antitumoral em comparação com a dosagem IV sem IL-2. Esses dados demonstram que o microambiente tumoral é novamente reproduzido *in vivo* nesse modelo de camundongo tumoral enxertado e que as células T geneticamente modificadas que expressam CAB-CARs anti-Ror2 F1-2-15 e F1-2-22 exemplificadores tiveram a capacidade de acessar o sólido tumor e morte celular *in vivo* apesar do tempo de duplicação rápida das células tumorais enxertadas no alvo. Além disso, esses experimentos que usam CAB-CARs anti-Ror2 e anti-Axl exemplificativas aqui fornecidos, demonstram que tais CAB-CARs são eficazes em métodos *in vivo* para ativar células T que expressam essas CAB-CAR.

[599] Os versados na técnica podem conceber muitas modificações e outras modalidades dentro do escopo e espírito da presente revelação. De fato, as variações nos materiais, métodos, desenhos, experimentos, exemplos e modalidades descritas podem ser realizadas por técnicos versados sem alterar os aspectos fundamentais da presente revelação. Qualquer uma das modalidades reveladas pode ser usada em combinação com qualquer outra modalidade revelada.

[600] Em alguns casos, alguns conceitos foram descritos com referência a modalidades específicas. Contudo, um versado na técnica aprecia que podem ser realizadas várias modificações e alterações sem afastar-se do escopo da invenção, conforme estabelecido nas reivindicações abaixo. Consequentemente, o relatório descritivo e as figuras devem ser considerados em um sentido ilustrativo e não restritivo, e todas essas modificações destinam-

se a ser incluídas no âmbito da invenção.

Tabela 3. Sequências de SEQ ID NO.

SEQ ID NO:	Nome	Sequência
1	Domínio coestimulador CD137	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL
2	Domínio coestimulador CD28	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA AYRS
3	Domínio coestimulador ICΔ	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQAYAAARDFA AYRS
4	Domínio coestimulador ICOS	TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL
5	Domínio coestimulador OX40	RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
6	Domínio coestimulador CD27	HQRRKYRSNKGESPVPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQE DYRKPEPACSP
7	Domínio coestimulador BLTA	CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTR QNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEE NKPGIVYASLNHSGVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS
8	Domínio coestimulador	RRACRKIRIQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQ LRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESPL

	r CD30	LQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKAD TVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPE QETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK
9	Domínio coestimulado r G1TR	HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPREE RGERSAEEKGRLGDLWW
10	Domínio coestimulado r HVEM	CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAP PDVTTVAVEETIPSFTGRSPNH
11	Domínio de Ativação de isoforma 1 de CD3Z	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFI YGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR
12	Domínio de Ativação de isoforma 2 de CD3Z	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFI YGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR
13	Domínio de ativação de CD3Z 3	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R
14	Domínio de ativação de CD3Z 4	NQLYNELNLGRREEYDVLDKR
15	Domínio de ativação de	EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK

	CD3Z 5	
16	Domínio de ativação de CD3Z 6	DGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
17	Domínio de ativação de CD3D 1	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTS ITWEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYK DKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLAL GVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDD AQYSHLGGNWARNK
18	Domínio de ativação de CD3D 2	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTS ITWEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYK DKESTVQVHYRTADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYS HLGGNWARNK
19	Domínio de ativação de CD3D 3	DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN
20	Domínio de ativação de CD3E 1	MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPY KVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGEDDKNI GSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLY LRARVCENCMEMDMSVATIVIVDITGGLLLLVYYWSK NRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDIYE PIRKGQRDLYSGLNQRR
21	Domínio de ativação de CD3E 2	NPDYEPPIRKGQRDLYSGLNQRR
22	Domínio de ativação de CD3G 1	MEQGKGLAVLILAILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDG SVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNA KDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATI

		SGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVRQSRASDKQTLL PNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN
23	Domínio de ativação de CD3G 2	DQLYQPLKDREDDQYSHLQGN
24	Domínio de ativação de CD79A 1	MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKV PASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNY TWPPEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKS HGGIYVCRVQEGN ESYQQSCGTYLVRQPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGII LLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYE GLNLDDCSMYEDISRGLQGT YQDVGSLNIGDVQLEKP
25	Domínio de ativação de CD79A 2	MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKV PASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNY TWPPEFLGPGEDPNEPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGII LLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYE GLNLDDCSMYEDISRGLQGT YQDVGSLNIGDVQLEKP
26	Domínio de ativação de CD79A 3	ENLYEGLNLDDCSMYEDISRG
27	Domínio de ativação de DAP12 1	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTV SPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEA ATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK
28	Domínio de ativação de DAP12 2	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTV SPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAT RKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQ
29	Domínio de ativação de DAP12 3	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMG DLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETES PYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK

30	Domínio de ativação de DAP12 4	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMG DLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEATRKQRITETESP YQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK
31	Domínio de ativação de DAP12 5	ESPYQELQGQRSDVYSDLNTQ
32	Domínio de ativação de FCERIG 1	MIPAVLLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLL YCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKH EKPPQ
33	Domínio de ativação de FCERIG 2	DGVYTGLSTRNQETYETLKHE
34	Domínio de ativação de DAP10	RPRRSPAQDGKVYINMPGRG
35	Domínio de ativação de CD28	FWLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWWRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
36	Domínio de ativação de ZAP70	MPDPAHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQ CLRSLGGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYAIAGGKAH CGPAELCEFYSRDPDGLPCNLRKPCNRPSGLEPQPGV FDCLRDAMVRDYVRQTWKLEGEALEQAIISQAPQVEKL IATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTDGKFLLR PRKEQGTYALSLIYGKTVYHYLISQDKAGKYCIPEGTKF DTLWQLVEYLKLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAA PTLPAHPSTLTHPQRRIDTLNSDGYTPEPARITSPDKPR PMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKLFLKRDNLLIADIELG CGNFGSVRQGVYRMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEE

		MMREAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGG GPLHKFLVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNF VHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYYTAR SAGKWPLKWYAPECINFRKFSSRSDVWSYGVMTMWEAL SYGQKPYKKMKGPEVMAFIEQGKRMECPPECPELYA LMSDCWIYKWEDRPDLTVEQRM RACYYS LASKVEGP PGSTQKAEACA
37	Epítipo HA	YPYDVPDYA
38	Epítipo FLAG	DYKDDDDK
39	Epítipo c- myc	EQKLISEEDL
40	Afinidade de His5	HHHHH
41	Afinidade de HisX6	HHHHHH
42	Afinidade de Strep Tag	WSHPQFEK
43	Afinidade de RYIRS	RYIRS
44	Afinidade de FHHT	FHHT
45	Afinidade	WEAAAREACCRECCARA
46	Domínio transmembra nar de CD8 alfa	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

47	Domínio transmembrana de CD8 beta	LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC
48	Domínio transmembrana de CD4	ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC
49	Domínio transmembrana de CD3 zeta	LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV
50	Domínio transmembrana de CD28	FWVLWVGGVLACYSLLVTVAFIIFWW
51	Domínio transmembrana de OX40	VAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL
52	Domínio transmembrana de CD7	ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA
53	Ligante 1	GGGSGGGSGGGGS
54	Ligante 2	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
55	Ligante 3	GGGSGGGSGGGGS
56	Ligante 4	GGSG
57	Ligante 5	GGSGG
58	Ligante 6	GSGSG
59	Ligante 7	GSGGG

60	Ligante 8	GGGSG
61	Ligante 9	GSSSG
62	Dobradiça 1	CPPC
63	Dobradiça 2	DKTHT
64	Dobradiça 3	CPEPKSCDTPPPCPR
65	Dobradiça 4	ELKTPLGDTTHT
66	Dobradiça 5	KSCDKTHTCP
67	Dobradiça 6	KCCVDCP
68	Dobradiça 7	KYGPPCP
69	Dobradiça 8	EPKSCDKTHTCPPCP
70	Dobradiça 9	ERKCCVECPCP
71	Dobradiça 10	ELKTPLGDTTHTCPRCP
72	Dobradiça 11	SPNMVPHAHHAQ
73	Dobradiça 12	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACD
74	Peptídeo de sinalização de CD8	MALPVTALLPLALLHAARP
75	Stalk-TM de CD8	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
76	Stalk-TM de CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKP FWVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWW
77	Sinal de clivagem de 2A-1	GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP

78	Domínio de eliminação de eTAG	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSIN ATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQEL DILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGRTKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYAN TINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSP EGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRE FVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYI DGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHP NCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVA LGIGLFM
79	Axl 4007V VH de scFv condicionalm ente ativo	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFWGATMNWIR QPPGKGLEWIGLIKPSNGGTSYNQKFKGRVTISADKSI TAYLQWSSLKASDTAMYYCAHGHYESYEAMDYWGQG TLVTVSS
80	Axl 4007V VL de scFv condicionalm ente ativo	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVVSAVAWYQQ KPGQAPRLLIYWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYCQEHFSPPLTFGQGGTKVEIK
81	Ror2 VL 4 de scFv condicionalm ente ativo	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSATSSVSVMHWYLQKP GQSPQLLIYGTSNLSAGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR EAEDVGVYYCQQRSSYPFTFGQGGTKVEIK
82	Ror2 R98H VH de scFv condicionalm ente ativo	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGYWYWNW RQARGQRLEWIGYITYDGSKNYNPSLKNRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCSHFEGVWYGLDYWGQGT LVTVSS
83	Ror2 Y33E VH de scFv	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGEYWYWNW RQARGQRLEWIGYITYDGSKNYNPSLKNRVTISVDTSK

	condicionalmente ativo	NQFSLKLSSVTAADTAVYYCSRFEGVWYGLDYWGQGT LTVSS
84	Ror2 VL de scFv condicionalmente ativo	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASESVDRYGNSFIHW YQQKPGKAPKLLIYRTYNLESGIPARFSGSGSGTEFTLT SSLQSEDFAVYYCQQTNEDPWTFGQGTKVEIK
85	Ror2 L3 4 de scFv condicionalmente ativo	QQX <sub>42</sub> NX <sub>43</sub> DPX <sub>44</sub> TX <sub>45</sub> (em que X <sub>42</sub> é T, I ou P; X <sub>43</sub> é E ou V; X <sub>44</sub> é W ou T; e X <sub>45</sub> é F ou T)
86	Ror2 VL 5 de scFv condicionalmente ativo	DIVLTQSPDSLAVSLGQRATISCRASESVDRYGNSFIHW YLQKPGQPPKLLIYRTYNLESGIPARFSGTGSRTDFTLT NPVEADDVATYYCQQTNEDPWTFGQGTKVEIK
87	Axl H1 1 de scFv condicionalmente ativo	X <sub>1</sub> GX <sub>2</sub> TMN (em que X <sub>1</sub> é T ou W; e X <sub>2</sub> é H ou A)
88	Axl H2 1 de scFv condicionalmente ativo	LIKPSNGGTSYNQKFKG
89	Axl H3 1 de scFv condicionalmente ativo	GX <sub>3</sub> YX <sub>4</sub> SYX <sub>5</sub> AMDY (em que X <sub>3</sub> é H ou D; X <sub>4</sub> é E ou H; e X <sub>5</sub> é E ou F)
90	Axl L1 1 de scFv	KASQDVX <sub>6</sub> SAVA (em que X <sub>6</sub> é S ou V)

	condicionalmente ativo	
91	Axl L2 1 de scFv condicionalmente ativo	WX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> TRX <sub>9</sub> T (em que X <sub>7</sub> é A ou Q; X <sub>8</sub> é S ou D; e X <sub>9</sub> é H ou D)
92	Axl L3 1 de scFv condicionalmente ativo	QEHFSX <sub>10</sub> PLX <sub>11</sub> (em que X <sub>10</sub> é T ou P; e X <sub>11</sub> é T ou R)
93	Axl WT VH de scFv condicionalmente ativo	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFTGHTMNWIR QPPGKGGLEWIGLIKPSNGGTSYNQKFKGRVTISADK TAYLQWSSSLKASDTAMYYCAHGHYESYFAMDYWGQG TLVTVSS
94	Axl WT VL de scFv condicionalmente ativo	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSSAVAWYQQ KPGQAPRLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS LQPDDFATYYCQEHFSTPLTFGQGTKVEIK
95	Ror2 H1 1 de scFv condicionalmente ativo	GYTX <sub>1</sub> TEX <sub>2</sub> TX <sub>3</sub> H (em que X <sub>1</sub> é F ou E; X <sub>2</sub> é Y ou D; e X <sub>3</sub> é M ou D)
96	Ror2 H1 2 de scFv condicionalmente ativo	X <sub>4</sub> GYSITTGYWYWN (em que X <sub>4</sub> é T ou S)
97	Ror2 H2 1 de scFv	GX <sub>5</sub> NX <sub>6</sub> NNGGTGYNQKFKG (em que X <sub>5</sub> é E ou I; e X <sub>6</sub> é T ou D)

	condicionalm ente ativo	
98	Ror2 H2 2 de scFv condicionalm ente ativo	YITYDGSKNYPNPSLKN
99	Ror2 H3 1 de scFv condicionalm ente ativo	GSLYSYGNSYFDY
100	Ror2 H3 2 de scFv condicionalm ente ativo	FEGVWX <sub>7</sub> GLDY (em que X <sub>7</sub> é Y ou G)
101	Ror2 L1 1 de scFv condicionalm ente ativo	SATSSX <sub>8</sub> SYMH (em que X <sub>8</sub> é E ou V)
102	Ror2 L1 2 de scFv condicionalm ente ativo	RASESVDRYGNSFIH
103	Ror2 L2 1 de scFv condicionalm ente ativo	X <sub>9</sub> TSNLAS (em que X <sub>9</sub> é G ou H)
104	Ror2 L2 2 de scFv	RTYNLES

	condicionalm ente ativo	
105	Ror2 L3 1 de scFv condicionalm ente ativo	QQRSSYPFT
106	Ror2 L3 2 de scFv condicionalm ente ativo	QQTNEDPWT
107	Ror2 WT VH de scFv condicionalm ente ativo	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGYWVNW RQARGQRLEWIGYITYDGSKNYPNPSLKNRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCSRFEGLDYWGQGT LTVSS
108	Axl VL 1 de scFv condicionalm ente ativo	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVVSAVAWYQQ KPGQAPRLLIWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYCQEHFSTPLTFGQGTKVEIK
109	Axl VL 2 de scFv condicionalm ente ativo	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSSAVAWYQQ KPGQAPRLLIWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYCQEHFSPPLTFGQGTKVEIK
110	Axl VL 3 de scFv condicionalm ente ativo	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVVSAVAWYQQ KPGQAPRLLIWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYCQEHFSPPLTFGQGTKVEIK
111	Axl VL 4 de scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVVSAVAWYQQ KPGQAPRLLIWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS

	condicionalmente ativo	SLQPDDFATYYCQEHFSPPLRFGQGTKVEIK
112	Axl VH 1 de scFv condicionalmente ativo	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFTGATMNVIR QPPGKGLEWIGLIKPSNNGGTSYNQKFKGRVTISADKSI TAYLQWSSSLKASDTAMYYCAHGHYESYEAMDYWGQG TLVTVSS
113	Axl VH 2 de scFv condicionalmente ativo	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFWGATMNVIR QPPGKGLEWIGLIKPSNNGGTSYNQKFKGRVTISADKSI TAYLQWSSSLKASDTAMYYCAHGHYESYEAMDYWGQG TLVTVSS
114	Axl VH 3 de scFv condicionalmente ativo	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFTGHTMNVIR QPPGKGLEWIGLIKPSNNGGTSYNQKFKGRVTISADKSI TAYLQWSSSLKASDTAMYYCAHGHYESYEAMDYWGQG TLVTVSS
115	Ror2 VH 1 de scFv condicionalmente ativo	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWM KQSHRKSLEWIGGINTNNGGTGYNQKFKGKATLTVDKS SSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARGSLYSYGNSYFDYWG QGTLVTVSS
116	Ror2 VH 2 de scFv condicionalmente ativo	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTETEDTDHWM KQSHRKSLEWIGGENDNNGGTGYNQKFKGKATLTVDK SSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCAHGSLSYSGNSYFDYW GGTLVTVSS
117	Ror2 VH 3 de scFv condicionalmente ativo	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTMHWW RQARGQRLEWIGGINTNNGGTGYNQKFKGRVTISADK SISTAYLQWSSSLKASDTAMYYCAHGSLSYSGNSYFDYW GGTLVTVSS
118	Ror2 VH 4 de scFv	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTEYTMHWW RQAPGQGLEWMGGINTNNGGTGYNQKFKGRVTISADK

	condicionalmente ativo	SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAHGSLYSYGNSYFDYW GQGLTVTVSS
119	Ror2 VH 5 de scFv condicionalmente ativo	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTEYTMHWIR QSPSRGLEWLGGINTNNGGTGYNQKFKGRVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAHGSLYSYGNSYFDYWG QGLTVTVSS
120	Ror2 VH 6 de scFv condicionalmente ativo	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITTGYWYWNWI RQFPGNKLEWMAYITYDGSKNYPNPSLKNRISITRDTSKN KFFLKLNSVTSEDATYYCSRFEVWYGLDYWGQGLT TVSS
121	Ror2 VH 7 de scFv condicionalmente ativo	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITTGYWYWNWI RQFPGNKLEWMAYITYDGSKNYPNPSLKNRISITRDTSKN KFFLKLNSVTSEDATYYCSHFEGVWGGLDYWGQGLT TVSS
122	Ror2 VL 1 de scFv condicionalmente ativo	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSATSSVSVMHWFQQKP GTSPKLWIYGTSNLAGVPARFSGSGSGTSYSLTISRM EAEDAATYYCQQRSSYPFTFGQGTKVEIK
123	Ror2 VL 2 de scFv condicionalmente ativo	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSATSSVSVMHWFQQKP GTSPKLWIYHTSNLAGVPARFSGSGSGTSYSLTISRME AEDAATYYCQQRSSYPFTFGQGTKVEIK
124	Ror2 VL 3 de scFv condicionalmente ativo	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSATSSVSVMHWYQQK PGQAPRLLIYGTSNLAGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE EAEDVGVYYCQQRSSYPFTFGQGTKVEIK
125	Stalk de CD8 do tipo	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFA

	selvagem	
126	Stalk de CD28 do tipo selvagem	FCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGP SKP
127	Domínio de ativação de CD3Z 7	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR
128	scFv de F1- 2-15	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFWGATMNWIR QPPGKGLEWIGLIKPSNGGTSYNQKFKGRVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCAHGHYESYEAMDYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCKASQDVVSAVAWYQQKPGQAPRLLIYWQDTR HTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQEHF SPPLTFGQGGTKVEIK
129	scFv de F1- 2-13	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFWGATMNWIR QPPGKGLEWIGLIKPSNGGTSYNQKFKGRVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCAHGHYESYEAMDYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCKASQDVVSAVAWYQQKPGQAPRLLIYWQDT RHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQEH FSPPLTFGQGGTKVEIK
130	scFv de F1- 1-19	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGEYWNWW RQARGQRLEWIGYITYDGSKNYPNPSLKNRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCSRFEVWYGLDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GSAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDRYGNFSI HWYQQKPGKAPKLLIYRTYNLESGIPARFSGSGSGTEF

		TLTISSLQSEDAVYYCQQTNEPWFQGGTKVEIK
131	scFv de F1-1-23	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRASESVDRYGNSFIHW YQKPGKAPKLLIYRTYNLESGIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDAVYYCQQTNEPWFQGGTKVEIKGGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLQESG PGLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGEYWNWRQARGQR LEWIGYITYDGSKNYPNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCSRFEVWYGLDYWGQGTLLTVSS
132	scFv de F1-1-15	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRASESVDRYGNSFIHW YQKPGKAPKLLIYRTYNLESGIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDAVYYCQQTNEPWFQGGTKVEIKGGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLQESGP GLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGEYWNWRQARGQRL LEWIGYITYDGSKNYPNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCSHFVWYGLDYWGQGTLLTVSS
133	Domínio coestimulador duplo de ICA CD137	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHQAYAAARDFA AYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCEL
134	Axl H1 2 de scFv condicionalmente ativo	X <sub>1</sub> GX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> MX <sub>4</sub> (em que X <sub>1</sub> é T, A ou W; X <sub>2</sub> é H ou A; X <sub>3</sub> é T ou I; e X <sub>4</sub> é N ou I)
135	Axl H2 2 de scFv condicionalmente ativo	LIKX <sub>5</sub> SNGGTGX <sub>6</sub> YNQKFKG (em que X <sub>5</sub> é P ou N; e X <sub>6</sub> é S, I ou T)
136	Axl H3 2 de	GX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> DYX <sub>15</sub> X <sub>16</sub> (em que X <sub>7</sub> é H, D, E,

	scFv condicionalmente ativo	P, R, ou W; X <sub>8</sub> é Y ou N; X <sub>9</sub> é E, A, D, F, G, H, I, L, M, N, R, V, ou Y; X <sub>10</sub> é S, D, M, N, ou Q; X <sub>11</sub> é Y, C, E, ou P; X <sub>12</sub> é F, E, N, S, T, ou V; X <sub>13</sub> é A, D, G, L, ou Y; X <sub>14</sub> é M, E, ou F; X <sub>15</sub> é W, A, D, H, L, N, P, R, ou T; e X <sub>16</sub> é G ou H)
137	Axl L1 2 de scFv condicionalmente ativo	KASQDX <sub>17</sub> X <sub>18</sub> SX <sub>19</sub> VX <sub>20</sub> (em que X <sub>17</sub> é V, D, G, N, ou W; X <sub>18</sub> é S ou V; X <sub>19</sub> é A, L, ou M; e X <sub>20</sub> é A, D, N, ou Q)
138	Axl L2 2 de scFv condicionalmente ativo	X <sub>21</sub> X <sub>22</sub> X <sub>23</sub> TRX <sub>24</sub> T (em que X <sub>21</sub> é W ou F; X <sub>22</sub> é A, I, N, P ou Q; X <sub>23</sub> é S ou D; e X <sub>24</sub> é H ou D)
139	Axl L3 2 de scFv condicionalmente ativo	QEX <sub>25</sub> X <sub>26</sub> SX <sub>27</sub> X <sub>28</sub> X <sub>29</sub> X <sub>30</sub> (em que X <sub>25</sub> é H, C, F, I, L, Q, S, T, V, ou Y; X <sub>26</sub> é F, C, D, E, G, N, ou S; X <sub>27</sub> é T, C, ou P; X <sub>28</sub> é P, A, C, D, E, H, K, S, T, V, ou W; X <sub>29</sub> é L, G, ou R; e X <sub>30</sub> é T, I, ou R)
140	Ror2 H1 3 de scFv condicionalmente ativo	GYTX <sub>1</sub> TEX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> H (em que X <sub>1</sub> é F ou E; X <sub>2</sub> é Y ou D; X <sub>3</sub> é T ou C; e X <sub>4</sub> é M, D, E ou Y)
141	Ror2 H1 4 de scFv condicionalmente ativo	GYSITTGX <sub>29</sub> YWN (em que X <sub>29</sub> é Y, E, R ou T)
142	Ror2 H2 3 de scFv condicionalmente ativo	X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> NNGGTGYNQKFKG (em que X <sub>5</sub> é G ou S; X <sub>6</sub> é I ou E; X <sub>7</sub> é N, C, L ou V; e X <sub>8</sub> é T, D ou E)

143	Ror2 H2 4 de scFv condicionalm ente ativo	YITYDGSX <sub>30</sub> NYNPSLKN (em que X <sub>30</sub> é K ou N)
144	Ror2 H3 3 de scFv condicionalm ente ativo	X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> SX <sub>12</sub> YX <sub>13</sub> YX <sub>14</sub> X <sub>15</sub> SYFX <sub>16</sub> X <sub>17</sub> X <sub>18</sub> (em que X <sub>9</sub> é A, M, ou T; X <sub>10</sub> é R ou H; X <sub>11</sub> é G ou E; X <sub>12</sub> é L ou F; X <sub>13</sub> é S ou G; X <sub>14</sub> é G ou D; X <sub>15</sub> é N ou E; X <sub>16</sub> é D ou L; X <sub>17</sub> é Y, C, ou T; e X <sub>18</sub> é W ou L)
145	Ror2 H3 4 de scFv condicionalm ente ativo	CSX <sub>31</sub> X <sub>32</sub> X <sub>33</sub> X <sub>34</sub> VX <sub>35</sub> X <sub>36</sub> X <sub>37</sub> LDX <sub>38</sub> (em que X <sub>31</sub> é R, G, H, W, ou Y; X <sub>32</sub> é F, C, N, ou Q; X <sub>33</sub> é E ou S; X <sub>34</sub> é G, E, F, H, M, Q, ou S; X <sub>35</sub> é W, A, I, P, Q, T, ou V; X <sub>36</sub> é Y, G, N, ou Q; X <sub>37</sub> é G, S, ou T; e X <sub>38</sub> é Y ou I)
146	Ror2 L1 3 de scFv condicionalm ente ativo	SATSSX <sub>19</sub> X <sub>20</sub> X <sub>21</sub> MX <sub>22</sub> (em que X <sub>19</sub> é V ou E; X <sub>20</sub> é S ou D; X <sub>21</sub> é Y, C ou D; e X <sub>22</sub> é H, G ou L)
147	Ror2 L1 4 de scFv condicionalm ente ativo	RASESVDRYGNSX <sub>39</sub> IH (em que X <sub>39</sub> é F, S ou T)
148	Ror2 L2 3 de scFv condicionalm ente ativo	X <sub>23</sub> TSNLAS (em que X <sub>23</sub> é G, C, H ou P)
149	Ror2 L2 4 de scFv condicionalm ente ativo	X <sub>40</sub> TYX <sub>41</sub> LES (em que X <sub>40</sub> é R, C, D, E ou W; e X <sub>41</sub> é N ou D)

150	Ror2 L3 3 de scFv condicionalmente ativo	QX <sub>24</sub> X <sub>25</sub> SX <sub>26</sub> YPFX <sub>27</sub> X <sub>28</sub> (em que X <sub>24</sub> é Q ou E; X <sub>25</sub> é R ou H; X <sub>26</sub> é S, D, G, I, Q ou V; X <sub>27</sub> é T ou D; e X <sub>28</sub> é F, D, ou E)
151	Ror2 CAB3 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTMHWI RQSPSRGLEWLGGINDNNGGTGYNQKFKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLYSYGNSYFDYW GQGT LVT VSS
152	Ror2 CAB VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSIMHWYFQQR GQSPRRLIYHTSNLASGVPRDFSGSGSGTDFTLKISR EAEDVGVYYCQQRSSYPFTFGQGTKVEIK
153	scFv de F1-1-11	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGYWYNNW RQARGQRLEWIGYITYDGSKNYPNPSLKNRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCSHFEGVWYGLDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GSAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDRYGNFSI HWYQQKPGKAPKLLIYRTYNLESGIPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDFAVYYCQQTNEPWFPGQGTKVEIK
154	scFv de F1-1-17	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGEYWYNNW RQARGQRLEWIGYITYDGSKNYPNPSLKNRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCSRFEVWYGLDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVG DRVTITCRASESVDRYGNFSIHWYQQKPGKAPKLLIYRT YNLESGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQT NEPWFPGQGTKVEIK
155	scFv de F1-1-25	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSIMHWYFQQR GQSPRRLIYHTSNLASGVPRDFSGSGSGTDFTLKISR EAEDVGVYYCQQRSSYPFTFGQGTKVEIKGGGGSGG

		GGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTEYTMHWIRQSPSRGLEWLGGINDNNGGTGYNQKFK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLYS YGNSYFDYWGQGTLVTVSS
156	scFv de F1- 1-26	LVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTMHWIRQS PSRGLEWLGGINDNNGGTGYNQKFKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLYSYGNSYFDYWGQ GTLVTVSS
157	scFV de F1- 1-9	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGYWNNW RQARGQRLEWIGYITYDGSKNYPNPSLKNRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCSHFEGVWYGLDYWGQGT LTVVSSGGGGSGGGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVG DRVTITCRASESVDRYGNSFIHWYQQKPGKAPKLLIYRT YNLESGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQ TNEDPWTFGQGTKVEIK
158	scFV de F1- 1-21	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDRYGNSFIHW YQQKPGKAPKLLIYRTYNLESGIPARFSGSGSGTEFTLT SSLQSEDFAVYYCQQTNEDPWTFGQGTKVEIKGGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGY SITTGEYWNWRQARGQRLEWIGYITYDGSKNYPNPSL KNRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCSRFEV WYGLDYWGQGTLVTVSS
159	scFV de F1- 2-3	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFWGATMNWIR QPPGKGLEWIGLIKPSNGGTSYNQKFKGRVTISADKSI TAYLQWSSLKASDTAMYYCAHGHHYESYEAMDYWGQG TLTVVSSGGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVVSAVAWY QQKPGQAPRLLIYWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQEHFSPPLTFGQGTKVEIK

160	scFV de F1- 2-8	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVVSAVAWYQQ KPGQAPRLLIYWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYCQEHFSPPLTFGQGTKVEIKGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSF WGATMNWIRQPPGKGLEWIGLIKPSNGGTSYNQKFKG RVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAHGHYESYE AMDYWGQGTLVTVSS</p>
161	scFV de F1- 2-10	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVVSAVAWYQQ KPGQAPRLLIYWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYCQEHFSPPLTFGQGTKVEIKGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVK KPGATVKISCKVSGYSFWGATMNWIRQPPGKGLEWIGL IKPSNGGTSYNQKFKGRVTISADKSISTAYLQWSSLKAS DTAMYYCAHGHYESYEAMDYWGQGTLVTVSS</p>

## REIVINDICAÇÕES

1. Receptor de antígeno quimérico para ligar Axl ou Ror2 **caracterizado** por compreender:

- a) uma região de direcionamento específica de antígeno (ASTR) condicionalmente ativa que exhibe uma ligação aumentada a Axl ou Ror2 a um pH de 6,7 em comparação com um pH de 7,4;
- b) um domínio transmembranar; e
- c) um domínio de ativação intracelular, em que o domínio transmembranar está localizado entre o ASTR e o domínio de ativação intracelular.

2. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR se liga a Axl.

3. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR se liga ao mesmo epítipo de Axl como um fragmento de anticorpo variável de cadeia única que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:79 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:80.

4. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR é um anticorpo selecionado de um anticorpo de cadeia única, um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento (Fab')<sub>2</sub>, um fragmento Fv e um anticorpo de cadeia única divalente ou um diacorpo.

5. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR é um fragmento variável de cadeia única que compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve.

6. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR que se liga a Axl compreende uma região variável de cadeia pesada de anticorpo que compreende três regiões determinantes de complementaridade que têm sequências H1, H2 e H3, em que:

- a) a sequência H1 é X<sub>1</sub>GX<sub>2</sub>TMN (SEQ ID NO:87);

b) a sequência H2 é LIKPSNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:88); e

c) a sequência H3 é GX<sub>3</sub>YX<sub>4</sub>SYX<sub>5</sub>AMDY (SEQ ID NO:89),

em que X<sub>1</sub> é T ou W; X<sub>2</sub> é H ou A; X<sub>3</sub> é H ou D; X<sub>4</sub> é E ou H; e X<sub>5</sub> é E ou F.

7. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:79.

8. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o dito ASTR compreende uma região variável de cadeia leve que compreende três regiões determinantes de complementaridade que têm sequências L1, L2 e L3, em que:

d) a sequência L1 é KASQDVX<sub>6</sub>SAVA (SEQ ID NO:90);

e) a sequência L2 é WX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>TRX<sub>9</sub>T (SEQ ID NO:91); e

f) a sequência L3 é QEHFSX<sub>10</sub>PLX<sub>11</sub> (SEQ ID NO:92),

em que X<sub>6</sub> é S ou V; X<sub>7</sub> é A ou Q; X<sub>8</sub> é S ou D; X<sub>9</sub> é H ou D; X<sub>10</sub> é T ou P; e X<sub>11</sub> é T ou R.

9. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que a região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:80.

10. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:79.

11. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 10, **caracterizado** pelo fato de que as cadeias pesada e leve são separadas por um ligante, em que o ligante tem entre 6 e 100 aminoácidos de comprimento.

12. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada e a região variável de cadeia leve são separadas por ligante 1 (SEQ ID NO:53), ligante 2 (SEQ ID NO:54) ou ligante 3 (SEQ ID NO:55).

13. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 12,

**caracterizado** pelo fato de que a cadeia pesada é N-terminal em relação à cadeia leve.

14. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:129, ou SEQ ID NO:159.

15. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que a cadeia leve é N-terminal em relação à cadeia pesada.

16. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:160 ou SEQ ID NO:161.

17. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 16, **caracterizado** pelo fato de que o receptor de antígeno quimérico compreende adicionalmente um domínio stalk e um domínio coestimulador.

18. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que o receptor de antígeno quimérico compreende de amino terminal a carboxi terminal, o ASTR, o domínio stalk, o domínio transmembranar, o domínio coestimulador e o domínio de ativação intracelular.

19. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ativação intracelular é um domínio de ativação de CD3Z e em que o domínio coestimulador é um domínio coestimulador de ICΔ, um domínio coestimulador de C28, ou compreende tanto um domínio coestimulador de ICΔ como um domínio coestimulador de CD137.

20. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato de que o domínio stalk é um domínio stalk de CD8 ou um domínio stalk de CD28, em que o domínio transmembranar é um domínio transmembranar de CD8 ou um domínio transmembranar de CD28, em que o domínio de ativação intracelular é um domínio de ativação de CD3Z, e em que o domínio coestimulador é um domínio coestimulador de CD137 ou um domínio

coestimulador de ICΔ.

21. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que o domínio coestimulador é um domínio coestimulador de ICΔ.

22. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR se liga a Ror2.

23. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84 ou em que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um fragmento de anticorpo variável de cadeia única que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152.

24. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um fragmento de anticorpo variável de cadeia única que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84 ou em que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um fragmento de anticorpo variável de cadeia única que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152.

25. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 23 ou 24, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR é um anticorpo selecionado de um anticorpo de cadeia única, um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento (Fab')<sub>2</sub>, um fragmento Fv e um anticorpo de cadeia única divalente ou um diacorpo.

26. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 23 ou 24, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR é um fragmento variável de cadeia única que compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve.

27. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 22 a 26, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR que se liga a Ror2 compreende uma região variável de cadeia pesada que inclui três regiões determinantes de complementaridade, em que as ditas regiões têm sequências H1, H2 e H3, em que:

- a) a sequência H1 é GYTX<sub>1</sub>TEX<sub>2</sub>TX<sub>3</sub>H (SEQ ID NO:95) ou X<sub>4</sub>GYSITTGYWYWN (SEQ ID NO:96);
- b) a sequência H2 é GX<sub>5</sub>NX<sub>6</sub>NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:97) ou YITYDGSKNYNPSLKN (SEQ ID NO:98); e
- c) a sequência H3 é GSLYSYGNSYFDY (SEQ ID NO:99) ou FEGVWX<sub>7</sub>GLDY (SEQ ID NO:100),

em que X<sub>1</sub> é F ou E; X<sub>2</sub> é Y ou D, X<sub>3</sub> é M ou D; X<sub>4</sub> é T ou S; X<sub>5</sub> é E ou I; X<sub>6</sub> é T ou D; e X<sub>7</sub> é Y ou G.

28. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR se liga ao mesmo epítipo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84, e em que a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83.

29. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 28, **caracterizado** pelo fato de que o dito ASTR compreende uma região variável de cadeia leve que compreende três regiões determinantes de complementaridade que têm sequências L1, L2 e L3, em que:

- a) a sequência L1 é SATSSX<sub>8</sub>SYM<sub>9</sub>H (SEQ ID NO:101) ou RASESVDRYGNSFIH (SEQ ID NO:102);
- b) a sequência L2 é X<sub>9</sub>TSNLAS (SEQ ID NO:103) ou RTYNLES (SEQ ID NO:104); e
- c) a sequência L3 é QQRSSYPFT (SEQ ID NO:105) ou QQTNEDPWT (SEQ ID NO:106), em que X<sub>8</sub> é E ou V; e X<sub>9</sub> é G ou H.

30. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR compreende uma cadeia pesada de

anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84.

31. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:82 ou SEQ ID NO:83 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:84, e em que o ASTR compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:157, ou SEQ ID NO:158.

32. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152.

33. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado** pelo fato de que o ASTR se liga ao mesmo epítopo de Ror2 como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO:151 e uma cadeia leve de anticorpo de SEQ ID NO:152, e em que o ASTR compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:155 ou SEQ ID NO:156.

34. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 33, **caracterizado** pelo fato de que o receptor de antígeno quimérico compreende adicionalmente um domínio stalk e um domínio coestimulador.

35. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 34, **caracterizado** pelo fato de que o receptor de antígeno quimérico compreende de amino terminal a carboxi terminal, o ASTR, o domínio stalk, o domínio transmembranar, o domínio coestimulador e o domínio de ativação intracelular.

36. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizado** pelo fato de que o domínio stalk é um domínio stalk de CD8 ou um domínio stalk de CD28, em que o domínio transmembranar é um domínio transmembranar de CD8 ou um domínio transmembranar de CD28, em que o

domínio de ativação intracelular é um domínio de ativação de CD3Z, e em que o domínio coestimulador é um domínio coestimulador de CD137.

37. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente um domínio de reconhecimento.

38. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de reconhecimento é expresso covalentemente fixado ao receptor de antígeno quimérico.

39. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 38, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de reconhecimento é reconhecido por um anticorpo aprovado por autoridade reguladora.

40. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 38 ou 39, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de reconhecimento é pelo menos 20 aminoácidos contíguos de EGFR.

41. Célula T ou célula NK recombinante isolada **caracterizada** pelo fato de que compreende um genoma que compreende uma ou mais sequências de ácidos nucleicos operativamente ligadas a um promotor ativo em células T e/ou células NK, em que a uma ou mais sequências de ácidos nucleicos codificam um receptor de antígeno quimérico (CAR) para ligar Axl ou Ror2 de qualquer uma das reivindicações 1 a 40.

42. Célula T ou célula NK recombinante isolada, de acordo com a reivindicação 41, **caracterizada** pelo fato de que o CAR é codificado por uma sequência de ácidos nucleicos operativamente ligada ao promotor e a sequência de ácidos nucleicos que codifica o CAR codifica adicionalmente um domínio de reconhecimento, em que ácidos nucleicos que codificam o domínio de reconhecimento são separados de ácidos nucleicos que codificam o CAR por uma sequência de salto ribossomal.

43. Método para ativar uma célula T ou célula NK **caracterizado** pelo fato de que compreende colocar uma célula-alvo de mamífero em contato com a célula T e/ou a célula NK em um microambiente a um pH menor que 7,0, em que

a célula-alvo de mamífero expressa Axl ou Ror2, e em que a célula T ou célula NK expressa um receptor de antígeno quimérico (CAR) para ligar Axl ou Ror2, respectivamente, em que o CAR compreende qualquer um dos CARs das reivindicações 1 a 40.

44. Método, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o microambiente tem um pH entre 6,5 e 6,8.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizado** pelo fato de que a ativação compreende expressão e/ou produção e/ou secreção aumentada de uma citocina.

46. Método, de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que, após a ativação, a célula T aumenta a expressão de IL-2 ou IFN- $\gamma$ .

47. Método, de acordo com a reivindicação 46, **caracterizado** pelo fato de que a expressão de IL-2 ou IFN- $\gamma$  é aumentada em pelo menos 2 vezes em comparação com a expressão de IL-2 ou IFN- $\gamma$  expresso pela célula T ou célula NK antes do contato.

48. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 47, **caracterizado** pelo fato de que, após a ativação, a atividade citotóxica da célula T ou célula NK é aumentada pelo menos 2 vezes em comparação com a atividade citotóxica da célula T ou célula NK antes do contato.

49. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 48, **caracterizado** pelo fato de que a célula-alvo de mamífero é lisada após a ativação da célula T ou célula NK.

50. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 49, **caracterizado** pelo fato de que compreende, antes do contato, transduzir a célula T ou a célula NK com uma partícula retroviral recombinante incompetente de replicação que codifica o CAR em seu genoma, par modificar geneticamente a célula T ou célula NK.

51. Método, de acordo com a reivindicação 50, **caracterizado** pelo fato de que a transdução é realizada *ex vivo*.

52. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 51,

**caracterizado** pelo fato de que compreende aumentar o pH do microambiente para um pH em ou acima de 7,0, diminuindo assim a ativação da célula T ou célula NK.

53. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 52, **caracterizado** pelo fato de que o microambiente é um tumor.

54. Método, de acordo com a reivindicação 53, **caracterizado** pelo fato de que o tumor está em um indivíduo humano.

55. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 52, **caracterizado** pelo fato de que o microambiente é *in vitro* ou *ex vivo*.

56. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 55, **caracterizado** pelo fato de que a célula ativada no método é uma célula T.

57. Método para produzir uma célula T ou célula NK condicionalmente ativável **caracterizado** pelo fato de que compreende um receptor de antígeno quimérico para ligar condicionalmente Axl ou Ror2, em que o método compreende modificar geneticamente a célula T ou célula NK com um vetor de expressão que compreende um promotor operativamente ligado a sequências de nucleotídeos que codificam o receptor de antígeno quimérico de qualquer uma das reivindicações 1 a 35, em que a ligação condicional é uma ligação aumentada a Axl ou Ror2 a um pH de 6,7 em comparação com um pH de 7,4.

58. Método *ex vivo* para produzir células T e/ou células NK condicionalmente ativáveis **caracterizado** pelo fato de que compreende um receptor de antígeno quimérico para ligar for condicionalmente Axl ou Ror2, em que o método compreende:

- a) enriquecer células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) para isolar PBMCs que compreendem células T e/ou células NK de sangue isolado;
- b) ativar as células T e/ou células NK das PBMCs isoladas sob condições eficazes;
- c) transduzir as células T e/ou células NK ativadas com partículas retrovirais recombinantes incompetentes para replicação sob condições

eficazes, produzindo desse modo células T e/ou células NK geneticamente modificadas, em que as partículas retrovirais recombinantes incompetentes para replicação compreendem cada uma um genoma retroviral que compreende uma ou mais sequências de ácidos nucleicos operativamente ligadas a um promotor ativo em células T e/ou células NK, em que uma primeira sequência de ácidos nucleicos de uma ou mais sequências de ácidos nucleicos codifica um receptor de antígeno quimérico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35; e

d) expandir as células T e/ou células NK geneticamente modificadas, produzindo assim as células T e/ou células NK condicionalmente ativáveis.

59. Método, de acordo com a reivindicação 58, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende adicionalmente colher as células T e/ou células NK geneticamente modificadas após a expansão.

60. Método, de acordo com a reivindicação 59, **caracterizado** pelo fato de que compreende introduzir as células T e/ou células NK geneticamente modificadas colhidas em um indivíduo.

61. Célula T modificada **caracterizada** pelo fato de que é produzida por um método de acordo com qualquer das reivindicações 58 a 60.

62. Vetor de expressão **caracterizado** pelo fato de que compreende um ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) para ligar Axl ou Ror2 de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 40 e um promotor que é ativo na célula T ou célula NK que está posicionada no vetor de expressão para promover a expressão do ácido nucleico que codifica o CAR.

63. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 62, em que o vetor de expressão é **caracterizado** pelo fato de que é uma partícula retroviral incompetente para replicação.

64. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 63, em que o vetor de expressão é **caracterizado** pelo fato de que é um vetor lentiviral.

65. Ácido nucleico isolado **caracterizado** pelo fato de que codifica um

receptor de antígeno quimérico para ligar Axl ou Ror2 de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 40.

66. Ácido nucleico isolado, de acordo com a reivindicação 65, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico compreende adicionalmente um promotor ativo em células T e/ou células NK, e em que as sequências de ácidos nucleicos que codificam o CAR são operativamente ligadas ao promotor.

67. Ácido nucleico isolado, de acordo com a reivindicação 66, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de ácidos nucleicos isolados codifica adicionalmente um domínio de reconhecimento.

68. Ácido nucleico isolado, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que os ácidos nucleicos que codificam o domínio de reconhecimento são separados de ácidos nucleicos que codificam o CAR por uma sequência de salto ribossomal.

69. Ácido nucleico isolado, de acordo com a reivindicação 68, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de salto ribossomal é 2A-1.

70. Partícula retroviral recombinante incompetente de replicação **caracterizada** pelo fato de que compreende qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com as reivindicações 65 a 69.

71. Partícula retroviral recombinante incompetente de replicação, de acordo com a reivindicação 70, em que a partícula retroviral recombinante incompetente de replicação é **caracterizada** pelo fato de que é uma partícula lentiviral.

FIG. 1



FIG. 2A

F1-2-20

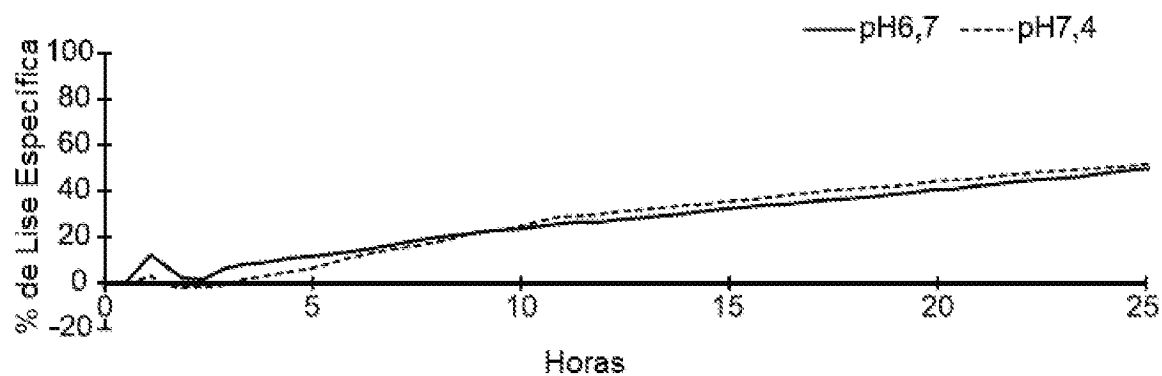


FIG. 2B

F1-2-13

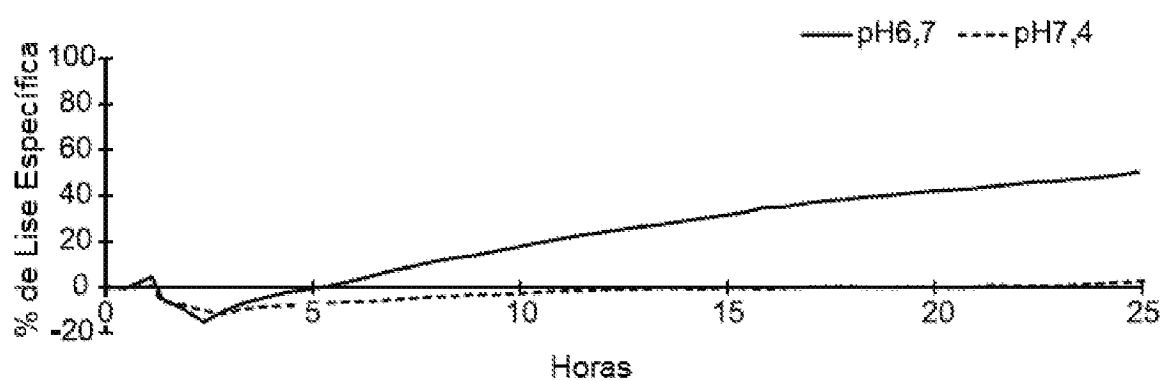


FIG. 2C

F1-2-15

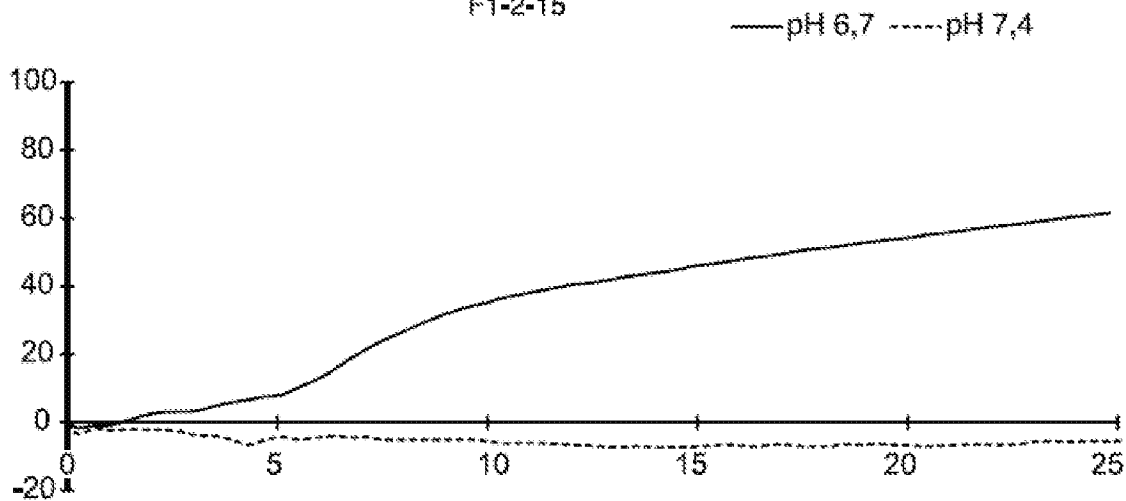


FIG. 2D

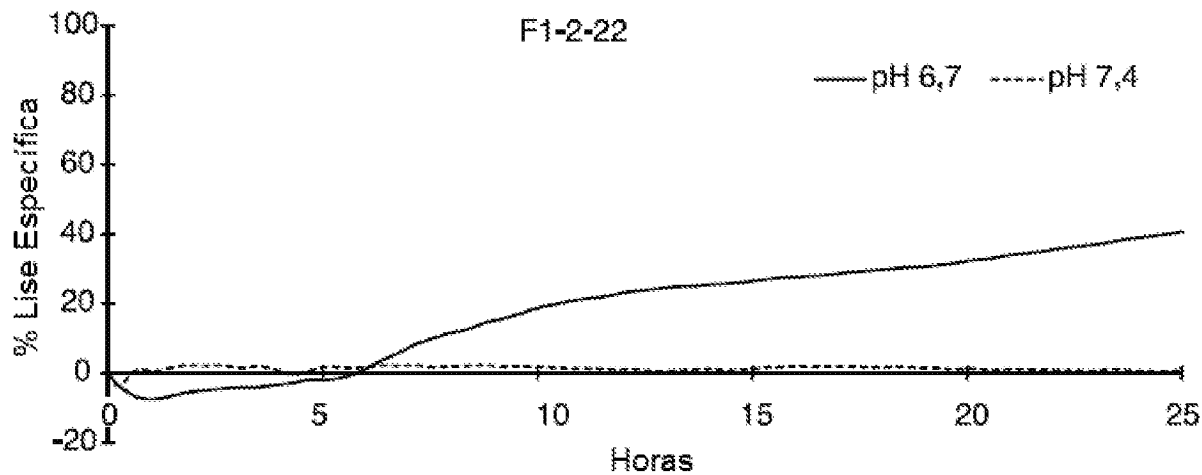


FIG. 2E

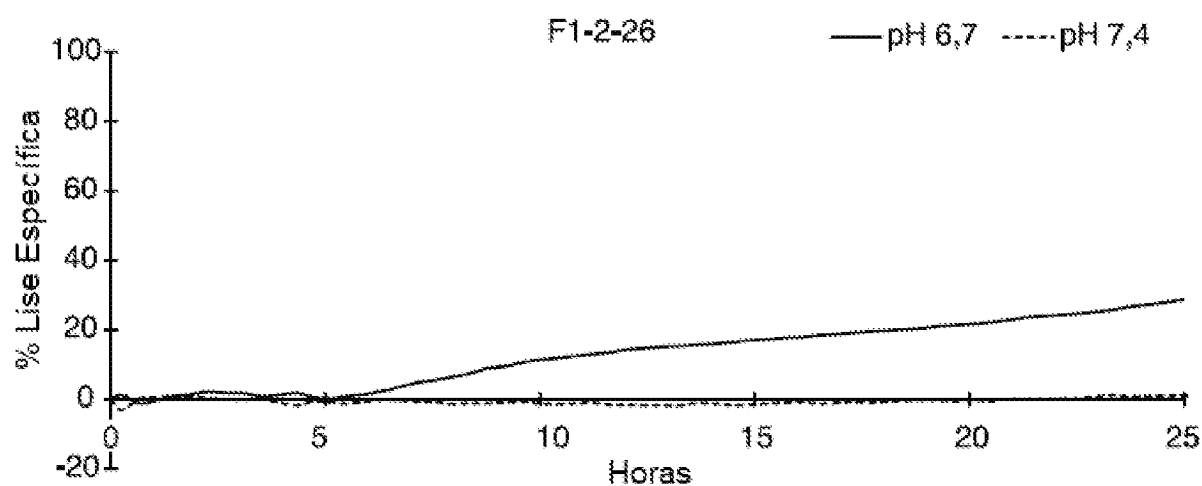


FIG. 2F

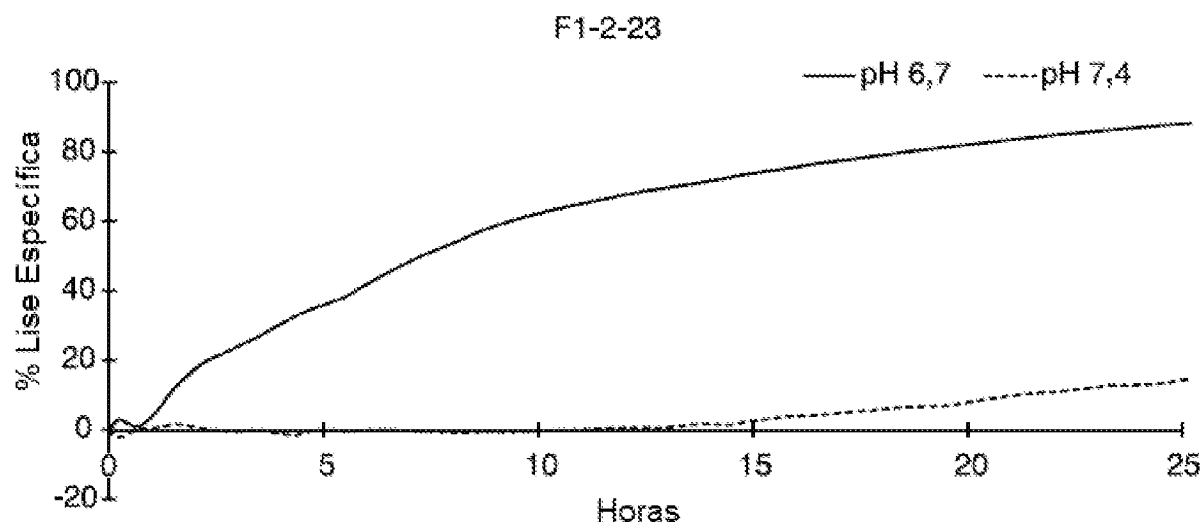


FIG. 3A

F1-1-1

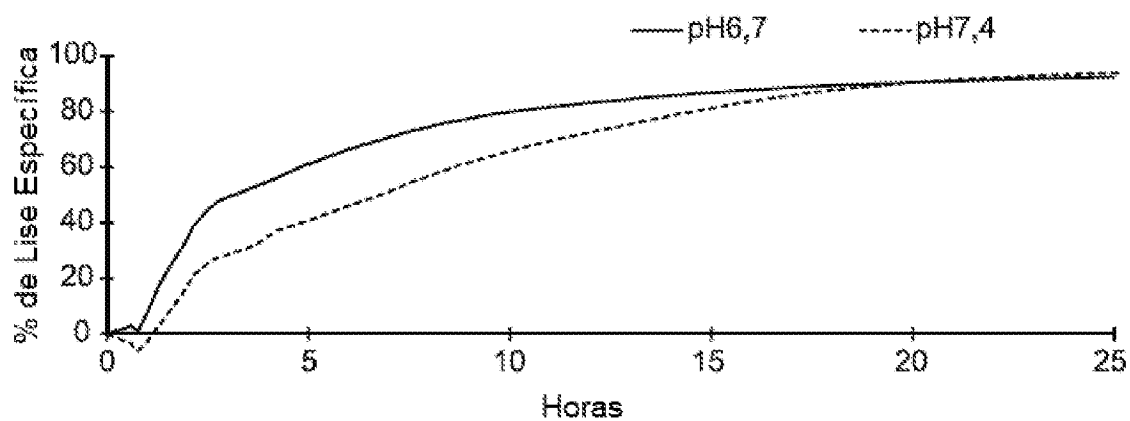


FIG. 3B

F1-1-11

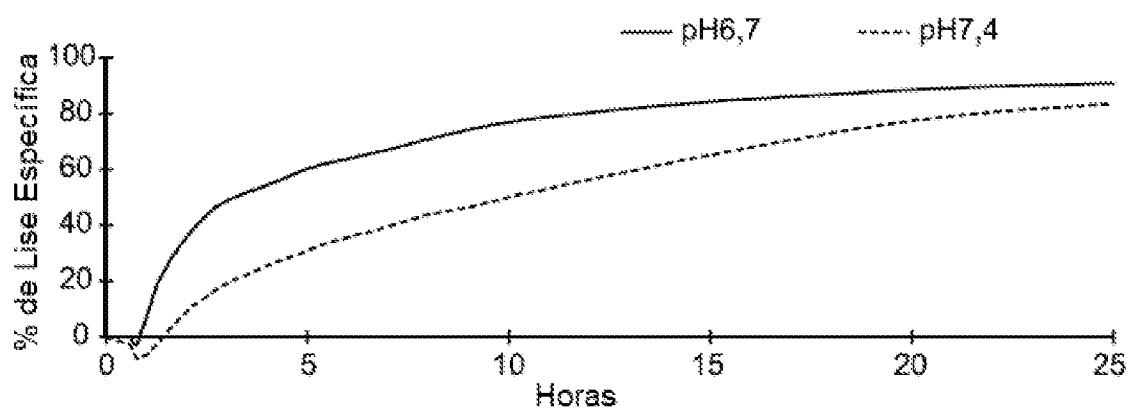


FIG. 3C

F1-1-12

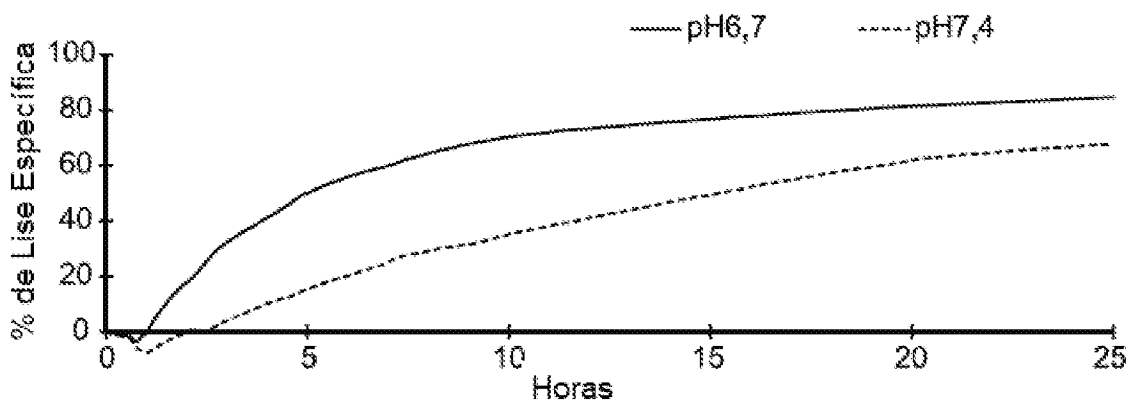


FIG. 3D

F1-1-15

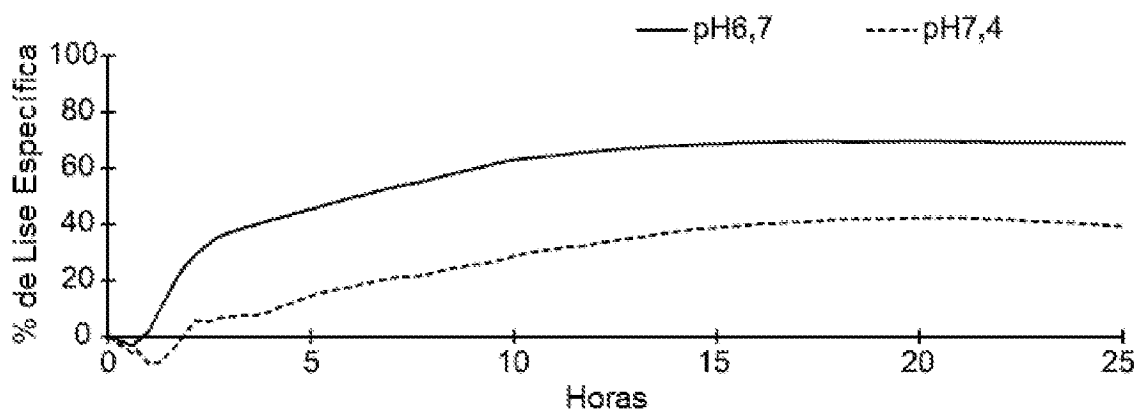


FIG. 3E

F1-1-17

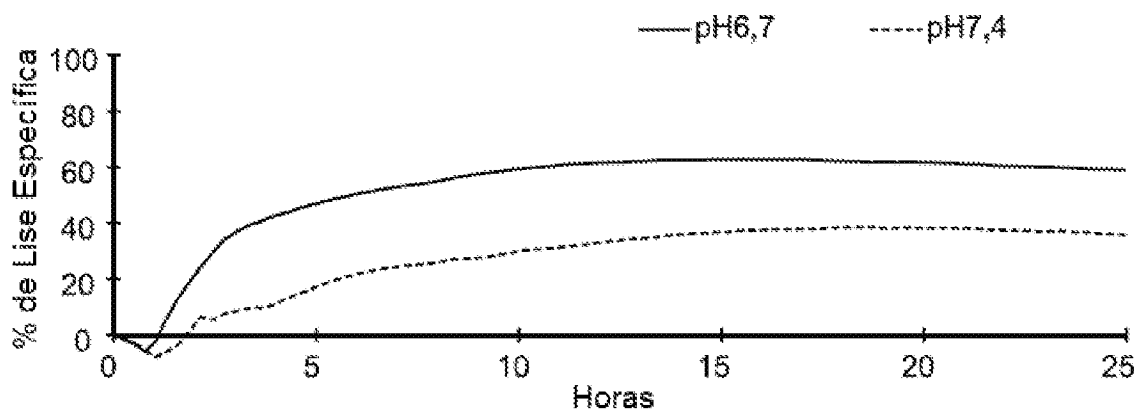


FIG. 3F

F1-1-19

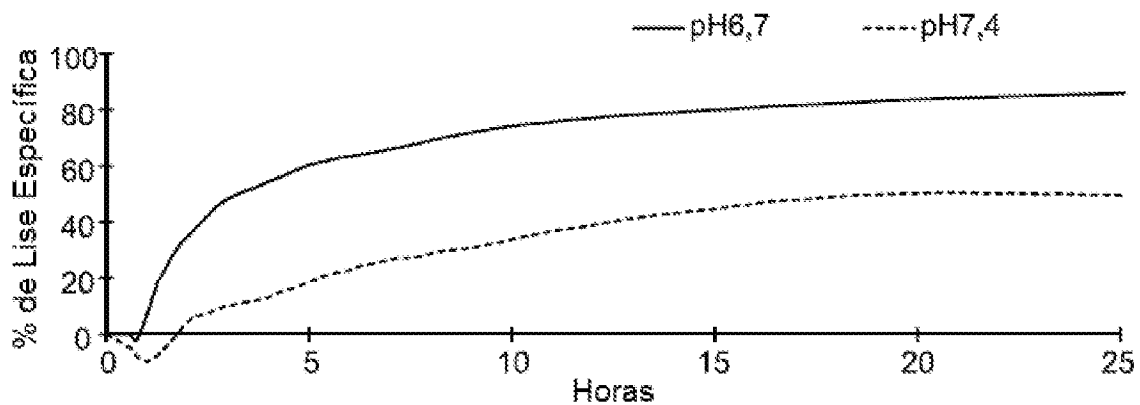


FIG. 3G

F1-1-20

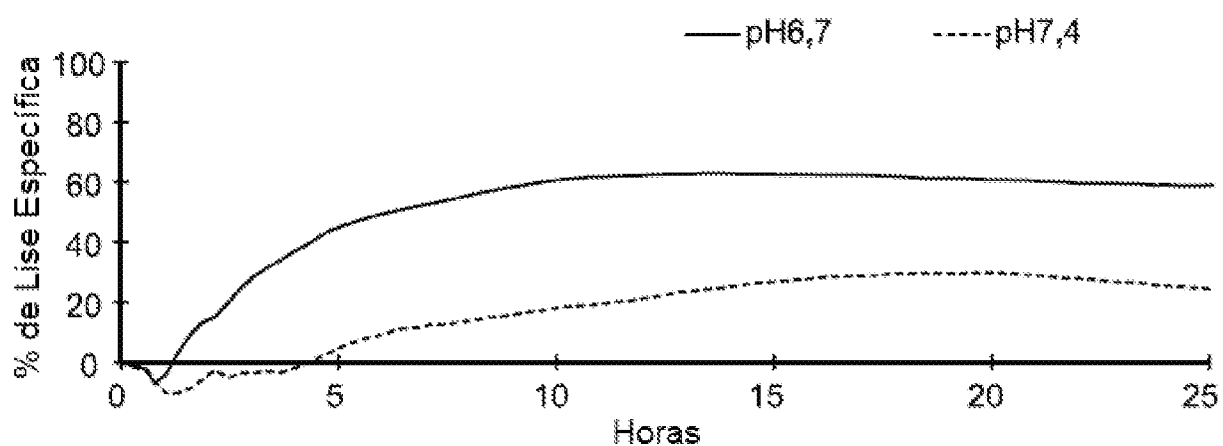
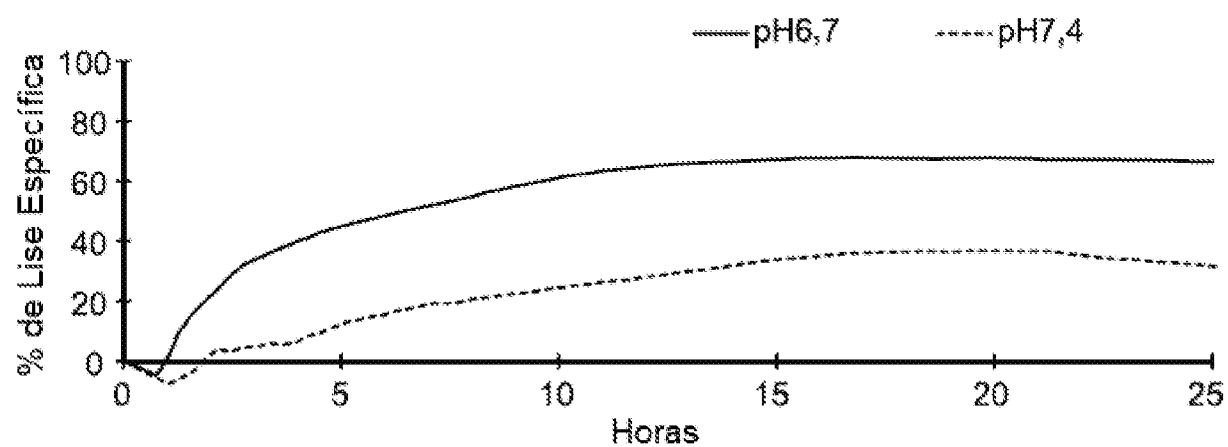


FIG. 3H

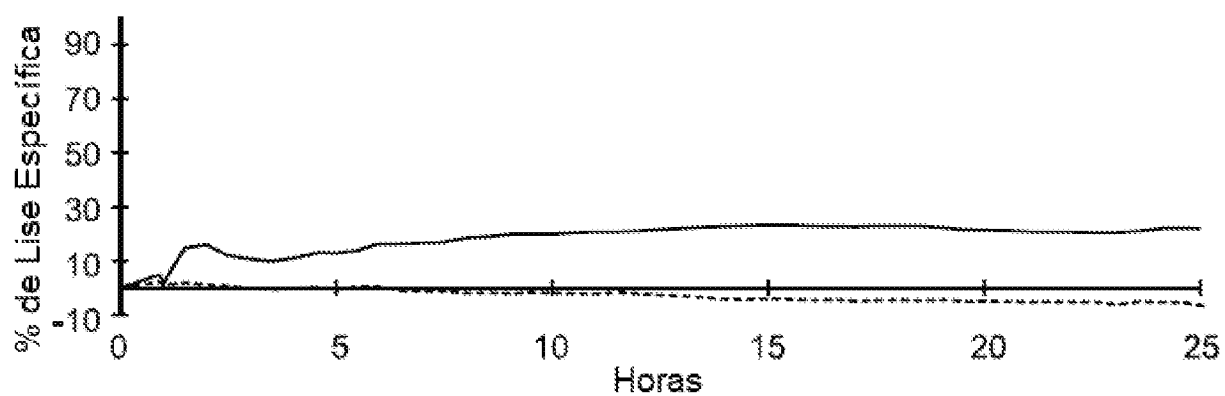
F1-1-23



**FIG. 3I**

F1-1-25

— pH6,7    - - - pH7,4

**FIG. 3J**

F1-1-25

— pH6,7    - - - pH7,4

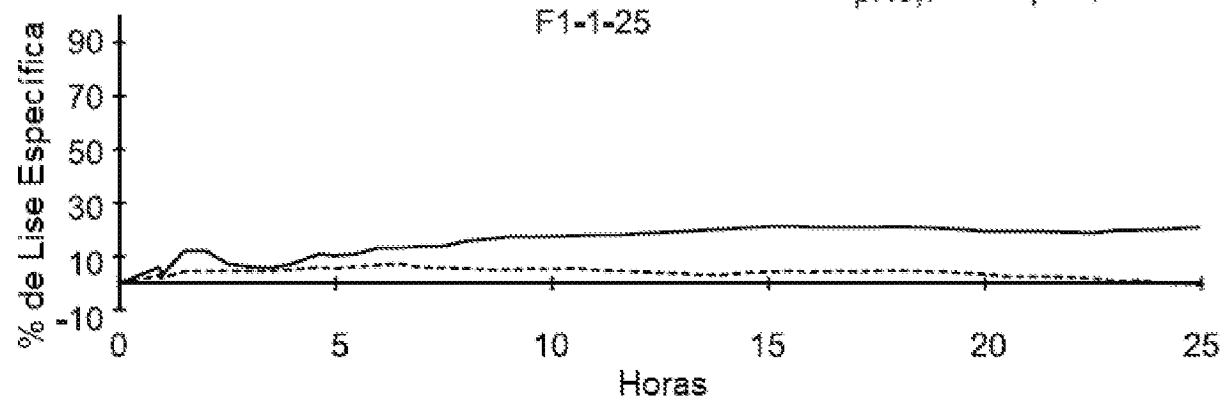


FIG. 4A

Axl (F1-2-13)  
pH de Titulação  
1:1 (Efetor:Alvo)

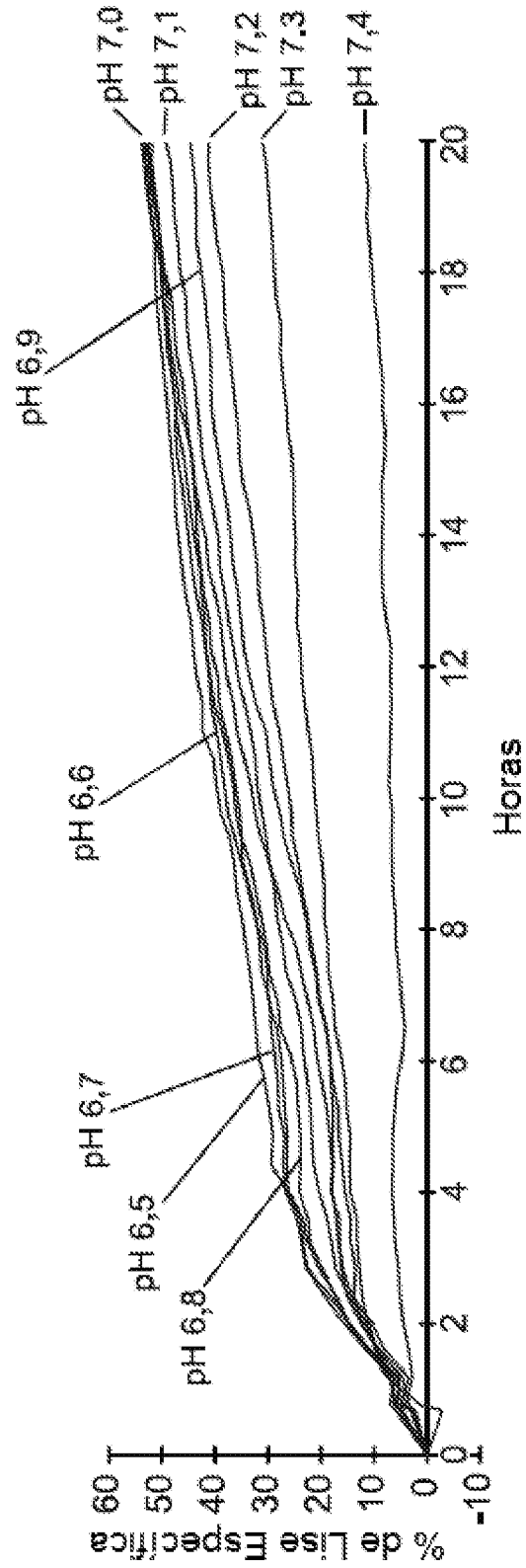


FIG. 4B

Lise Específica em 20 Horas

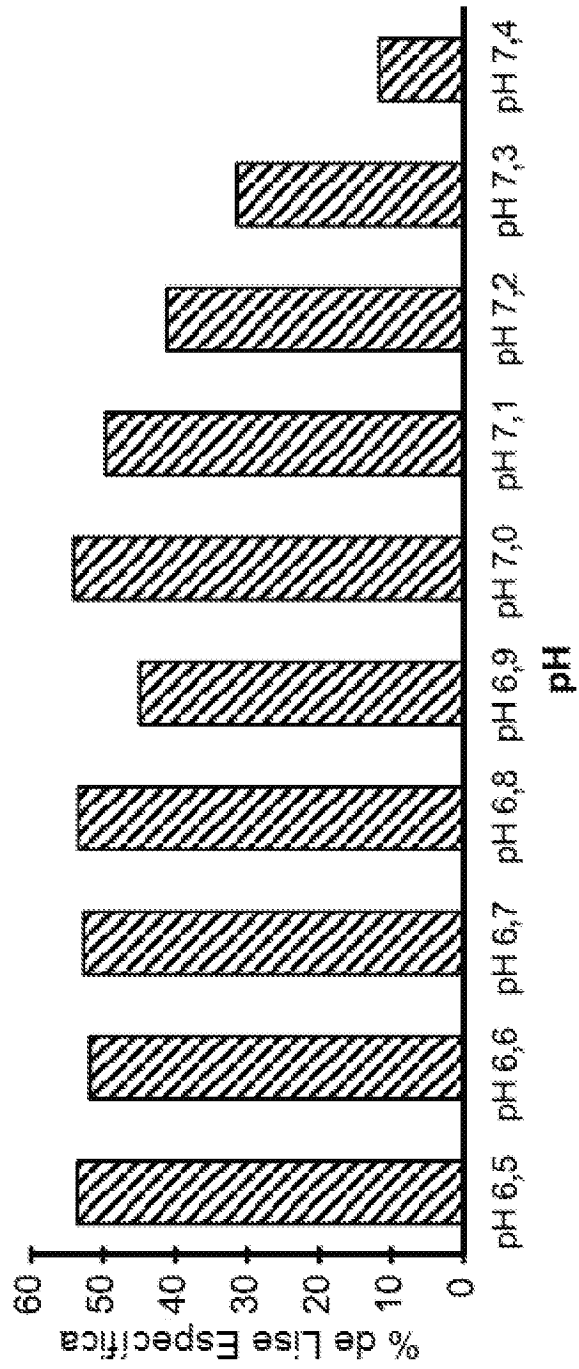


FIG. 5A

ROR2 (F1-1-15)  
pH de Titulação  
1:1 (Efetor:Alvo)

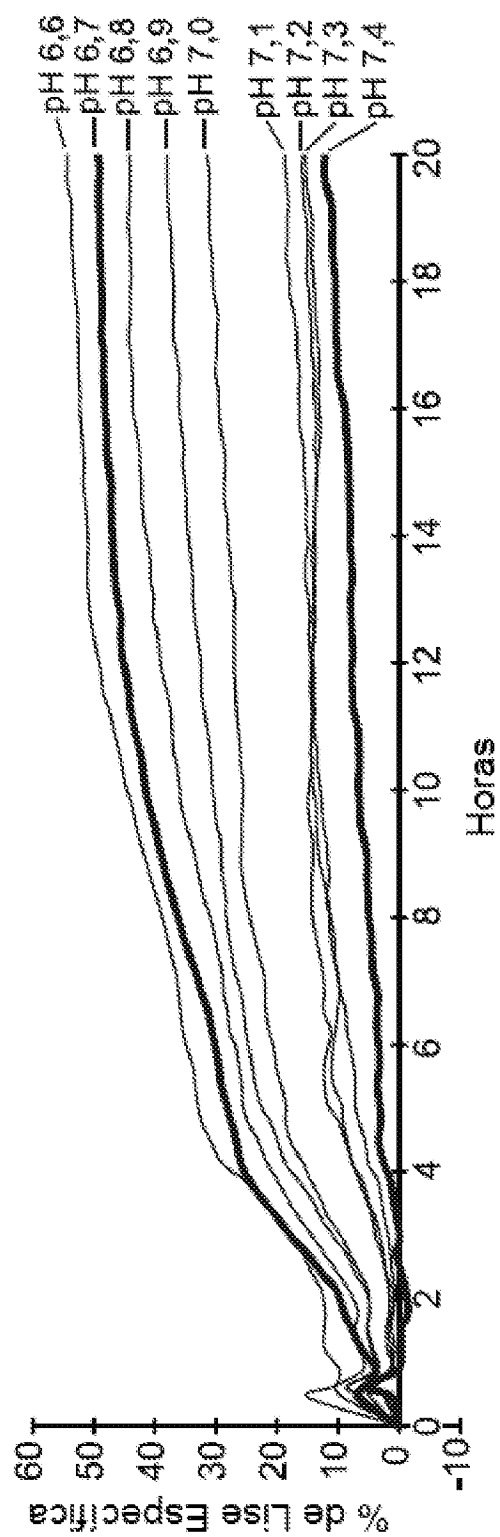


FIG. 5B

Lise Específica em 20 Horas

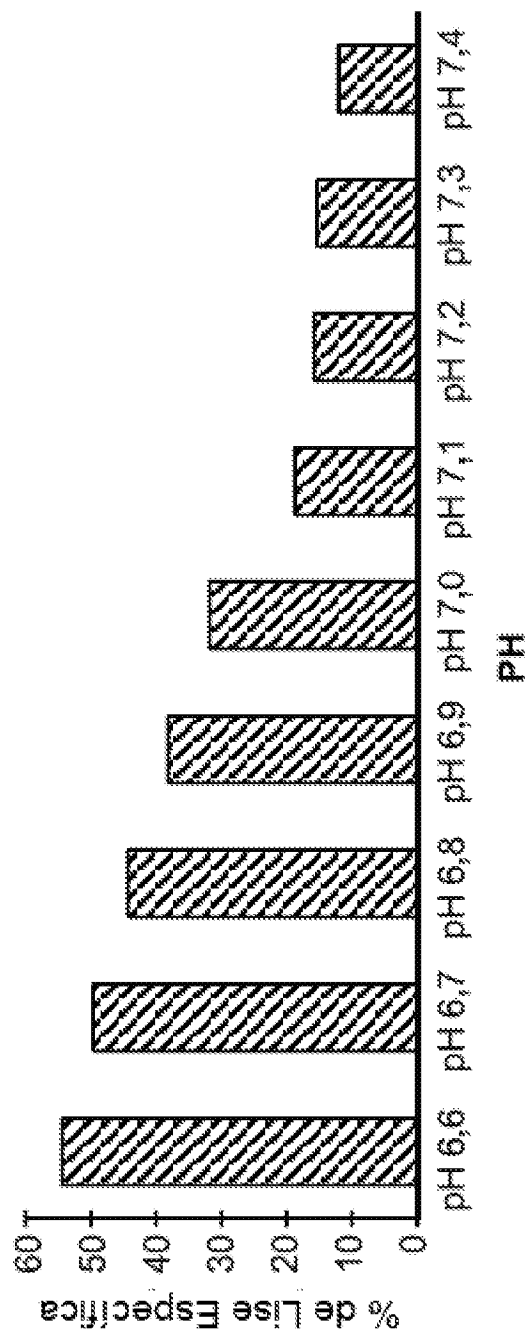


FIG. 6A  
CAB-CAR para AXL

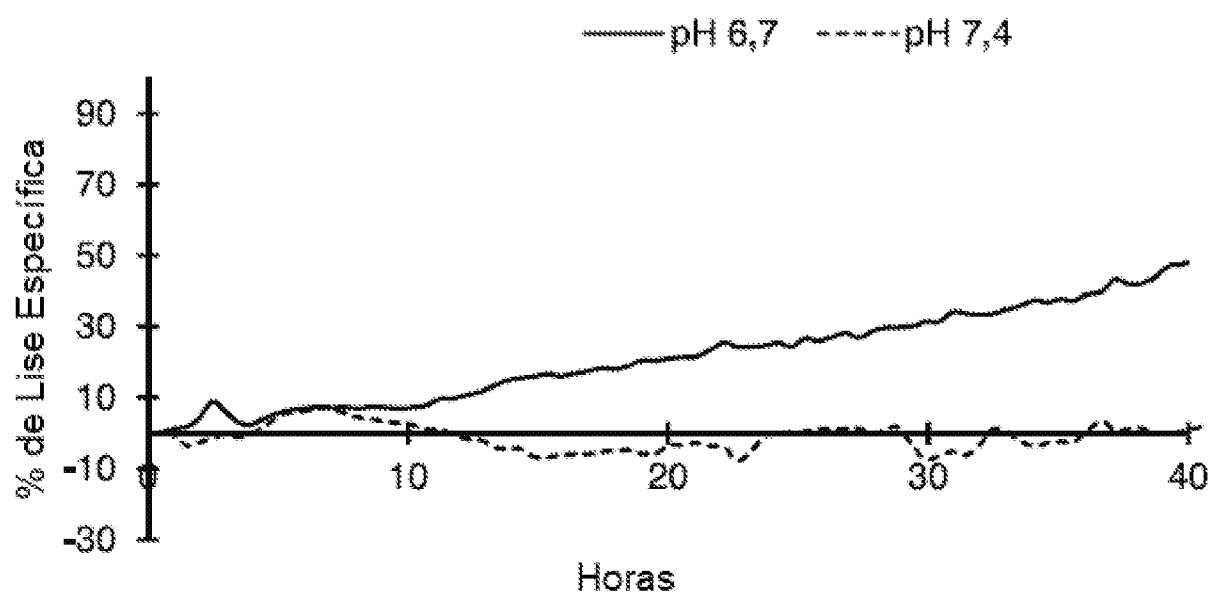


FIG. 6B  
CAB-CAR para ROR2

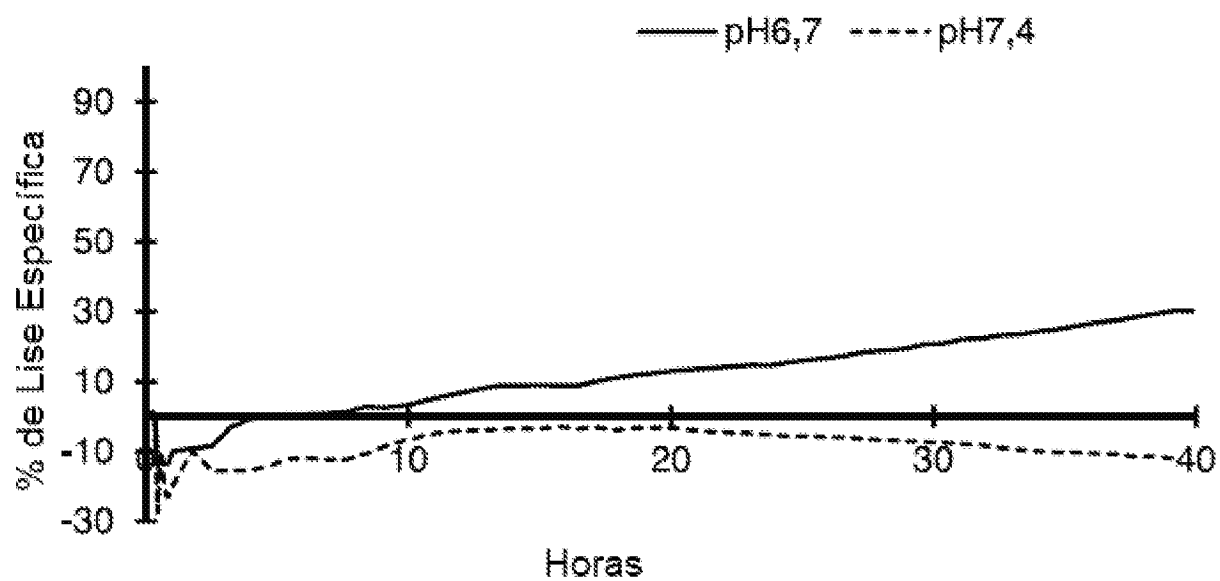


FIG. 7A

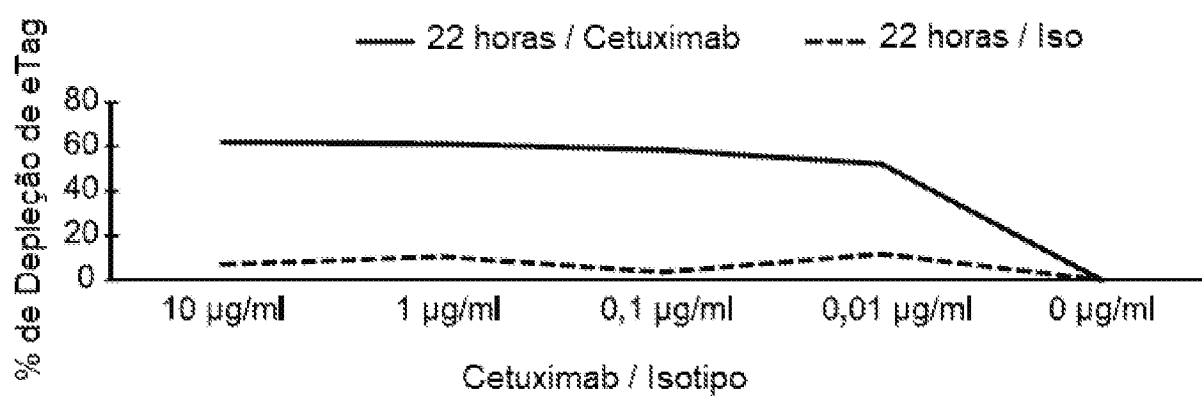


FIG. 7B

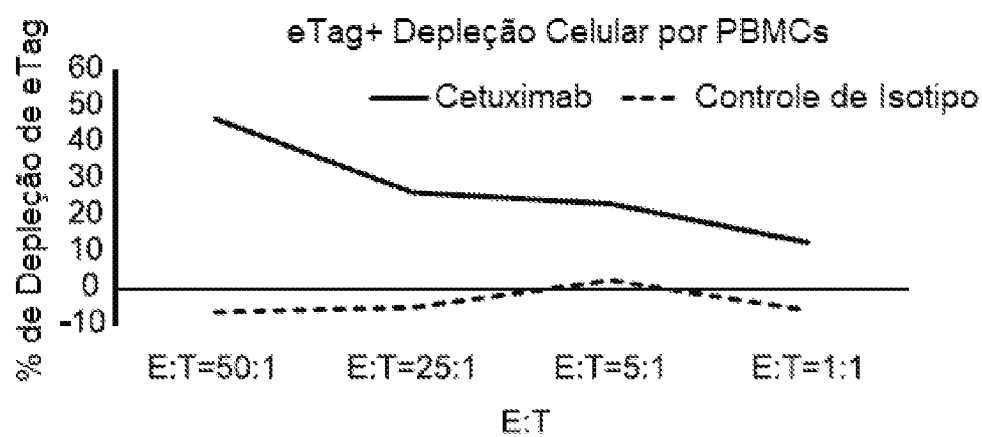


FIG. 8A

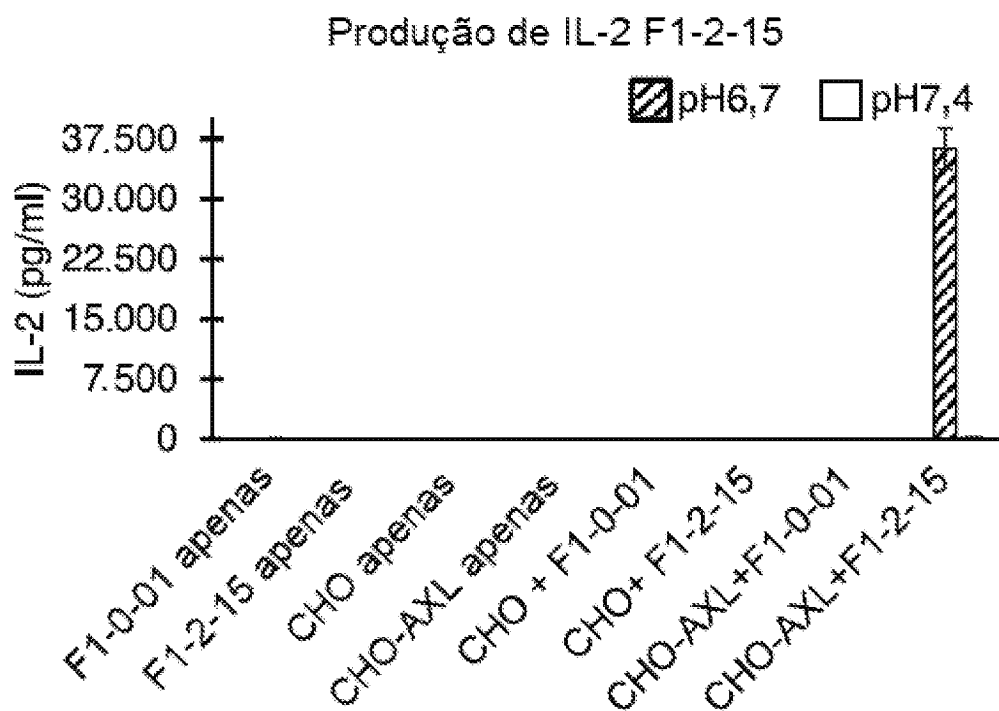


FIG. 8B

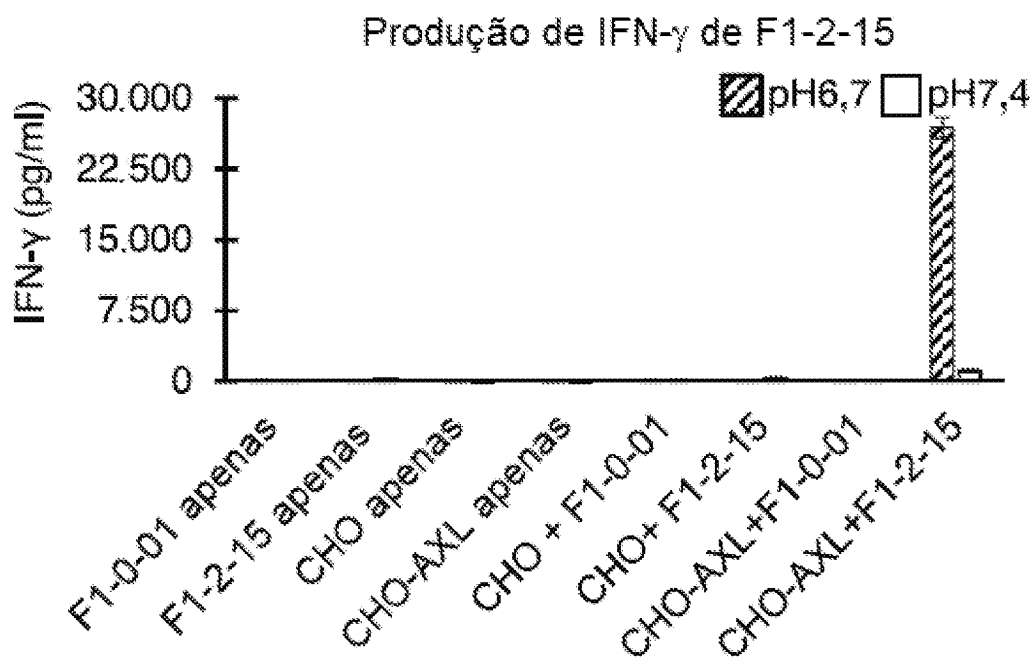


FIG. 8C

Produção de IL-2 F1-1-15

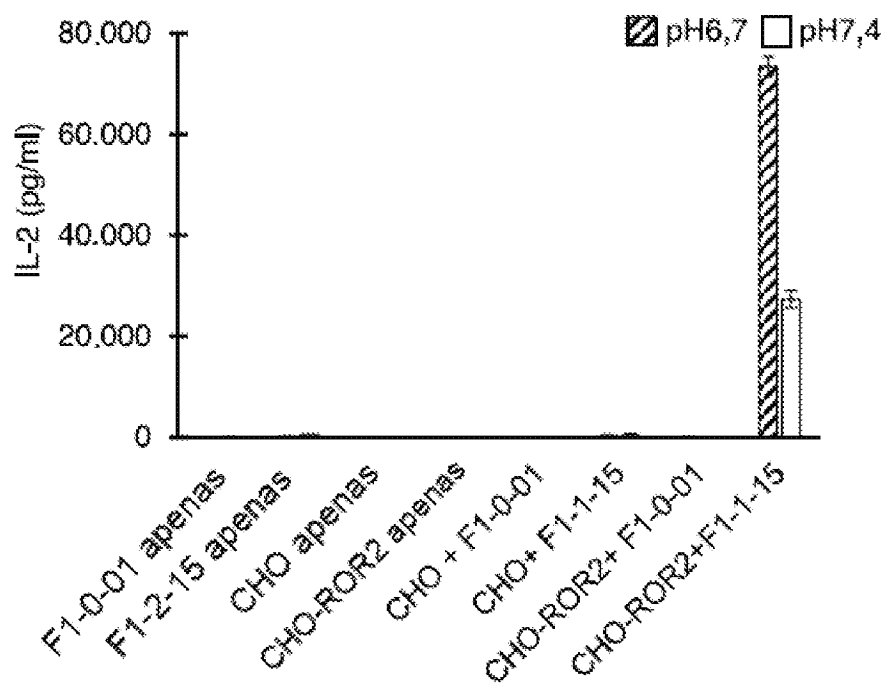


FIG. 8D

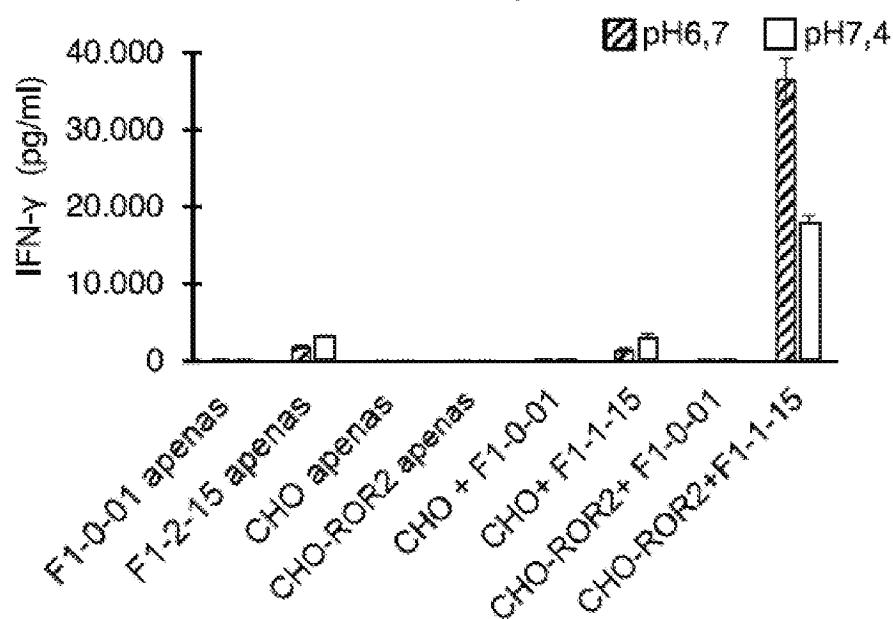
Produção de IFN- $\gamma$  de F1-1-15

FIG. 9A

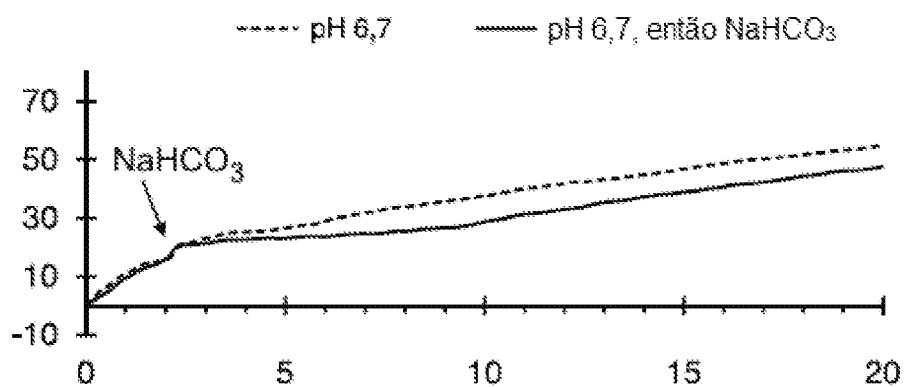


FIG. 9B

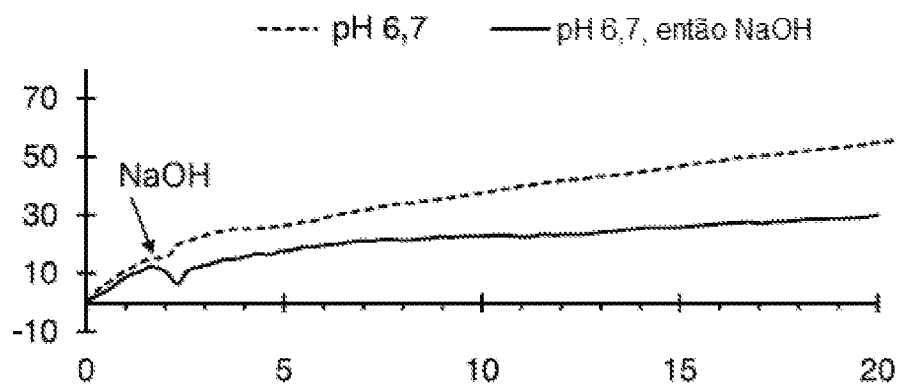


FIG. 9C

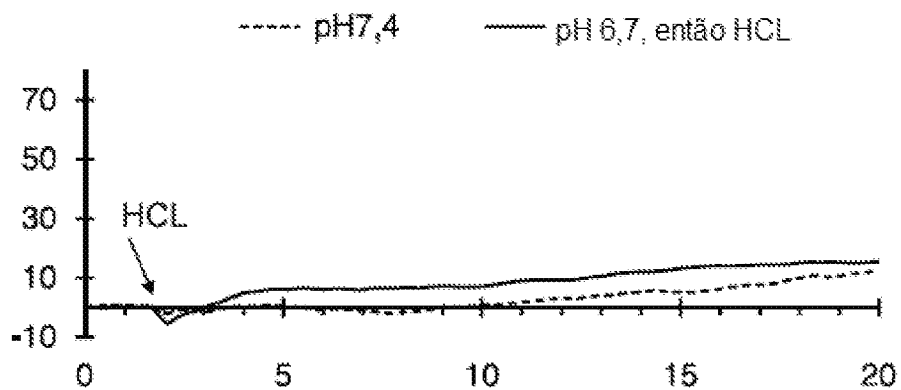


FIG. 10

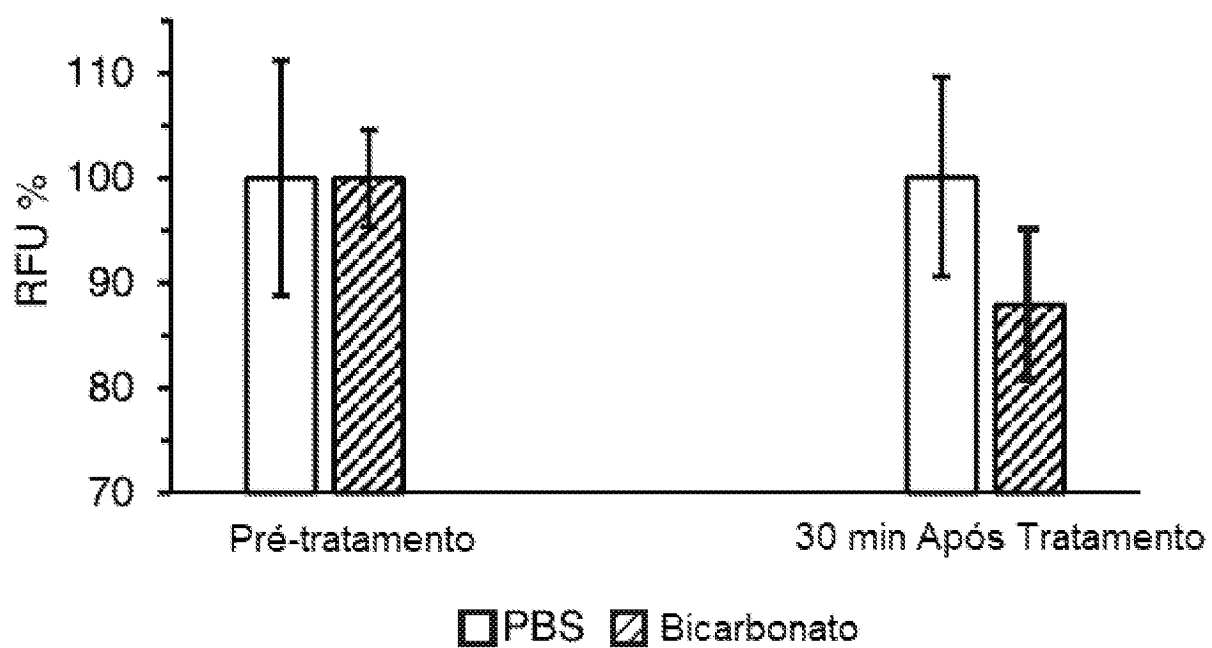


FIG. 11A

Volume de Xenoenxerto de CHO (+/-STD médio)  
n=6/grupo

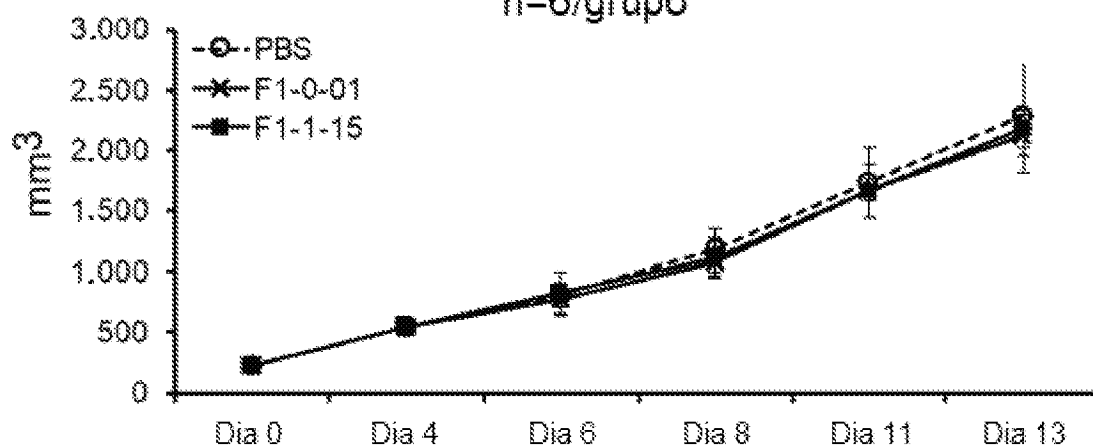


FIG. 11B

CHO-ROR2 Xenograft Volume (mean +/-STD)  
n=6/group

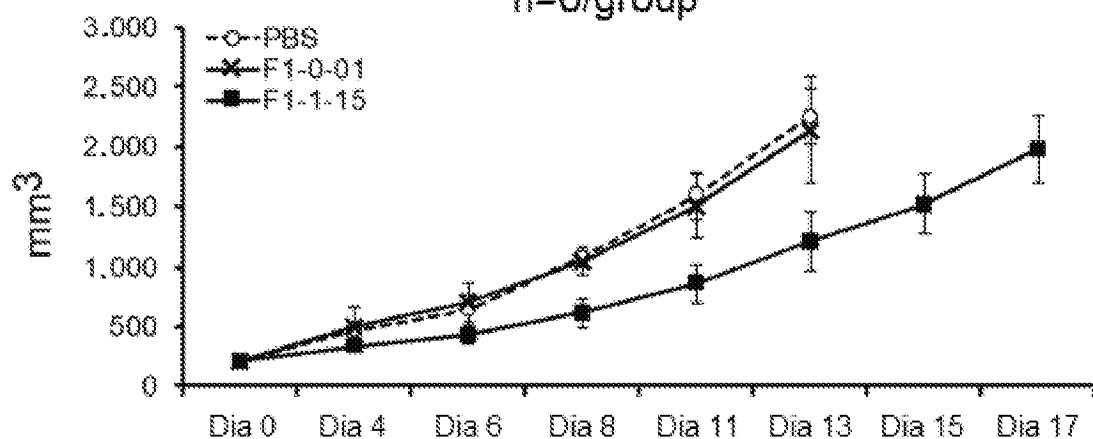


FIG. 12A

Volume de Xenoenxerto de CHO (+/-STD médio)  
n=6/grupo

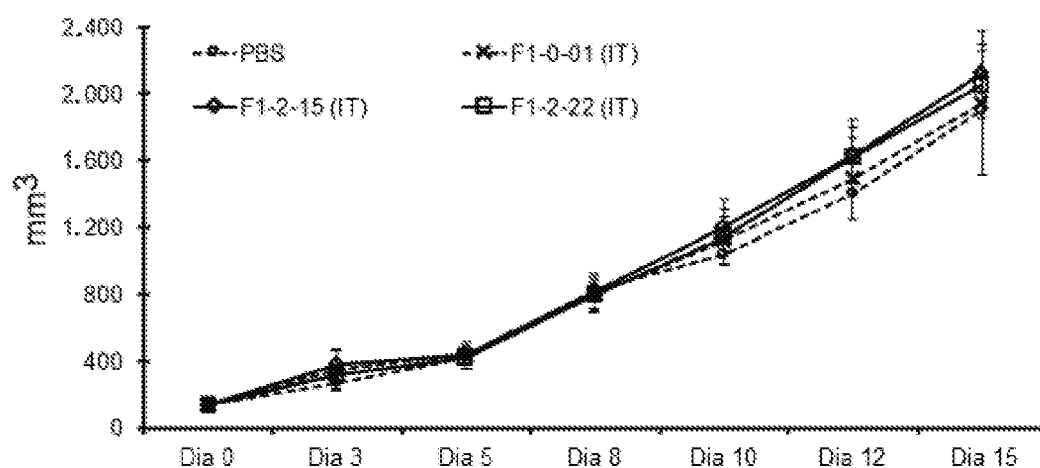


FIG. 12B

CHO-Axl Xenograft Volume (+/-STD médio)  
=6/grupo

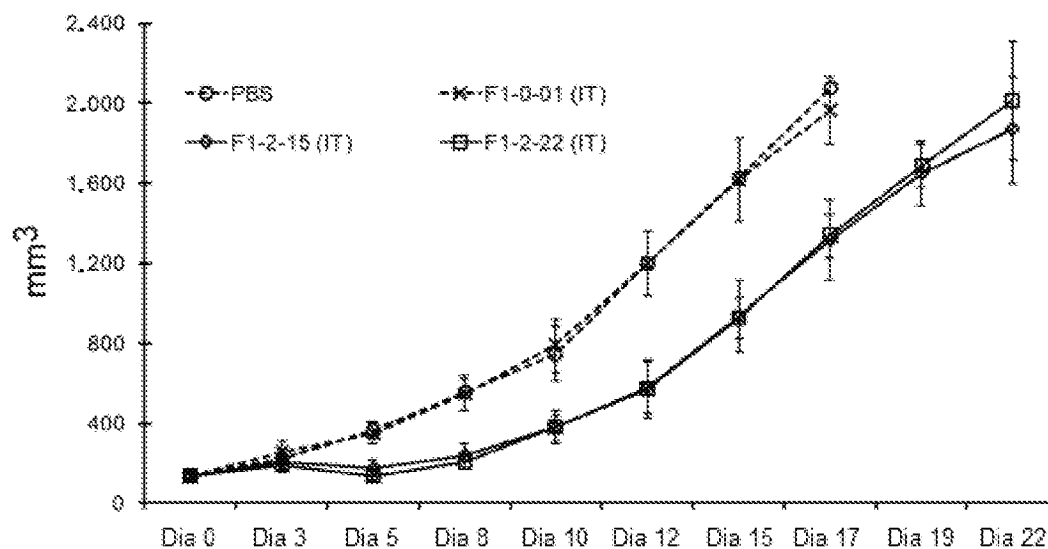


FIG. 13A

Volume de Xenoenxerto de CHO (+/-STD médio)  
n=6/grupo

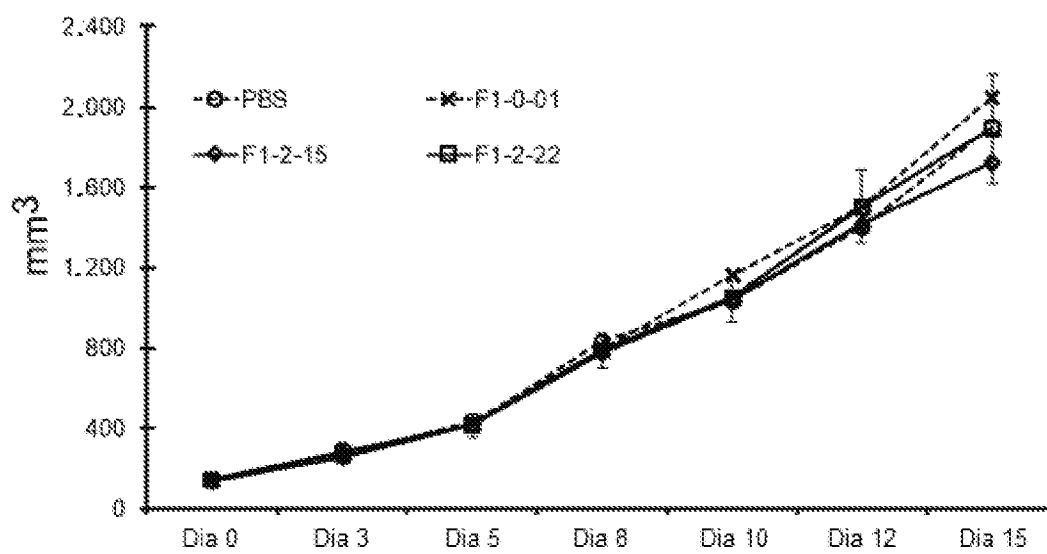


FIG. 13B

CHO-Axl Xenograft Volume (+/-STD médio)  
n=6/grupo

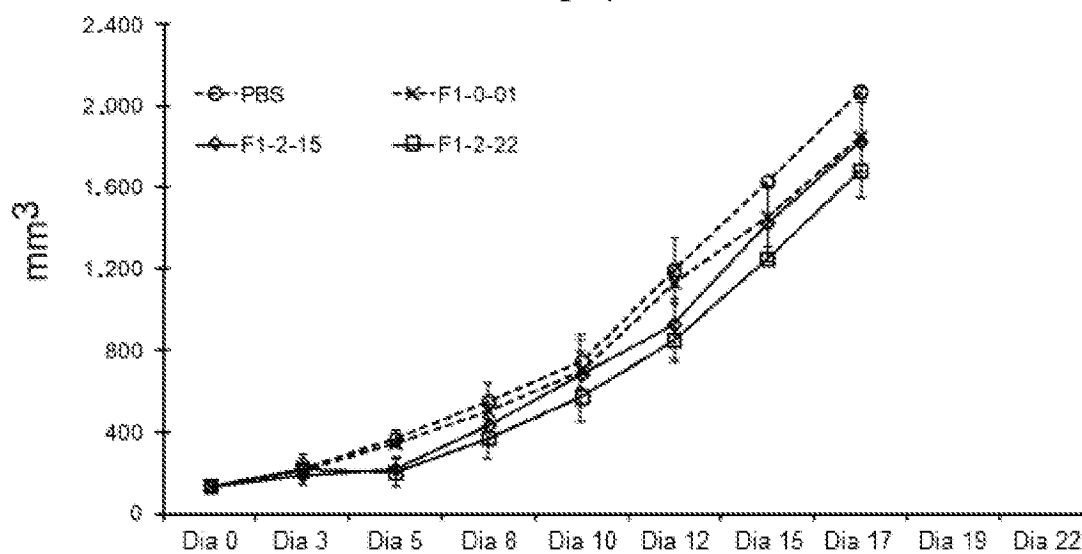


FIG. 14A

Volume de Xenoenxerto de CHO (+/-STD médio)  
n=6/grupo

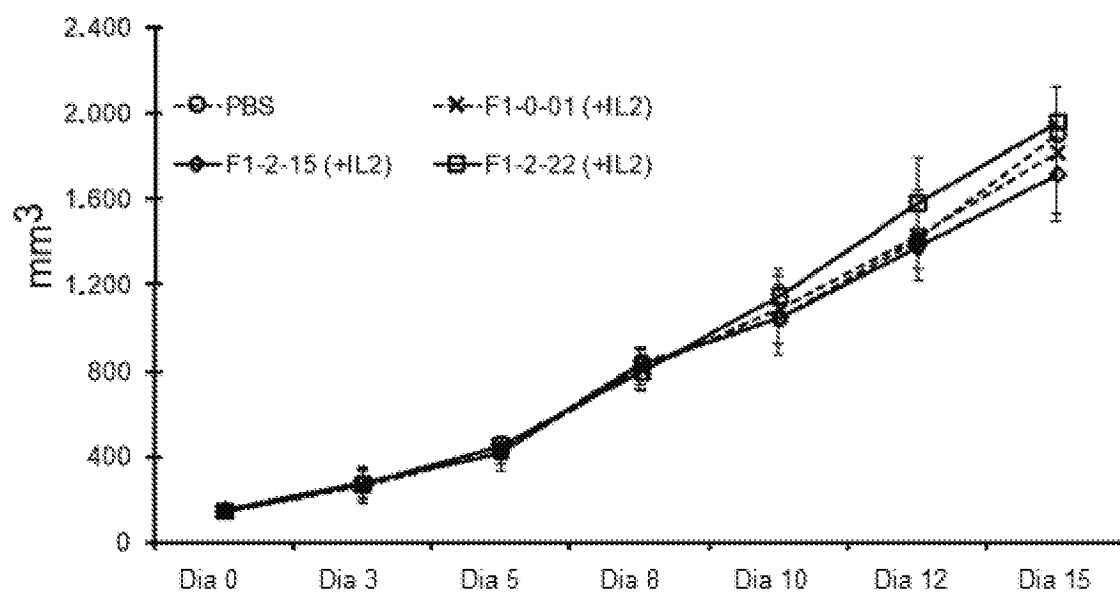
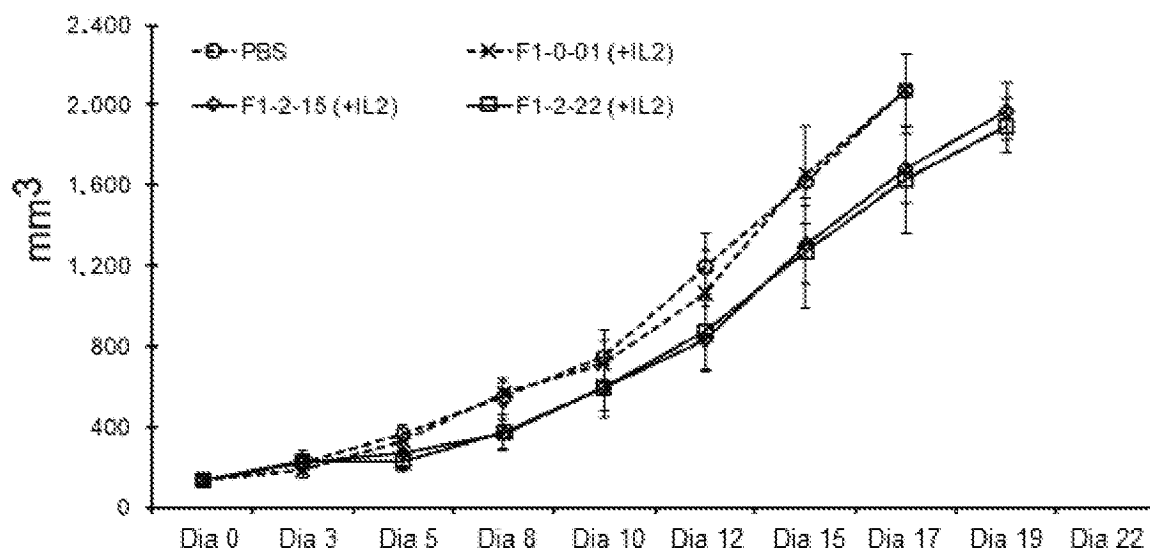


FIG. 14B

CHO-Axl Xenograft Volume (+/-STD médio)  
n=6/grupo



**RESUMO****RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICO CONTRA AXL OU ROR2 E  
MÉTODOS DE USO DOS MESMOS**

A presente revelação fornece receptores de antígenos quiméricos que se ligam a Axl e Ror2 e receptores de antígenos quiméricos (CARs) condicionalmente ativos que reconhecem Axl e Ror2. Além disso, são fornecidos aqui ácidos nucleicos que codificam esses CARs e métodos de preparo e uso dos CARs, incluindo métodos de tratamento de câncer, especialmente cânceres que expressam Axl e/ou Ror2, como carcinoma de célula renal. A presente revelação fornece células geneticamente modificadas para produzir os CARs.

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

### **Código de Controle**

#### **Campo 1**



#### **Campo 2**



#### **Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: F1.002.WO.01\_Seqlist\_Portuguese.txt
- Data de Geração do Código: 16/07/2019
- Hora de Geração do Código: 11:47:27
- Código de Controle:
  - Campo 1: 48F72C2B76727431
  - Campo 2: DC703CE44E158033