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

(21) BR 112020018173-0 A2

(22) Data do Depósito: 08/03/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 27/04/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REPROGRAMAÇÃO DE TCR USANDO PROTEÍNAS DE FUSÃO

(51) Int. Cl.: A61K 35/12; A61K 35/17; A61K 35/26; A61K 39/00; A61P 31/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 09/03/2018 US 62/641,159.

(71) Depositante(es): TCR2 THERAPEUTICS INC..

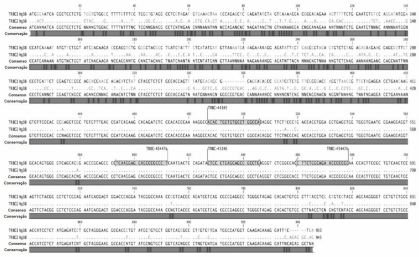
(72) Inventor(es): PATRICK ALEXANDER BAEUERLE; ROBERT HOFMEISTER; DANIEL GETTS; PHILIPPE KIEFFER-KWON; JULIE DONAGHEY.

(86) Pedido PCT: PCT US2019021315 de 08/03/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/173693 de 12/09/2019

(85) Data da Fase Nacional: 04/09/2020

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REPROGRAMAÇÃO DE TCR USANDO PROTEÍNAS DE FUSÃO. São fornecidos no presente documento ácidos nucleicos recombinantes que codificam proteínas de fusão (TFPs) de receptor de célula T (TCR) e um domínio constante de TCR, células T modificadas que expressam as moléculas codificadas e métodos para uso dos mesmos para o tratamento de doenças incluindo câncer.



“COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REPROGRAMAÇÃO DE TCR USANDO PROTEÍNAS DE FUSÃO”

REFERÊNCIA CRUZADA

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório nº U.S. 62/641.159, depositado em 9 de março de 2018, o qual é inteiramente incorporado ao presente documento, a título de referência.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A maioria dos pacientes com malignidades hematológicas ou com tumores sólidos de estágio avançado são incuráveis com terapia padrão. Além disto, as opções de tratamento adicionais têm frequentemente efeitos colaterais sérios. Várias tentativas foram feitas para engatar um sistema imunológico do paciente para rejeitar células cancerosas, uma abordagem coletivamente denominada como imunoterapia de câncer. Entretanto, diversos obstáculos tornam difícil alcançar a eficácia clínica. Embora centenas dos chamados antígenos tumorais tenham sido identificados, os mesmos são frequentemente derivados de si mesmos e podem direcionar a imunoterapia de câncer contra o tecido saudável, ou são imunogênicos de modo insatisfatório. Adicionalmente, as células de câncer usam múltiplos mecanismos para se tornarem invisíveis ou hostis à iniciação e propagação de um ataque imune por imunoterapias de câncer.

[003] Os desenvolvimentos recentes com o uso de terapia de célula T autóloga modificada de receptor de antígeno quimérico (CAR), que dependem de redirecionar células T geneticamente modificadas a uma molécula de superfície celular adequada em células de câncer, mostram resultados promissores em dominar a potência do sistema imunológico para tratar malignidades de célula B (consultar, *por exemplo*, Sadelain et al., Cancer Discovery 3:388-398 (2013)). Os resultados clínicos com células T de CAR específicas de CD19 (chamadas CTL019) mostraram remissões completas em pacientes que sofrem de leucemia linfocítica crônica (CLL), assim como em leucemia linfoblásica aguda infantil (ALL) (consultar, *por exemplo*, Kalos et al., Sci Transl Med 3:95ra73 (2011), Porter et al., NEJM

365:725-733 (2011), Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013)). Uma abordagem alternativa é o uso de cadeias alfa e beta de receptor de célula T (TCR) selecionados para antígeno de peptídeo associado a tumor para manipular geneticamente as células T autólogas. Estas cadeias de TCR formarão complexos de TCR completos e dotam as células T de um TCR para uma segunda especificidade definida. Resultados encorajadores foram obtidos com células T autólogas manipuladas que expressam cadeias alfa e beta de TCA específicas de NY-ESO-1 em pacientes com carcinoma sinovial.

[004] Além da capacidade para células T geneticamente modificadas que expressam um CAR ou um segundo TCR para reconhecer e destruir respectivas células alvo *in vitro*/*ex vivo*, a terapia de paciente bem-sucedida com células T manipuladas pode necessitar que as células T tenham capacidade para ativação forte, expansão, persistência ao longo do tempo e, no caso de doença recidivante, possibilite uma resposta de ‘memória’. A alta e gerenciável eficácia clínica de células T de CAR são atualmente limitadas às malignidades de célula B positiva de CD19 e a pacientes com sarcoma sinovial que expressa peptídeo NY-ESO-1 que expressam HLA-A2.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005] Há uma clara necessidade de melhorar células T geneticamente modificadas para atuar mais amplamente contra várias malignidades humanas.

[006] São descritas no presente documento as células T modificadas que compreendem proteínas de fusão de subunidades de TCR, incluindo cadeias de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR gama, TCR delta, TCR alfa e TCR beta com domínios de ligação específicos para antígenos de superfície celular que têm o potencial para superar as limitações de abordagens existentes. Adicionalmente, estas células T modificadas podem ter a ruptura funcional de um TCR endógeno (por exemplo TCR alfa, beta ou ambos). Estas células T modificadas podem ter a capacidade para exterminar células-alvo de modo mais eficaz do que CARs, mas liberam níveis comparáveis ou mais baixos de citocinas pró-inflamatórias. Estas

células T modificadas e métodos de seu uso podem representar uma vantagem para estas células em relação a CARs devido aos níveis elevados destas citocinas terem sido associados às toxicidades limitantes de dose para terapias de CAR-T adotivas.

[007] São fornecidas no presente documento as células T modificadas que compreendem proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) e um domínio constante de TCR, métodos para produzir as células T modificadas, e métodos para uso das mesmas para o tratamento de doenças.

[008] É divulgado no presente documento, em algumas modalidades, are ácido nucleico recombinante que compreende (a) uma sequência que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) que compreende (i) uma subunidade de TCR que compreende (1) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (2) um domínio transmembranar, e (3) um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR gama, TCR delta, TCR alfa ou TCR beta, e (ii) um anticorpo humano ou humanizado que compreende um domínio de ligação ao antígeno; e (b) uma sequência que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta, um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta, um domínio constante de TCR gama, um domínio constante de TCR delta, ou um domínio constante de TCR gama e um domínio constante de TCR delta; em que a subunidade de TCR e o anticorpo são operacionalmente ligados, e em que a TFP incorpora funcionalmente num complexo de TCR quando expressada numa célula T.

[009] É divulgado no presente documento, em algumas modalidades, o ácido nucleico recombinante que compreende (a) uma sequência que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) que compreende (i) uma subunidade de TCR que compreende (1) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (2) um domínio transmembranar, e (3) um domínio intracelular

que compreende um domínio estimulatório a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta, e (ii) um ligante de ligação ou um fragmento do mesmo que é capaz de se ligar a um anticorpo ou fragmento do mesmo; e (b) uma sequência que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta ou um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta; em que a subunidade de TCR e o ligante de ligação ou fragmento do mesmo são operacionalmente ligados, e em que a TFP incorpora funcionalmente a um complexo de TCR quando expressada numa célula T que compreende uma ruptura funcional de um TCR endógeno. Em alguns casos, o ligante de ligação é capaz de se ligar a um domínio de Fc do anticorpo. Em alguns casos, o ligante de ligação é capaz de se ligar seletivamente a um anticorpo de IgG1. Em alguns casos, o ligante de ligação é capaz de se ligar especificamente a um anticorpo de IgG1. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento do mesmo se liga a um antígeno de superfície celular. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento do mesmo se liga a um antígeno de superfície celular sobre a superfície de uma célula de tumor. Em alguns casos, o ligante de ligação compreende um monômero, um dímero, um trímero, um tetrâmero, um pentâmero, um hexâmero, um heptâmero, um octômero, um nonâmero ou um decâmero. Em alguns casos, o ligante de ligação não compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo. Em alguns casos, o ligante de ligação compreende um polipeptídeo de CD16 ou fragmento do mesmo. Em alguns casos, o ligante de ligação compreende um polipeptídeo de ligação a CD16. Em alguns casos, o ligante de ligação é humano ou humanizado. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um anticorpo ou fragmento do mesmo capaz de ser ligado pelo ligante de ligação. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento do mesmo é capaz de ser secretado a partir de uma célula.

[010] É revelado no presente documento, em algumas modalidades, o ácido

nucleico recombinante que compreende (a) uma sequência que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) que compreende (i) uma subunidade de TCR que compreende (1) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (2) um domínio transmembranar, e (3) um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta, e (ii) um domínio de antígeno que compreende um ligante ou um fragmento do mesmo que se liga a um receptor ou polipeptídeo expresso numa superfície de uma célula; e (b) uma sequência que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta ou um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta; em que a subunidade de TCR e o domínio de antígeno são operacionalmente ligados, e em que o TFP se incorpora funcionalmente a um complexo de TCR quando expresso numa célula T que compreende uma ruptura funcional de um TCR endógeno. Em alguns casos, o domínio de antígeno compreende um ligante. Em alguns casos, o ligante se liga ao receptor de uma célula. Em alguns casos, o ligante se liga ao polipeptídeo expresso numa superfície de uma célula. Em alguns casos, o receptor ou polipeptídeo expresso numa superfície de uma célula compreende um polipeptídeo ou receptor de resposta de estresse. Em alguns casos, o receptor ou polipeptídeo expresso numa superfície de uma célula é uma glicoproteína relacionada a MHC classe I. Em alguns casos, a glicoproteína relacionada a MHC classe I é selecionada do grupo que consiste em MICA, MICB, RAET1E, RAET1G, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4 e combinações dos mesmos. Em alguns casos, o domínio de antígeno compreende um monômero, um dímero, um trímero, a tetrâmero, um pentâmero, um hexâmero, um heptâmero, um octômero, um nonâmero ou um decâmero. Em alguns casos, o domínio de antígeno compreende um monômero ou um dímero do ligante ou fragmento do mesmo. Em alguns casos, o ligante ou fragmento do mesmo é um monômero, um dímero, um trímero, a tetrâmero, um pentâmero, um hexâmero, um heptâmero, um octômero,

um nonâmero ou um decâmero. Em alguns casos, o ligante ou fragmento do mesmo é um monômero ou um dímero. Em alguns casos, o domínio de antígeno não compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo. Em alguns casos, o domínio de antígeno não compreende uma região variável. Em alguns casos, o domínio de antígeno não compreende uma CDR. Em alguns casos, o ligante ou fragmento do mesmo é um ligante de grupo Natural Killer 2D (NKG2D) ou um fragmento do mesmo.

[011] Em algumas modalidades, para os ácidos nucleicos recombinantes divulgados acima, o domínio constante de TCR se incorpora a um complexo de TCR funcional quando expresso numa célula T. Em alguns casos, o domínio constante de TCR se incorpora num mesmo complexo de TCR funcional que o complexo de TCR funcional que incorpora a TFP quando expresso numa célula T. Em alguns casos, a sequência que codifica a TFP e a sequência que codifica o domínio constante de TCR estão contidas numa mesma molécula de ácido nucleico. Em alguns casos, a sequência que codifica a TFP e a sequência que codifica o domínio constante de TCR estão contidas em moléculas de ácido nucleico diferentes. Em alguns casos, a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo, o domínio de antígeno ou o ligante de ligação ou fragmento do mesmo são operacionalmente ligados por uma sequência ligante. Em alguns casos, a sequência ligante compreende $(G_4S)_n$, em que n=1 a 4. Em alguns casos, o domínio transmembranar é u m domínio transmembranar de TCR a partir de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta. Em alguns casos, o domínio intracelular é derivado de apenas CD3 épsilon, apenas CD3 gama, apenas CD3 delta, apenas TCR alfa ou apenas TCR beta. Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (ii) um domínio transmembranar de TCR, e (iii) um domínio intracelular de TCR, em que pelo menos dois dentre (i), (ii), e (iii) são da mesma subunidade de TCR. Em alguns casos, o domínio extracelular de TCR compreende um domínio extracelular ou porção do mesmo de uma proteína selecionada do grupo que consiste numa

cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, fragmentos funcionais dos mesmos, e sequências de aminoácidos do mesmo que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações. Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um domínio transmembranar que compreende um domínio transmembranar de uma proteína selecionada do grupo que consiste numa cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, uma cadeia de TCR gama, uma cadeia de TCR delta, uma cadeia de TCR zeta, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, fragmentos funcionais dos mesmos, e sequências de aminoácidos dos mesmos que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações. Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular de TCR que compreende um domínio estimulatório de uma proteína selecionada a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta, ou uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos uma modificação na mesma. Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório de uma proteína selecionada a partir de um domínio de sinalização funcional de 4-1BB e/ou um domínio de sinalização funcional de CD3 zeta, ou uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos uma modificação na mesma. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio coestimulatório. Em alguns casos, o domínio coestimulatório compreende um domínio de sinalização funcional de uma proteína selecionada do grupo que consiste em OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), e 4-1BB (CD137), e sequências de aminoácidos da mesma que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações nas mesmas. Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um motivo de ativação à base de tirosina de imunorreceptor (ITAM) de uma subunidade de TCR que compreende

um ITAM ou porção do mesmo de uma proteína selecionada do grupo que consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama, subunidade de TCR de CD3 delta, cadeia de TCR zeta, cadeia de receptor Fc épsilon 1, cadeia de receptor Fc épsilon 2, cadeia de receptor Fc gama 1, cadeia de receptor Fc gama 2a, cadeia de receptor Fc gama 2b1, cadeia de receptor Fc gama 2b2, cadeia de receptor Fc gama 3a, cadeia de receptor Fc gama 3b, cadeia de receptor Fc beta 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, fragmentos funcionais dos mesmos, e sequências de aminoácidos dos mesmos que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações nas mesmas. Em alguns casos, o ITAM substitui um ITAM de CD3 gama, CD3 delta ou CD3 épsilon. Em alguns casos, o ITAM é selecionado do grupo que consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama, e subunidade de TCR de CD3 delta e substitui um ITAM diferente selecionado do grupo que consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama e subunidade de TCR de CD3 delta. Em alguns casos, a TFP, o domínio constante de TCR alfa, o domínio constante de TCR beta, e qualquer combinação dos mesmos é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno. Em alguns casos, (a) o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa e a TFP funcionalmente se integra a um complexo de TCR que compreende uma subunidade endógena de TCR beta, CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, ou uma combinação dos mesmos; (b) o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR beta e a TFP se integra funcionalmente num complexo de TCR que compreende uma subunidade endógena de TCR alfa, CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, ou uma combinação dos mesmos; ou (c) o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta e a TFP se integra funcionalmente num complexo de TCR que compreende uma

subunidade endógena de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, ou uma combinação dos mesmos. Em alguns casos, a pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações no mesmo compreendem uma modificação de um aminoácido que medeia a sinalização celular ou uma modificação de um aminoácido que é fosforilado em resposta a um ligante que se liga à TFP. Em alguns casos, o anticorpo humano ou humanizado é um fragmento de anticorpo. Em alguns casos, o fragmento de anticorpo é um scFv, um domínio de anticorpo de domínio único, um domínio V_H ou um domínio V_L. Em alguns casos, o anticorpo humano ou humanizado que compreende um domínio de ligação ao antígeno é selecionado de um grupo que consiste num domínio de ligação anti-CD19, domínio de ligação antiantígeno de maturação de célula B (BCMA), domínio de ligação antimesotelina (MSLN), domínio de ligação anti-IL13Rα2, domínio de ligação anti-MUC16, domínio de ligação anti-CD22, domínio de ligação anti-PD-1, domínio de ligação anti-BAFF ou receptor BAFF, e domínio de ligação anti-ROR-1. Em alguns casos, o ácido nucleico é selecionado do grupo que consiste num DNA e um RNA. Em alguns casos, o ácido nucleico é um mRNA. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende um análogo de ácido nucleico, em que o análogo de ácido nucleico não está numa sequência de codificação do ácido nucleico recombinante. Em alguns casos, o análogo nucleico é selecionado a partir do grupo que consiste em 2’-O-metila, 2’-O-metoxietila (2’-O-MOE), 2’-O-aminopropila, 2’-desóxi, T-desoxi-2’-fluoro, 2’-O-aminopropila (2’-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetila (2’-O-DMAOE), 2’-O-dimetilaminopropila (2’-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietila (2’-O-DMAEOE), 2’-O-N-metilacetamido (2’-O-NMA) modificado, um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido etileno nucleico (ENA), um ácido nucleico de peptídeo (PNA), um ácido 1’,5’- anidro-hexitol nucleico (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo tiolfosfonato, e um 2’-fluoro N3-P5’-fosforamidita. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência de iniciação. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência promotora. Em alguns casos, o ácido

nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica uma cauda poli(A). Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência 3'UTR. Em alguns casos, o ácido nucleico é um ácido nucleico isolado ou um ácido nucleico de ocorrência não natural. Em alguns casos, o ácido nucleico é um ácido nucleico transcrito *in vitro*. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR alfa. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR beta. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR alfa e uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR beta.

[012] São divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os vetores que compreendem o ácido nucleico recombinante divulgado no presente documento. Em alguns casos, o vetor é selecionado do grupo que consiste num DNA, num RNA, num plasmídeo, num vetor de lentivírus, vetor adenoviral, um vetor viral adenoassociado (AAV), um vetor viral de sarcoma de Rous (RSV), ou um vetor de retrovírus. Em alguns casos, o vetor é um vetor AAV6. Em alguns casos, o vetor compreende adicionalmente um promotor. Em alguns casos, o vetor é um vetor transcrito *in vitro*.

[013] É divulgada no presente documento, em algumas modalidades, a célula T modificada que compreende o ácido nucleico recombinante divulgado acima, ou o vetor divulgado acima; em que a célula T modificada compreende uma ruptura funcional de um TCR endógeno. São adicionalmente divulgadas no presente documento, em algumas modalidades, as células T modificadas que compreendem a sequência que codifica a TFP do ácido nucleico divulgado acima ou uma TFP codificada pela sequência do ácido nucleico divulgado acima que codifica a TFP, em que a célula T modificada compreende uma ruptura funcional de um TCR endógeno. Também é divulgada no presente documento a célula T

alogênica modificada que compreende a sequência que codifica a TFP divulgada acima ou uma TFP codificada pela sequência do ácido nucleico divulgado acima que codifica a TFP. Em alguns casos, a célula T compreende adicionalmente uma sequência heteróloga que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta ou um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta. Em alguns casos, o TCR endógeno que é funcionalmente interrompido é uma cadeia de TCR alfa endógena, uma cadeia de TCR beta endógena, ou uma cadeia de TCR alfa endógena e uma cadeia de TCR beta endógena. Em alguns casos, o TCR endógeno que é funcionalmente interrompido tem ligação reduzida ao complexo de MHC-peptídeo em comparação com aquela de uma célula T de controle não modificada. Em alguns casos, a ruptura funcional é uma ruptura de um gene que codifica o TCR endógeno. Em alguns casos, a ruptura de um gene que codifica o TCR endógeno é uma remoção de uma sequência do gene que codifica o TCR endógeno a partir do genoma de uma célula T. Em alguns casos, a célula T é uma célula T humana. Em alguns casos, a célula T é uma célula T CD8+, uma célula T CD4+, uma célula T virgem, uma célula T tronco de memória, uma célula T de memória central, uma célula T negativa dupla, uma célula T de memória efetora, uma célula T efetora, uma célula ThO, uma célula TcO, uma célula Th1, uma célula Tc1, uma célula Th2, uma célula Tc2, uma célula Th17, uma célula Th22, uma célula T gama delta, uma célula exterminadora natural (NK), uma célula T exterminadora natural (NKT), uma célula-tronco hematopoiética, ou uma célula-tronco pluripotente. Em alguns casos, a célula T é uma célula T CD8+ ou CD4+. Em alguns casos, a célula T é uma célula T alogênica. Em alguns casos, as células T modificadas compreendem adicionalmente um ácido nucleico que codifica uma molécula inibitória que compreende um primeiro polipeptídeo que compreende pelo menos uma porção de uma molécula inibitória, associada a um segundo polipeptídeo que compreende um sinal positivo de um domínio de sinalização intracelular. Em alguns casos, a molécula inibitória compreende o

primeiro polipeptídeo que compreende pelo menos uma porção de PD1 e o segundo polipeptídeo que compreende um domínio coestimulatório e domínio de sinalização primário.

[014] São divulgadas no presente documento, em algumas modalidades, as composições farmacêuticas que compreendem: (a) as células T modificadas da divulgação; e (b) um carreador farmaceuticamente aceitável.

[015] É divulgado no presente documento, em algumas modalidades, o método para produzir a célula T modificada da divulgação, em que o método compreende (a) interromper um gene de TCR endógeno que codifica uma cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, ou uma cadeia de TCR alfa e uma cadeia de TCR beta; produzindo, assim, uma célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno; e (b) transduzir a célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno com o ácido nucleico recombinante, ou o vetor divulgado no presente documento. Em alguns casos, a ruptura compreende transduzir a célula T com uma proteína de nuclease ou uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma proteína de nuclease que alveja o gene endógeno que codifica uma cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, ou uma cadeia de TCR alfa e uma cadeia de TCR beta. É adicionalmente divulgado no presente documento, em algumas modalidades, o método para produzir a célula T modificada da divulgação, o método que compreende transduzir a célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno com o ácido nucleico recombinante, ou o vetor divulgado no presente documento. Em alguns casos, a célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno é uma célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno que codifica uma cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, ou uma cadeia de TCR alfa e uma cadeia de TCR beta. Em alguns casos, a célula T é uma célula T humana. Em alguns casos, a célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno tem ligação reduzida ao complexo de MHC-peptídeo em comparação com àquela de uma célula T de controle não modificada. Em alguns

casos, a nuclease é uma meganuclease, uma nuclease de dedo de zinco (ZFN), uma nuclease efetora semelhante a ativador de transcrição (TALEN), uma CRISPR/Cas nuclease, ou uma megaTAL nuclease. Em alguns casos, a sequência compreendida pelo ácido nucleico recombinante ou pelo vetor é inserida no gene de subunidade de TCR endógeno no sítio de clivagem, e em que a inserção da sequência no gene de subunidade de TCR endógeno interrompe funcionalmente a subunidade de TCR endógeno. Em alguns casos, a nuclease é uma meganuclease. Em alguns casos, a meganuclease compreende uma primeira subunidade e uma segunda subunidade, em que a primeira subunidade se liga a um primeiro meio-sítio de reconhecimento da sequência de reconhecimento, e em que a segunda subunidade se liga a um segundo meio-sítio de reconhecimento da sequência de reconhecimento. Em alguns casos, a meganuclease é uma meganuclease de cadeia única que compreende um ligante, em que o ligante une de modo covalente a primeira subunidade e a segunda subunidade.

[016] É divulgado no presente documento, em algumas modalidades, o método para tratar câncer num sujeito que precisa do mesmo, em que o método compreende administrar ao sujeito uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição farmacêutica divulgada no presente documento. Também é divulgado no presente documento, em algumas modalidades, o método para tratar câncer num sujeito que precisa do mesmo, em que o método compreende administrar ao sujeito uma composição farmacêutica que compreende (a) uma célula T modificada produzida de acordo com os métodos divulgados no presente documento; e (b) um carreador farmaceuticamente aceitável. Em alguns casos, a célula T modificada é uma célula T alogênica. Em alguns casos, menos citocinas são liberadas no sujeito em comparação com um sujeito administrado com uma quantidade eficaz de uma célula T de controle não modificada. Em alguns casos, menos citocinas são liberadas no sujeito em comparação com um sujeito administrado com uma quantidade eficaz de uma célula T modificada que compreende o ácido nucleico recombinante divulgado no presente documento, ou o vetor divulgado no presente

documento. Em alguns casos, o método compreende administrar a composição farmacêutica em combinação com um agente que aumenta a eficácia da composição farmacêutica. Em alguns casos, o método compreende administrar a composição farmacêutica em combinação com um agente que melhora um ou mais efeitos colaterais associados à composição farmacêutica. Em alguns casos, o câncer é um câncer sólido, um linfoma ou uma leucemia. Em alguns casos, o câncer é selecionado do grupo que consiste em carcinoma de célula renal, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer cervical, câncer de cérebro, câncer de fígado, câncer pancreático, câncer de rim e estômago.

[017] São divulgados no presente documento, em algumas modalidades, o ácido nucleico recombinante, o vetor, a célula T modificada, ou a composição farmacêutica divulgada no presente documento, para uso como um medicamento ou na preparação de um medicamento.

INCORPORAÇÃO A TÍTULO DE REFERÊNCIA

[018] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados neste relatório descritivo são incorporados ao presente documento a título de referência, até o mesmo ponto, como se cada publicação individual, patente ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado como incorporado a título de referência.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[019] A Figura 1 é um alinhamento de sequência entre TRBC1 e TRBC2, os crRNAs selecionados são representados por setas sobre a sequência TRBC1.

[020] As Figuras 2A a B representam gráficos exemplificativos que mostram a expressão de superfície de CD3 (SK7) vs TCRαβ (IP26) em células editadas por TRA (Figura 2A) e editadas por TRB (Figura 2B). As células Jurkat do tipo selvagem foram editadas nos genes TRAC ou TRBC para romper a expressão de superfície de TRA ou TRB. As células negativas para CD3 e TCRαβ foram purificadas com o uso de Classificação Celular Ativada Magnética. As portas nos gráficos foram

desenhadas como delineando a população negativa-negativa de CD3 e TCRαβ de células e as porcentagens de células restantes em cada quadrante são mostradas nos cantos.

[021] As Figuras 3A a 3E representam gráficos exemplificativos que mostram a expressão de superfície de CD3 vs TCRαβ em células de tipo selvagem vs células editadas (interrompidas por TRA/B) antes e após a purificação. Células T de doador 1 de tipo selvagem (Figura 3A) foram editadas nos genes TRAC (Figura 3B ou Figura 3D) ou TRBC (Figura 3C ou Figura 3E) para interromper a expressão de superfície de TRA ou TRB. A Figura 3B e a Figura 3C mostram a situação de marcadores de superfície de CD3 vs TCRαβ diretamente após a edição, enquanto a Figura 3D e a Figura 3E mostram a situação destes marcadores de superfície após sua seleção negativa com o uso de Classificação Celular Ativada Magnética (MACS). As portas nos gráficos foram desenhadas como delineando a população negativa-negativa de CD3 e TCRαβ de células e as porcentagens de células restantes em cada quadrante são mostradas nos cantos.

[022] A Figura 4 representa gráficos exemplificativos que medem a alogenicidade de células T negativas de TCR observando-se suas taxas de proliferação. As células T negativas de TCR foram permanentemente marcados com corante CSFE que divide pela metade sua concentração com divisão celular. Picos completamente cinzas ao longo do eixo geométrico X mostram o sinal de CSFE em células não identificadas como um controle negativo. As linhas cinzas mostram a quantidade de CSFE em células após 24 horas sem qualquer estímulo enquanto as linhas pretas indicam as quantidades de CSFE após 5 dias de cocultura (com estímulo). O eixo geométrico Y indica a porcentagem de células. As células T negativas de TRA são mostradas nos quatro gráficos superiores, enquanto as células T negativas de TRB são mostradas nos quatro gráficos inferiores. A reação alo indica que as células T de TRA KO doador 2 foram misturadas com PBMCs de um Doador de um haplótipo diferente (Doador 1), enquanto a reação auto indica que as células T e PBMCs do mesmo Doador foram

cocultivadas. O controle positivo para estímulo independente de TCR foi indicado no PMA e painéis de ionomicina.

[023] A Figura 5 representa estratégias exemplificativas para gerar células T de TFP alogênica. Os números abaixo correspondem aos desenhos numerados na Figura 5. (1) mostra TCRαβ endógeno numa célula T que interage com MHCI numa célula que apresenta antígeno e um antígeno. (2) mostra a coexpressão de TRBC com TRAC fundida a um ligante de TFP, em células TRA-/- ou TRB-/-. (3) mostra a coexpressão de TRBC de camundongo com TRAC de camundongo fundida a um ligante de TFP, em células TRA-/- ou TRB-/-. (4) mostra a coexpressão de TRBC murinizada com TRAC murinizada fundida a um ligante de TFP, em células TRA-/- ou TRB-/-. (5) mostra um ligante de TFP carreado por uma proteína de TRAC intensificada com forte afinidade por TCRβ em células TRA-/-. (6) mostra uma estratégia em que, a fim de intensificar a interação entre TRAC e TRBC, os domínios constantes de IgG foram fundidos na extremidade C-terminal de cada um dos domínios constantes de TCR. O ligante de TFP é fundido à extremidade C-terminal de domínio constante de IgG em TRA-/- ou TRB-/- células. (7) mostra uma estratégia em que as partes N-terminais de TRAC e TRBC foram substituídas por suas partes homólogas em TCRγ e TCRδ, respectivamente. O ligante de TFP é executado por TRAC e/ou TRBC em células TRA-/- ou TRB-/-.

[024] A Figura 6 representa um esquema exemplificativo que mostra a estratégia de knock-in da sequência autoclivante T2A para possibilitar a geração de células T de TFP alogênica.

[025] A Figura 7 representa gráficos exemplificativos que mostram a expressão de superfície de TCRαβ e CD3ε (humano) ou TCRβ de camundongo, conforme determinado por um ensaio de Luc-Cyto conforme descrito no Exemplo □□

[026] A Figura 8 representa gráficos exemplificativos que mostram a análise de Luc-Cyto de células efetoras T cultivadas com células-alvo tumorais (células Nalm 6 no painel superior, células K562 no painel inferior) em razões de 3 para 1,

1 para 1, ou 1 para 3. As células alvo (CD19 positivas) são mostradas no painel esquerdo. Os eixos geométricos x representam a porcentagem de lise de célula de tumor.

[027] As Figuras 9A a 9C representam gráficos exemplificativos que mostram a expressão de superfície de CD3 vs TCRαβ em células do tipo selvagem (Figura 9A), células TRB KO sem transdução (Figura 9B), TRB KO células com transdução de TFPs de comprimento completo (FL) de TCRβ (Figura 9C), As portas nos gráficos foram desenhadas para delinear população negativa-negativa de CD3 e TCRαβ de células e as porcentagens de células restantes em cada quadrante são mostradas nos cantos.

[028] As Figuras 10A a 10B representam gráficos exemplificativos que mostram a expressão de superfície de CD3 vs TCRαβ em células de knockout de TRB transduzidas com um gene de TRBC humana (Figura 10A) e com um gene TRAC-T2A-TRBC murino (Figura 10B). As portas nos gráficos foram desenhadas como delineando a população negativa-negativa de CD3 e TCRαβ de células e as porcentagens de células restantes em cada quadrante são mostradas nos cantos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[029] São divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os ácidos nucleicos recombinantes que compreendem (a) uma sequência que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) que compreende (i) uma subunidade de TCR que compreende (1) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (2) um domínio transmembranar, e (3) um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa, TCR beta, TCR gama, ou TCR delta, e (ii) um anticorpo humano ou humanizado que compreende um domínio de ligação ao antígeno; e (b) uma sequência que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta ou um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta; em que a subunidade

de TCR e o anticorpo são operacionalmente ligados, e em que a TFP incorpora funcionalmente num complexo de TCR quando expressada numa célula T.

[030] São divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os ácidos nucleicos recombinantes que compreendem (a) uma sequência que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) que compreende (i) uma subunidade de TCR que compreende (1) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (2) um domínio transmembranar, e (3) um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta, e (ii) um ligante de ligação ou um fragmento do mesmo que é capaz de se ligar a um anticorpo ou fragmento do mesmo; e (b) uma sequência que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta ou um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta; em que a subunidade de TCR e o ligante de ligação ou fragmento do mesmo são operacionalmente ligados, e em que a TFP incorpora funcionalmente a um complexo de TCR quando expressada numa célula T.

[031] São revelados no presente documento, em algumas modalidades, os ácidos nucleicos recombinantes que compreendem (a) uma sequência que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) que compreende (i) uma subunidade de TCR que compreende (1) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (2) um domínio transmembranar, e (3) um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta, e (ii) um domínio de antígeno que compreende um ligante ou um fragmento do mesmo que se liga a um receptor ou polipeptídeo expresso numa superfície de uma célula; e (b) uma sequência que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta ou um domínio constante de TCR alfa e um domínio

constante de TCR beta; em que a subunidade de TCR e o domínio de antígeno são operacionalmente ligados, e em que o TFP se incorpora funcionalmente a um complexo de TCR quando expresso numa célula T.

[032] São divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os vetores que compreendem o ácido nucleico recombinante divulgado no presente documento.

[033] São divulgadas no presente documento, em algumas modalidades, as células T modificadas que compreende o ácido nucleico recombinante divulgado no presente documento, ou os vetores divulgados no presente documento; em que a célula T modificada compreende uma ruptura funcional de um TCR endógeno.

[034] São divulgadas no presente documento, em algumas modalidades, as células T modificadas que compreendem a sequência que codifica a TFP do ácido nucleico divulgado no presente documento ou uma TFP codificada pela sequência do ácido nucleico divulgado no presente documento, em que a célula T modificada compreende uma ruptura funcional de um TCR endógeno.

[035] São divulgadas no presente documento, em algumas modalidades, as células T alogênicas modificadas que compreendem a sequência que codifica a TFP divulgada no presente documento ou uma TFP codificada pela sequência do ácido nucleico divulgado no presente documento.

[036] São divulgadas no presente documento, em algumas modalidades, as composições farmacêuticas que compreendem: (a) as células T modificadas da divulgação; e (b) um carreador farmaceuticamente aceitável.

[037] São divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os métodos para produzir a célula T modificada da divulgação, em que o método compreende (a) interromper um gene de TCR endógeno que codifica uma cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, ou uma cadeia de TCR alfa e uma cadeia de TCR beta; produzindo, assim, uma célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno; e (b) transduzir a célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno com o ácido nucleico recombinante da

divulgação, ou os vetores divulgados no presente documento.

[038] São divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os métodos para produzir a célula T modificada da divulgação, o método que compreende transduzir a célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno com o ácido nucleico recombinante divulgado no presente documento, ou os vetores divulgados no presente documento.

[039] São divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os métodos para tratar câncer num sujeito que precisa do mesmo, em que o método compreende administrar ao sujeito uma quantidade terapeuticamente eficaz das composições farmacêuticas divulgadas no presente documento.

[040] São divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os métodos para tratar câncer num sujeito que precisa do mesmo, em que o método compreende administrar ao sujeito uma composição farmacêutica que compreende (a) uma célula T modificada produzida de acordo com os métodos divulgados no presente documento; e (b) um carreador farmaceuticamente aceitável.

Terminologia determinada

[041] A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo significado que o comumente entendido por um indivíduo de habilidade comum na técnica à qual a invenção pertence.

[042] Os termos “um” e “uma” se referem a um ou mais que um (isto é, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, “um elemento” significa um elemento ou mais que um elemento.

[043] Conforme usado no presente documento, “cerca de” pode significar mais ou menos do que 1 ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25,30, ou mais que 30 por cento, dependendo da situação e conhecido ou passível de conhecimento por um indivíduo versado na técnica.

[044] Conforme usado no presente documento, a especificação, “sujeito” ou “sujeitos” ou “indivíduos” pode incluir, mas sem limitação, mamíferos, como seres

humanos ou mamíferos não humanos, *por exemplo*, animais domesticados, agrícolas ou selvagens, assim como pássaros, e animais aquáticos. “Pacientes” são sujeitos que sofrem de ou têm risco de desenvolver uma doença, distúrbio ou afecção ou que necessitam de outro modo das composições e métodos fornecidos no presente documento.

[045] Conforme usado no presente documento, “tratar” ou “tratamento” se refere a quaisquer indícios de sucesso no tratamento ou amenização da doença ou afecção. Tratamento pode incluir, por exemplo, reduzir, atrasar ou amenizar a severidade de um ou mais sintomas da doença ou afecção, ou pode incluir reduzir a frequência com a qual os sintomas de uma doença, defeito, distúrbio, ou afecção adversa, e semelhantes, são experimentados por um paciente. Conforme usado no presente documento, “tratar ou prevenir” é, algumas vezes, usado no presente documento para se referir a um método que resulta em algum nível de tratamento ou amenização da doença ou afecção, e contempla uma faixa de resultados direcionados para este fim, incluindo, mas sem restrição, a prevenção da afecção inteira.

[046] Conforme usado no presente documento, “prevenir” se refere à prevenção da doença ou afecção, *por exemplo*, formação de tumor, no paciente. Por exemplo, se um indivíduo com risco de desenvolver um tumor ou outra forma de câncer for tratado com os métodos da presente divulgação e não desenvolve posteriormente o tumor ou outra forma de câncer, então, a doença foi impedida, pelo menos por um período de tempo, neste indivíduo.

[047] Conforme usado no presente documento, a “quantidade terapeuticamente eficaz” é a quantidade de uma composição ou um componente ativo do mesmo suficiente para fornecer um efeito benéfico ou para reduzir de outro modo um evento não benéfico prejudicial ao indivíduo ao qual a composição é administrada. Por “dose terapeuticamente eficaz”, no presente documento, entende-se uma dose que produz um ou mais efeitos desejáveis ou desejados (*por exemplo*, benéficos) para os quais é administrada, em que tal administração ocorre

uma ou mais vezes por um dado período de tempo. A dose exata dependerá do propósito do tratamento, e será verificável por um indivíduo versado na arte com o uso de técnicas conhecidas (consultar, *por exemplo* Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (volumes 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); e Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

[048] Conforme usado no presente documento, uma “proteína de fusão de receptor de célula T (TCR)” ou “TFP” inclui um polipeptídeo recombinante derivado dos vários polipeptídeos que compreendem o TCR que tem geralmente capacidade para i) se ligar a um antígeno de superfície em células alvo e ii) interagir com outros componentes de polipeptídeo do complexo de TCR intacto, tipicamente quando colocalizados sobre ou na superfície de uma célula T.

[049] O termo “estímulo” se refere a uma resposta primária induzida pela ligação de um domínio estimulatório ou molécula estimuladora (*por exemplo*, um complexo de TCR/CD3) com seu ligando cognato assim mediando um evento de transdução de sinal, como, mas sem limitação, transdução de sinal por meio do complexo de TCR/CD3. O estímulo pode mediar a expressão alterada de certas moléculas, e/ou reorganização de estruturas citoesqueléticas, e semelhantes.

[050] O termo “molécula estimuladora” ou “domínio estimulatório” se refere a uma molécula ou porção do mesmo expressada por uma célula T que fornece a sequência de sinalização citoplásmica primária (ou sequências de sinalização citoplásmica primária) que regula a ativação primária do complexo de TCR de maneira estimuladora para pelo menos algum aspecto da via de sinalização de célula T. Num aspecto, o sinal primário é iniciado, por exemplo, pela ligação de um complexo TCR/CD3 com uma molécula de MHC carregada com peptídeo, e o que leva à mediação de uma resposta de célula T, incluindo, mas sem limitação, proliferação, ativação, diferenciação e semelhantes. Uma sequência de sinalização citoplásmica primária (também denominada como “domínio de sinalização primário”) que atua numa maneira de estimulatório pode conter um motivo de sinalização que é conhecido como motivo de ativação à base de tirosina de

imunorreceptor ou “ITAM”. Os exemplos de um ITAM que contém sequência de sinalização citoplásmica primária que é destinado a uso particular na invenção inclui, mas sem limitação, aqueles derivados de TCR zeta, FcR gama, FcR beta, CD3 gama, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (também conhecidos como “ICOS”) e CD66d.

[051] O termo “célula que apresenta antígeno” ou “APC” se refere a uma célula de sistema imune, como uma célula de acessório (*por exemplo*, uma célula B, uma célula dendrítica, e semelhantes) que exibe um antígeno estranho complexado com complexos de histocompatbilidade principais (MHCs) em sua superfície. As células T podem reconhecer estes complexos com o uso de seus receptores de célula T (TCRs). APCs processam antígenos e apresentam os mesmos às células T.

[052] “As moléculas complexas de histocompatibilidade principal (MHC) são tipicamente ligadas por TCRs como parte do complexo peptídeo:MHC. A molécula de MHC pode ser uma molécula de MHC classe I ou II. O complexo pode estar na superfície de uma célula que apresenta antígeno, como uma célula dendrítica ou uma célula B, ou qualquer outra célula, incluindo células de câncer, ou pode ser imobilizado por, por exemplo, revestir a uma microesfera ou placa.

[053] O sistema de antígeno de leucócito humano (HLA) é o nome do complexo de gene que codifica o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) em seres humanos e incluir antígenos de HLA classe I (A, B & C) e antígenos de HLA classe II (DP, DQ, & DR). Os alelos A, B e C de HLA apresentam peptídeos derivados principalmente de proteínas intracelulares, por exemplo, proteínas expressadas na célula.

[054] Durante o desenvolvimento de célula T *in vivo*, as células T são submetidas a uma etapa de seleção positiva para garantir o reconhecimento de auto MHCs após uma etapa negativa para remover células T que se ligam muito fortemente a MHC que apresenta autoantígenos. Como consequência, certas células T e os TCRs que as mesmas expressam reconhecerão apenas os

peptídeos apresentados por certos tipos de moléculas de MHC - isto é, aquelas codificadas por alelos de HLA particulares. Isto é conhecido como restrição de HLA.

[055] Um alelo de HLA de interesse é HLA-A*0201, o qual é expresso na vasta maioria (>50%) da população caucasiana. Consequentemente, TCRs que se ligam aos peptídeos WT1 apresentados por MHC codificada por HLA-A*0201 (isto é, são restringidas por HLA-A*0201) são vantajosos visto que uma imunoterapia que faz uso de tais TCRs serão adequados para tratar uma grande proporção da população caucasiana.

[056] Outros alelos de HLA-A de interesse são HLA-A*0101, HLA-A*2402, e HLA-A*0301.

[057] Os alelos de HLA-B amplamente expressados de interesse são HLA-B*3501, HLA-B*0702 e HLA-B*3502.

[058] Um “domínio de sinalização intracelular”, conforme o termo é usado no presente documento, se refere a uma porção intracelular de uma molécula. O domínio de sinalização intracelular gera um sinal que promove uma função efetora imunológica da célula que contém TFP, *por exemplo*, uma célula T-T modificada. Exemplos de função efetora imunológica, *por exemplo*, numa célula T-T modificada, incluem atividade citolítica e atividade de célula auxiliar T, incluindo a secreção de citocinas. Numa modalidade, o domínio de sinalização intracelular pode compreender um domínio de sinalização intracelular primária. Os domínios de sinalização intracelular primária exemplificativos incluem aqueles derivados das moléculas responsáveis pelo estímulo primário, ou simulação dependente de antígeno. Numa modalidade, o domínio de sinalização intracelular pode compreender um domínio coestimulatório intracelular. Os domínios de sinalização intracelular coestimuladores incluem aqueles derivados de moléculas responsáveis por sinais coestimuladores, ou estímulo independente de antígeno.

[059] Um domínio de sinalização intracelular primária pode compreender um ITAM (“motivo de ativação à base de tirosina de imunorreceptor”). Os exemplos de ITAM que contêm sequências de sinalização citoplásmica primária incluem, mas

sem limitação, aquelas derivadas de CD3 zeta, FcR gama, FcR beta, CD3 gama, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, e CD66d DAP10 e DAP12.

[060] O termo “molécula coestimuladora” se refere ao parceiro de ligação cognato numa célula T que se liga especificamente a um ligante coestimulatório, assim mediando uma resposta coestimuladora pela célula T, como, mas sem limitação, proliferação. As moléculas coestimuladoras são moléculas de superfície celular diferentes de receptores de antígeno ou seus ligandos que são necessários para uma resposta imunológica eficaz. As moléculas coestimuladoras incluem, mas sem limitação, uma molécula de MHC classe 1, BTLA e um receptor de ligando Toll, assim como OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) e 4-1BB (CD137). Um domínio coestimulatório de sinalização intracelular pode ser a porção intracelular de uma molécula coestimuladora. Uma molécula coestimuladora pode ser representada nas seguintes famílias de proteína: proteínas de receptor de TNF, proteínas de tipo imunoglobulina, receptores de citocina, integrinas, moléculas de ativação linfocítica de sinalização (proteínas SLAM), e receptores de célula NK de ativação. Os exemplos de tais moléculas incluem CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, antígeno-1 associado à função linfocítica (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, e um ligante que se liga especificamente a CD83, e semelhantes. O domínio de sinalização intracelular pode compreender a porção intracelular inteira, ou o domínio de sinalização intracelular nativo inteiro, da molécula da qual é derivado, ou um fragmento funcional do mesmo. O termo “4-1BB” se refere a um membro da superfamília TNFR com uma sequência de aminoácidos fornecida como nº de Acesso GenBank AAA62478.2, ou os resíduos equivalentes de uma espécie não humana, *por exemplo*, camundongo, roedor, macaco, símio e semelhantes; e um “domínio coestimulatório 4-1BB” é definido como resíduos de aminoácido 214 a 255 de nº de acesso GenBank AAA62478.2, ou os resíduos equivalentes de uma espécie não humana, *por exemplo*, camundongo, roedor, macaco, símio e semelhantes.

[061] O termo “anticorpo”, conforme usado no presente documento, se refere a uma proteína, ou sequências de polipeptídeo derivadas de uma molécula de imunoglobulina, que se liga especificamente a um antígeno. Os anticorpos podem ser imunoglobulinas intactas de origem policlonal ou monoclonal, ou fragmentos dos mesmos e podem ser derivados de fontes naturais ou recombinantes.

[062] Os termos “fragmento de anticorpo” se refere a pelo menos uma porção de um anticorpo, ou variantes recombinantes da mesma, que contém o domínio de ligação ao antígeno, isto é, uma região variável de determinação antigênica de um anticorpo intacto, que é suficiente para conferir reconhecimento e ligação específica do fragmento de anticorpo a um alvo, como um antígeno e seu epítopo definido. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas sem limitação, fragmentos Fab, Fab’, $F(ab')_2$, e Fv, fragmentos de anticorpo (sc)Fv (“scFv”) de cadeia única, anticorpos lineares, anticorpos de domínio único, como sdAb (V_L ou V_H), domínios V_{HH} de camelídeos, e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpo.

[063] O termo “scFv” se refere a uma proteína de fusão que compreende pelo menos um fragmento de anticorpo que compreende uma região variável de uma cadeia leve e pelo menos um fragmento de anticorpo que compreende uma região variável de uma cadeia pesada, em que as regiões varáveis de cadeia leve e pesada são ligadas de modo contíguo por meio de um ligante de polipeptídeo flexível curto, e a capacidade para ser expressada como uma cadeia de polipeptídeo única, e em que a scFv retém a especificidade do anticorpo intacto do qual é derivado.

[064] “Região variável de cadeia pesada” ou “V_H” em relação a um anticorpo se refere ao fragmento da cadeia pesada que contém três CDRs interpostas entre estiramentos de flanqueamento conhecidas como regiões de framework, estas regiões de framework são geralmente mais altamente conservadas do que as CDRs e formam um arcabouço para suportar as CDRs. Um domínio “V_HH” de

camelídeo é uma cadeia pesada que compreende um domínio de anticorpo variável único.

[065] A menos que especificado, conforme usado no presente documento, uma scFv pode ter as regiões variáveis V_L e V_H em qualquer ordem, *por exemplo*, em relação às extremidades N-terminais e C-terminais do polipeptídeo, um scFv pode compreender V_L-ligante-V_H ou pode compreender V_H-ligante-V_L.

[066] A porção da composição de TFP da divulgação que compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo pode existir numa variedade de formas em que o domínio de ligação ao antígeno é expresso como parte de uma cadeia de polipeptídeo contíguo incluindo, por exemplo, um fragmento de anticorpo de domínio único (sdAb), um anticorpo de cadeia única (scFv) derivado de um anticorpo murino, humanizado ou humano (Harlow et al., 1999, Em: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.; Harlow et al., 1989, Em: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). Num aspecto, o domínio de ligação ao antígeno de uma composição de TFP da divulgação compreende um fragmento de anticorpo. Num aspecto adicional, a TFP compreende um fragmento de anticorpo que compreende um scFv ou um sdAb.

[067] O termo “anticorpo recombinante” se refere a um anticorpo que é gerado com o uso de tecnologia de DNA recombinante, como, por exemplo, um anticorpo expresso por um bacteriófago ou sistema de expressão de levedura. O termo também deve ser interpretado como significando um anticorpo que foi gerado pela síntese de uma molécula de DNA que codifica o anticorpo e cuja molécula de DNA expressa uma proteína de anticorpo, ou uma sequência de aminoácidos que especifica o anticorpo, em que o DNA ou a sequência de aminoácidos foi obtido com o uso de DNA recombinante ou tecnologia de sequência de aminoácidos que é disponível e bem conhecida na técnica.

[068] O termo “antígeno” ou “Ag” se refere a uma molécula que tem

capacidade para ser ligada especificamente por um anticorpo, ou provoca de outro modo uma resposta imunológica. Esta resposta imunológica pode envolver produção de anticorpo, ou a ativação de células imunologicamente competentes específicas, ou ambas.

[069] O indivíduo versado na técnica entenderá que qualquer macromolécula, incluindo praticamente todas as proteínas ou peptídeos, pode servir como um antígeno. Adicionalmente, os antígenos podem ser derivados de DNA recombinante ou genômico. Um indivíduo versado na técnica entenderá que qualquer DNA, que compreende sequências de nucleotídeo ou uma sequência de nucleotídeo parcial que codifica uma proteína que elicita uma resposta imunológica, portanto, codifica um “antígeno” conforme o termo é usado no presente documento. Adicionalmente, um indivíduo versado na técnica entenderá que um antígeno não precisa ser codificado somente por uma sequência de nucleotídeo de comprimento completo de um gene. É prontamente evidente que a presente divulgação inclui, mas sem limitação, o uso de sequências de nucleotídeo parciais de mais que um gene e que estas sequências de nucleotídeo são dispostas em várias combinações para codificar polipeptídeos que elicitam a resposta imunológica desejável. Ademais, um indivíduo versado na técnica entenderá que um antígeno não precisa ser codificado por um “gene”. É prontamente evidente que um antígeno pode ser gerado de modo sintético ou pode ser derivado de uma amostra biológica, ou pode ser macromolécula além de um polipeptídeo. Tal amostra biológica pode incluir, mas sem limitação, uma amostra de tecido, uma amostra de tumor, uma célula ou um fluido com outros componentes biológicos.

[070] Conforme usado no presente documento, o termo “CD19” se refere ao agrupamento de proteína de diferenciação 19, que é um determinante antigênico detectável em células precursoras de leucemia de célula B, outras células B malignas e a maioria das células da linhagem de célula B normal.

[071] Conforme usado no presente documento, o termo “BCMA” se refere ao antígeno de maturação de célula B também conhecido como membro 17 de

superfamília de receptor fator de necrose tumoral (TNFRSF17) e a proteína de agrupamento de diferenciação 269 (CD269) é uma proteína que, em seres humanos, é codificada pelo gene TNFRSF17. TNFRSF17 é um receptor de superfície celular da superfamília de receptor de TNF que reconhece o fator de ativação de célula B (BAFF) (consultar, *por exemplo*, Laabi et al., EMBO 11 (11): 3897–3904 (1992). Este receptor é expresso em linfócitos B maduros, e pode ser importante para desenvolvimento de célula B e resposta autoimune.

[072] Conforme usado no presente documento, o termo “CD16” (também conhecido como FcγRIII) se refere a um agrupamento de molécula de diferenciação encontrado na superfície de células natural killer, leucócitos polimorfonucleares de neutrófilo, monócitos e macrófagos. CD16 foi identificado como receptores de Fc FcγRIIIa (CD16a) e FcγRIIIb (CD16b), que participam na transdução de sinal. CD16 é uma molécula da superfamília de imunoglobulina (IgSF) envolvida em citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC).

[073] “NKG2D”, conforme usado no presente documento, se refere a uma proteína transmembranar que pertence à família CD94/NKG2 de receptores de tipo lectina de tipo C. Em seres humanos, NKG2D é expressa por células NK, células T γδ e células T CD8+ αβ. NKG2D reconhece proteínas autoinduzidas de famílias MIC e RAET1/ULBP que aparecem na superfície células estressadas, transformadas malignas e infectadas.

[074] Mesotelina (MSLN) se refere a um antígeno de diferenciação de tumor que está normalmente presente nas células mesoteliais que revestem a pleura, peritônio e pericárdio. A mesotelina é superexpressada em diversos tumores humanos, incluindo mesotelioma e adenocarcinoma ovariano e pancreático.

[075] O receptor transmembranar de tirosina-proteína quinase ROR1, também conhecido como receptor relacionado 1 de tirosina quinase neurotrófica (NTRKR1) é um membro da família de receptor órfão de tipo tirosina quinase de receptor (ROR). O mesmo tem uma função na metástase de câncer.

[076] O termo “MUC16”, também conhecido como “mucina 16, associada à

superfície celular” ou “marcador de tumor relacionado a câncer de ovário CA125” é uma mucina conectada à membrana que contém um domínio extracelular em seu terminal amino, um domínio de repetição em tandem grande, e um domínio transmembranar com um domínio citoplásmico curto. Os produtos deste gene foram usados como um marcador para cânceres diferentes, com níveis de expressão mais altos associados a resultados mais insatisfatórios.

[077] O termo “CD22”, também conhecido como lectina 2 do tipo Ig de ligação de ácido siálico, SIGLEC-2, antígeno de superfície celular T leu-14, e receptor de célula B CD22, é uma proteína que media interações célula B/célula B, e é considerado como envolvido na localização de células B em tecidos linfoides, e é associado a doenças, incluindo câncer hematológico refratário e leucemia de célula pilosa. Um anticorpo monoclonal anti-CD22 completamente humano (“M971”) adequado para uso com os métodos divulgados no presente documento é descrito, por exemplo, em Xiao et al., MAbs. Maio a Junho de 2009; 1(3): 297–303.

[078] Os genes “CD79α” e “CD79β” codificam proteínas que compõem o receptor de antígeno de linfócito B, um complexo multimérico que inclui o componente específico de antígeno, imunoglobulina de superfície (Ig). A Ig de superfície se associa não de modo covalente com duas outras proteínas, Ig-alfa e Ig-beta (codificadas por CD79α e seu parálogo CD79β, respectivamente) os quais são necessários para expressão e função do receptor de antígeno de célula B. A ruptura funcional deste complexo pode levar a, por exemplo, leucemias linfocíticas crônicas de célula B humana.

[079] O fator de ativação de célula B, ou “BAFF” é uma citocina que pertence à família de ligante de fator de necrose tumoral (TNF). Esta citocina é um ligante para receptores TNFRSF13B/TACI, TNFRSF17/BCMA, e TNFRSF13C/BAFF-R. Esta citocina é expressa em células de linhagem de célula B, e atua como um ativador de célula B potente. A mesma também demonstrou ter uma função importante na proliferação e diferenciação de células B.

[080] O termo “efeito antitumoral” se refere a um efeito biológico que pode ser manifestado por vários meios, incluindo, mas sem limitação, *por exemplo*, uma diminuição em volume de tumor, uma diminuição no número de células tumorais, uma diminuição no número de metástases, um aumento em expectativa de vida, diminuição em proliferação de célula de tumor, diminuição em sobrevivência de célula de tumor, ou amenização de vários sintomas fisiológicos associados à afecção cancerosa. Um “efeito antitumoral” também pode ser manifestado pela capacidade dos peptídeos, polinucleotídeos, células e anticorpos da presente divulgação na prevenção da ocorrência de tumor no primeiro local.

[081] O termo “autólogo” se refere a qualquer material derivado do mesmo indivíduo ao qual é posteriormente reintroduzido no indivíduo.

[082] O termo “alogeneico” ou, alternativamente, “alogênico”, se refere a qualquer material derivado de um animal diferente da mesma espécie ou paciente diferente como o indivíduo ao qual o material é introduzido. Dois ou mais indivíduos são ditos como alogênicos entre si quando os genes num ou mais loci não são idênticos. Em alguns aspectos, o material alogênico de indivíduos da mesma espécie podem ser suficientemente improváveis de modo genético de interagir de modo antigênico.

[083] O termo “xenogênico” se refere a um enxerto derivado de um animal de uma espécie diferente.

[084] O termo “câncer” se refere a uma doença caracterizada pelo crescimento rápido e não controlado de células aberrantes. As células de câncer podem ser espalhar localmente ou através do fluxo sanguíneo e sistema linfático para outras partes do corpo. Os exemplos de vários cânceres são descritos no presente documento e incluem, mas sem limitação, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pele, câncer pancreático, câncer colorretal, câncer renal, câncer de fígado, câncer de cérebro, linfoma, leucemia, câncer de pulmão e semelhantes.

[085] O termo “codificar” se refere à propriedade inerente de sequências

específicas de nucleotídeos num polinucleotídeo, como um gene, um cDNA, ou um mRNA, para servir como modelos para síntese de outros polímeros e macromoléculas em processos biológicos que têm uma sequência definida de nucleotídeos (*por exemplo*, rRNA, tRNA e mRNA) ou uma sequência definida de aminoácidos e as propriedades biológicas resultantes das mesmas. Deste modo, um gene, cDNA, ou RNA, codifica uma proteína se a transcrição e a tradução de mRNA correspondente àquele gene produz a proteína numa célula ou outro sistema biológico. Tanto o filamento de codificação, uma sequência de nucleotídeo que é idêntica à sequência de mRNA e é usualmente fornecida em listagens de sequência, quanto o filamento de não codificação, usado como o modelo para a transcrição de um gene ou cDNA, podem ser denominados como codificando a proteína ou outro produto deste gene ou cDNA.

[086] A menos que especificado de outro modo, uma “sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de aminoácidos” inclui todas as sequências de nucleotídeo que são versões degeneradas uma da outra e que codificam a mesma sequência de aminoácidos. A expressão sequência de nucleotídeo que codifica uma proteína ou um RNA também pode incluir íntrons ao ponto que a sequência de nucleotídeo que codifica a proteína pode, na mesma versão, conter um ou mais íntrons.

[087] O termo “quantidade eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” são usadas de modo intercambiável no presente documento, e se referem a uma quantidade de um composto, formulação, material, ou composição, conforme descrito no presente documento, eficaz para alcançar um resultado biológico ou terapêutico particular.

[088] O termo “endógeno” se refere a qualquer material de ou produzido dentro de um organismo, célula, tecido ou sistema.

[089] O termo “exógeno” se refere a qualquer material introduzido de ou produzido fora de um organismo, célula, tecido ou sistema.

[090] O termo “expressão” se refere à transcrição e/ou tradução de uma

sequência de nucleotídeo particular acionada por um promotor.

[091] O termo “ruptura funcional” se refere a uma mudança física ou bioquímica a um ácido nucleico (por exemplo, gene, transcrição de RNA, de proteína assim codificada) específico (por exemplo, alvo) que impede sua expressão e/ou comportamento normal na célula. Numa modalidade, uma ruptura funcional se refere a uma modificação do gene por meio de um método de edição de gene. Numa modalidade, uma ruptura funcional impede a expressão de um gene alvo (por exemplo, um gene endógeno).

[092] O termo “vetor de transferência” se refere a uma composição de matéria que compreende um ácido nucleico isolado e que pode ser usada para administrar o ácido nucleico isolado ao interior de uma célula. Vários vetores são conhecidos na técnica incluindo, mas sem limitação, polinucleotídeos lineares, polinucleotídeos associados a compostos iônicos ou anfifílicos, plasmídeos e vírus. Deste modo, o termo “vetor de transferência” inclui um plasmídeo autonomamente replicante ou um vírus. O termo também pode ser interpretado como incluindo adicionalmente compostos não plasmídeos e não virais que facilitam a transferência de ácido nucleico às células, como, por exemplo, um composto de polilisina, lipossomo, e semelhantes. Os exemplos de vetores de transferência viral incluem, mas sem limitação, vetores adenovirais, vetores virais adenoassociados, vetores retrovirais, vetores lentivirais, e semelhantes.

[093] O termo “vetor de expressão” se refere a um vetor que compreende um polinucleotídeo recombinante que compreende sequências de controle de expressão operacionalmente ligadas a uma sequência de nucleotídeo a ser expressa. Um vetor de expressão compreende elementos de atuação cis suficiente para a expressão; outros elementos para expressão podem ser fornecidos pela célula hospedeira ou num sistema de expressão *in vitro*. Os vetores de expressão incluem todos aqueles conhecidos na técnica, incluindo cosmídeos, plasmídeos (*por exemplo*, nus ou contidos em lipossomos) e vírus (*por exemplo*, lentivírus, retrovírus, adenovírus, e vírus adenoassociados) que incorporam o polinucleotídeo

recombinante.

[094] O termo “lentivírus” se refere a um gênero da família *Retroviridae*. Os lentivírus são únicos entre os retrovírus por poderem infectar células não divisíveis; as mesmas podem fornecer uma quantidade significante de informações genéticas ao DNA da célula hospedeira, de modo que sejam um dos métodos mais eficazes de um vetor de administração de gene. HIV, SIV, e FIV são todos exemplos de lentivírus.

[095] O termo “vetor lentiviral” se refere a um vetor derivado de pelo menos uma porção de um genoma de lentivírus, incluindo especialmente um vetor lentiviral autodesativante, conforme fornecido em Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Outros exemplos de vetores de lentivírus que podem ser usados na clínica incluem, mas sem limitação, *por exemplo*, a tecnologia de administração de gene LENTIVECTOR™ de Oxford BioMedica, o sistema de vetor LENTIMAX™ vetor de Lentigen, e semelhantes. Os tipos não clínicos de vetores lentivirais também estão disponíveis e seriam conhecidos por um indivíduo versado na técnica.

[096] O termo “homólogo” ou “identidade” se refere à identidade de sequência de subunidade entre duas moléculas poliméricas, *por exemplo*, entre duas moléculas de ácido nucleico, como, duas moléculas de DNA ou duas moléculas de RNA, ou entre duas moléculas de polipeptídeo. Quando uma posição de subunidade em ambas as duas moléculas é ocupada pela mesma subunidade monomérica; *por exemplo*, se uma posição em cada uma de duas moléculas de DNA é ocupada por adenina, então, as mesmas são homólogas ou idênticas nesta posição. A homologia entre duas sequências é uma função direta do número de posições correspondentes ou homólogas; *por exemplo*, se metade (*por exemplo*, cinco posições num polímero, dez subunidades em comprimento) das posições em duas sequências são homólogas, as duas sequências são 50% homólogas; se 90% das posições (*por exemplo*, 9 de 10), são correspondidas ou homólogas, as duas sequências são 90% homólogas.

[097] As formas “humanizadas” de anticorpos não humanos (*por exemplo*,

murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou fragmentos dos mesmos (como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ ou outras subsequências de ligação ao antígeno de anticorpos) que contém sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Para a maior parte, os anticorpos humanizados e fragmentos de anticorpo dos mesmos são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor ou fragmento de anticorpo) em que os resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do recipiente são substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo doador), como camundongo, rato ou coelho que têm especificidade, afinidade e capacidade desejáveis. Em alguns casos, resíduos de região de framework Fv (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Adicionalmente, um anticorpo/fragmento de anticorpo humanizado pode compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo de recipiente nem nas sequências de framework ou CDR importada. Estas modificações podem refinar adicionalmente e otimizar o desempenho de anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em geral, o anticorpo ou fragmento de anticorpo humanizado do mesmo compreenderá substancialmente todos dentre pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as regiões de CDR correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana e todas ou uma porção significante das regiões FR são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo ou fragmento de anticorpo humanizado também pode compreender pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais, consultar Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

[098] “Humano” ou “completamente humano” se refere a uma imunoglobulina, como um anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que a molécula inteira é de origem humana ou consiste numa sequência de aminoácidos idêntica

a uma forma humana do anticorpo ou imunoglobulina.

[099] O termo “isolado” significa alterado ou removido do estado natural. Por exemplo, um ácido nucleico ou um peptídeo naturalmente presente num animal vivo não está “isolado”, mas o mesmo ácido nucleico ou peptídeo parcialmente ou completamente separado dos materiais coexistentes de seu estado natural é “isolado”. Um ácido nucleico isolado ou proteína podem existir em forma substancialmente purificada, ou podem existir num ambiente não nativo como, por exemplo, uma célula hospedeira.

[0100] No contexto da presente divulgação, as seguintes abreviações para as bases de ácido nucleico de ocorrência comum são usadas. “A” se refere a adenosina, “C” se refere a citosina, “G” se refere a guanosina, “T” se refere a timidina, e “U” se refere a uridina.

[0101] O termo “modificações de sequência conservativas” se refere às modificações de aminoácido que não afetam ou alteram significativamente as características de ligação do anticorpo ou fragmento de anticorpo que contém a sequência de aminoácidos. Tais modificações conservativas incluem substituições de aminoácido, adições e deleções. As modificações podem ser introduzidas num anticorpo ou fragmento de anticorpo da presente divulgação por técnicas padrão conhecidas na arte, como mutagênese sítio dirigida e mutagênese mediada por PCR. As substituições de aminoácido conservativas são as quais o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral similar. As famílias de resíduos de aminoácido que têm cadeias laterais similares foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (*por exemplo*, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (*por exemplo*, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (*por exemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não polares (*por exemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais beta-ramificadas (*por exemplo*, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (*por exemplo*,

tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Deste modo, um ou mais resíduos de aminoácido numa TFP da presente divulgação podem ser substituídos por outros resíduos de aminoácido da mesma família de cadeia lateral e a TFP alterada pode ser testada com o uso dos ensaios funcionais descritos no presente documento.

[0102] O termo “ligado de modo operacional” ou “controle de transcrição” se refere a ligação funcional entre uma sequência reguladora e uma sequência heteróloga de ácido nucleico que resulta na expressão da última. Por exemplo, uma primeira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operacional com uma segunda sequência de ácidos nucleicos quando a primeira sequência de ácidos nucleicos é colocada numa relação funcional com a segunda sequência de ácidos nucleicos. Por exemplo, um promotor é ligado de modo operacional a uma sequência de codificação se o promotor afeta a transcrição ou expressão da sequência de codificação. As sequências de DNA ligadas de modo operacional podem ser contíguas entre si e, *por exemplo*, quando necessário unir duas regiões de codificação de proteína, estão no mesmo quadro de leitura.

[0103] O termo administração “parenteral” de uma composição imunogênica inclui, *por exemplo*, técnicas subcutâneas (s.c.), intravenosas (i.v.), intramusculares (i.m.), ou intraesternais, intratumorais ou de infusão.

[0104] O termo “ácido nucleico” ou “polinucleotídeo” se refere a ácidos desoxirribonucleicos (DNA) ou ácidos ribonucleicos (RNA) e polímeros dos mesmos em forma de fita única ou dupla. A menos que especificamente limitado, o termo abrange ácidos nucleicos que contêm análogos conhecidos de nucleotídeos naturais que têm propriedades de ligação similares como o ácido nucleico de referência e são metabolizados de maneira similar a nucleotídeos de ocorrência natural. A menos que indicado de outro modo, uma sequência de ácidos nucleicos particular também abrange implicitamente variantes modificadas de modo conservativo da mesma (*por exemplo*, substituições de códon degeneradas), alelos, ortólogos, SNPs, e sequências complementares assim como a sequência explicitamente indicada. Especificamente, substituições de códon degeneradas

podem ser alcançadas gerando-se sequências em que a terceira posição de um ou mais códons selecionados (ou todos) é substituída por base misturada e/ou resíduos de deoxi-inosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); e Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

[0105] Os termos “peptídeo,” “polipeptídeo” e “proteína” são usados de modo intercambiável, e se referem a um composto compreendido de resíduos de aminoácido de modo covalente ligados por ligações de peptídeo. Uma proteína ou peptídeo deve conter pelo menos dois aminoácidos, e nenhuma limitação é colocada no número máximo de aminoácidos que pode compreender uma sequência da proteína ou do peptídeo. Os polipeptídeos incluem qualquer peptídeo ou proteína que compreendem dois ou mais aminoácidos unidos um ao outro por ligações de peptídeo. Conforme usado no presente documento, o termo se refere a ambas as cadeias curtas, as quais também são comumente denominadas na técnica como peptídeos, oligopeptídeos e oligômeros, por exemplo, e a cadeias mais longas, as quais são geralmente denominadas na técnica como proteínas, das quais existem muitos tipos. “Polipeptídeos” incluem, por exemplo, fragmentos biologicamente ativos, polipeptídeos substancialmente homólogos, oligopeptídeos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipeptídeos, polipeptídeos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusão, entre outros. Um polipeptídeo inclui um peptídeo natural, um peptídeo recombinante, ou uma combinação dos mesmos.

[0106] O termo “promotor” se refere a uma sequência de DNA reconhecida pela maquinaria de transcrição da célula, ou maquinaria sintética introduzida, necessária para iniciar a transcrição específica de uma sequência de polinucleotídeo.

[0107] O termo “sequência promotora/reguladora” se refere a uma sequência de ácidos nucleicos que é necessária para a expressão de um produto de gene ligado de modo operacional à sequência promotora/reguladora. Em alguns casos,

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

[0108] O termo promotor “constitutivo” se refere a uma sequência de nucleotídeo que, quando ligada de modo operacional com um polinucleotídeo que codifica ou especifica um produto de gene, faz com que o produto de gene seja produzido numa célula sob a maioria ou todas as condições fisiológicas da célula.

[0109] O termo promotor “induzível” se refere a uma sequência de nucleotídeo que, quando ligada de modo operacional com um polinucleotídeo que codifica ou especifica um produto de gene, faz com que o produto de gene seja produzido numa célula substancialmente apenas quando um indutor que corresponde ao promotor está presente na célula.

[0110] O termo promotor “específico de tecido” se refere a uma sequência de nucleotídeo que, quando ligada de modo operacional a um polinucleotídeo codificado ou especificado por um gene, faz com que o produto de gene seja produzido numa célula substancialmente apenas se a célula é uma célula do tipo de tecido correspondente ao promotor.

[0111] Os termos “ligante” e “ligante de polipeptídeo flexível” conforme usado no contexto de um scFv se refere a um ligante de peptídeo que consiste em aminoácidos, como resíduos de glicina e/ou serina usados sozinhos ou em combinação, para ligar regiões de cadeia leve variável e pesada variável entre si. Numa modalidade, o ligante de polipeptídeo flexível é um ligante de Gly/Ser e compreende a sequência de aminoácidos $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_n$, em que n é um número inteiro positivo igual a ou maior do que 1. Por exemplo, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5, n=6, n=7, n=8, n=9 e n=10. Numa modalidade, os ligantes de polipeptídeo flexíveis incluem, mas sem limitação, $(Gly_4Ser)_4$ ou $(Gly_4Ser)_3$. Em outra modalidade, os ligantes incluem múltiplas repetições de (Gly_2Ser), (GlySer) ou

(Gly_3Ser). Também são incluídos no escopo da presente divulgação os ligantes descritos no documento nº WO2012/138475 (incorporado ao presente documento a título de referência). Em alguns casos, a sequência ligante compreende uma sequência ligante longa (LL). Em alguns casos, a sequência ligante longa compreende $(G_4S)_n$, em que n=2 a 4. Em alguns casos, a sequência ligante compreende uma sequência ligante curta (SL). Em alguns casos, a sequência ligante curta compreende $(G_4S)_n$, em que n=1 a 3.

[0112] Conforme usado no presente documento, um cap 5' (também denominado um cap de RNA, um cap de 7-metilguanosina de RNA ou um cap de m7G de RNA) é um nucleotídeo de guanina modificado que foi adicionado à "frente" ou extremidade 5' de um RNA mensageiro eucariótico logo após o início de transcrição. O cap 5' consiste num grupo terminal que é ligado ao primeiro nucleotídeo transcrito. Sua presença é crítica para o reconhecimento pelo ribossomo e proteção de RNases. A adição de cap é acoplada à transcrição, e ocorre de modo cotranscricional, de modo que um influencia o outro. Logo após o começo da transcrição, a extremidade 5' do mRNA sintetizada é ligada por um complexo de sintetização de cap associado à RNA polimerase. Este complexo enzimático catalisa as reações químicas que são necessárias para capeamento de mRNA. A síntese avança como uma reação bioquímica de múltiplas etapas. A porção química de capeamento pode ser modificada para modular a funcionalidade de mRNA, como sua estabilidade ou eficácia de tradução.

[0113] Conforme usado no presente documento, "RNA transcrito *in vitro*" se refere a RNA, preferencialmente mRNA, que foi sintetizado *in vitro*. Em geral, um RNA transcrito *in vitro* é gerado de um vetor de transcrição *in vitro*. O vetor de transcrição *in vitro* compreende um modelo que é usado para gerar o RNA de transcrição *in vitro*.

[0114] Conforme usado no presente documento, um "poli(A)" é uma série de adenosinas ligadas por poliadenilação ao mRNA. Na modalidade preferencial de um construto para expressão transiente, o poliA está entre 50 e 5000,

preferencialmente maior do que 64, mais preferencialmente maior do que 100, com máxima preferência maior do que 300 ou 400. As sequências de poli(A) podem ser modificadas quimicamente ou enzimaticamente para modular a funcionalidade de mRNA, como localização, estabilidade ou eficácia de tradução.

[0115] Conforme usado no presente documento, “poliadenilação” se refere à ligação covalente de uma porção química de poliadenilila, ou sua variante modificada, a uma molécula de RNA mensageiro. Em organismos eucarióticos, a maioria das moléculas de RNA mensageiro (mRNA) são poliadeniladas na extremidade 3’. A cauda poli(A) 3’ é uma sequência longa de nucleotídeos de adenina (frequentemente várias centenas) adicionada ao pré-mRNA através da ação de uma enzima, poliadenilato polimerase. Em eucariotas superiores, a cauda poli(A) é adicionada em transcrições que contêm uma sequência específica, o sinal de poliadenilação. A cauda poli(A) e a proteína ligada ao mesmo auxilia no mRNA de proteção da degradação por exonucleases. A poliadenilação também é importante para terminação de transcrição, exportação do mRNA do núcleo, e tradução. A poliadenilação ocorre no núcleo imediatamente após a transcrição de DNA em RNA, mas também pode adicionalmente ocorrer posteriormente no citoplasma. Após a transcrição ter sido terminada, a cadeia de mRNA é clivada através da ação de um complexo de endonuclease associado à RNA polimerase. O sítio de clivagem é usualmente caracterizado pela presença da sequência-base AAUAAA próxima do sítio de clivagem. Após o mRNA ter sido clivado, os resíduos de adenosina são adicionados à extremidade 3’ livre no sítio de clivagem.

[0116] Conforme usado no presente documento, “transiente” se refere à expressão de um transgene não integrado por um período de horas, dias ou semanas, em que o período de tempo de expressão é menor que o período de tempo para a expressão do gene se integrado ao genoma ou contido num replicon de plasmídeo estável na célula hospedeira.

[0117] O termo “via de transdução de sinal” se refere à relação bioquímica entre uma variedade de moléculas de transdução de sinal que tem uma função na

transmissão de um sinal de uma porção de uma célula a outra porção de uma célula. A expressão “receptor de superfície celular” inclui moléculas e complexos de moléculas com capacidade para receber um sinal e transmitir o sinal através da membrana de uma célula.

[0118] O termo “sujeito” é destinado a incluir organismos vivos nos quais uma resposta imunológica pode ser elicitada (*por exemplo*, mamíferos, seres humanos).

[0119] O termo, uma célula “substancialmente purificada” se refere a uma célula que é essencialmente livre de outros tipos de célula. Uma célula substancialmente purificada também se refere a uma célula que foi separada de outros tipos de célula com os quais é normalmente associada em seu estado de ocorrência natural. Em alguns casos, uma população de células substancialmente purificadas se refere a uma população homogênea de células. Em outros casos, este termo se refere simplesmente à célula que foi separada das células com as quais são naturalmente associadas em seu estado natural. Em alguns aspectos, as células são cultivadas *in vitro*. Em outros aspectos, as células não são cultivadas *in vitro*.

[0120] O termo “terapêutico”, conforme usado no presente documento, significa um tratamento. Um efeito terapêutico é obtido por redução, supressão, remissão ou erradicação de um estado de doença.

[0121] O termo “profilaxia”, conforme usado no presente documento, significa a prevenção de ou tratamento protetor para uma doença ou estado de doença.

[0122] No contexto da presente divulgação, “antígeno de tumor” ou “antígeno de distúrbio hiperproliferativo” ou “antígeno associado a um distúrbio hiperproliferativo” se refere a antígenos que são comuns para distúrbios hiperproliferativos específicos. Em certos aspectos, os antígenos de distúrbio hiperproliferativos da presente divulgação são derivados de cânceres incluindo, mas sem limitação, melanoma primário ou metastático, timoma, linfoma, sarcoma, câncer de pulmão, câncer de fígado, NHL, leucemias, câncer uterino, câncer cervical, câncer de bexiga, câncer de rim e adenocarcinomas, como câncer de

mama, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer pancreático e semelhantes.

[0123] O termo “transfectado” ou “transformado” ou “transduzido” se refere a um processo pelo qual o ácido nucleico exógeno é transferido ou introduzido na célula hospedeira. Uma célula “transfectada” ou “transformada” ou “transduzida” é uma que foi transfectada, transformada ou transduzida com ácido nucleico exógeno. A célula inclui a célula de sujeito primário e sua progênie.

[0124] O termo “se liga especificamente” se refere a um anticorpo, um fragmento de anticorpo ou um ligante específico, que reconhece e liga um parceiro de ligação cognato (*por exemplo*, CD19) presente numa amostra, mas que não necessariamente e substancialmente reconhece ou liga outras moléculas na amostra.

[0125] Conforme usado no presente documento, o termo "meganuclease" se refere a uma endonuclease que liga DNA de fita dupla numa sequência de reconhecimento que é maior do que 12 pares de bases. Preferencialmente, a sequência de reconhecimento para uma meganuclease da presente divulgação tem 22 pares de bases. Uma meganuclease pode ser uma endonuclease que é derivada de I-CreI e pode se referir a uma variante manipulada de I-CreI que foi modificada em relação a I-CreI natural em relação a, por exemplo, especificidade de ligação de DNA, atividade de clivagem de DNA, afinidade de ligação de DNA ou propriedades de dimerização. Os métodos para produzir tais variantes modificadas de I-CreI são conhecidos na técnica (por exemplo, documento nº WO 2007/047859). Uma meganuclease conforme usado no presente documento se liga ao DNA de fita dupla como um heterodímero ou como uma "meganuclease de cadeia única" em que um par de domínios de ligação de DNA é unido a um polipeptídeo único com o uso de um ligante de peptídeo. O termo "endonuclease de migração" é sinônimo com o termo "meganuclease". Meganucleases da presente divulgação são substancialmente não tóxicas quando expressadas em células, particularmente em células T humanas, de modo que células possam ser transfectadas e mantidas a 37°C sem observar efeitos prejudiciais em viabilidade

de célula ou reduções significativas em atividade de clivagem de meganuclease quando medida com o uso dos métodos descritos no presente documento.

[0126] Conforme usado no presente documento, o termo "meganuclease de cadeia única" se refere a um polipeptídeo que compreende um par de subunidades de nuclease unidas por um ligante. Uma meganuclease de cadeia única tem a organização: subunidade N-terminal - Ligante - subunidade C-terminal. As duas subunidades de meganuclease serão geralmente não idênticas em sequência de aminoácidos e reconhecerão as sequências de DNA não idênticas. Deste modo, as meganucleases de cadeia única clivam tipicamente as sequências de reconhecimento pseudopalindômicas ou não palindrômicas. Uma meganuclease de cadeia única pode ser denominada "heterodímero de cadeia única" ou "meganuclease heterodimérica de cadeia única" embora não seja, de fato, dimérica. Para clareza, a menos que especificado de outro modo, o termo "meganuclease" pode se referir a uma meganuclease dimérica ou de cadeia única.

[0127] Conforme usado no presente documento, o termo "TALEN" se refere a uma endonuclease que compreende um domínio de ligação de DNA que compreende 16 a 22 repetições de domínio de TAL domínio fundidas a qualquer porção do domínio de FokI nuclease.

[0128] Conforme usado no presente documento, o termo "TALEN compacto" se refere a uma endonuclease que compreende um domínio de ligação de DNA com 16 a 22 repetições de domínio TAL fundidas em qualquer orientação em qualquer porção cataliticamente ativa de domínio de nuclease da endonuclease de migração I-TevI.

[0129] Conforme usado no presente documento, o termo "CRISPR" se refere a uma endonuclease à base de caspase que compreende uma caspase, como Cas9, e um RNA-guia que direciona a clivagem de DNA da caspase hibridizando-se a um sítio de reconhecimento no DNA genômico.

[0130] Conforme usado no presente documento, o termo "megaTAL" se refere a uma nuclease de cadeia única que compreende um efetor de tipo ativador

de transcrição (TALE) domínio de ligação de DNA com uma endonuclease de migração específica de sequência manipulada.

[0131] Faixas: ao longo desta divulgação, vários aspectos da presente divulgação podem ser apresentados num formato de faixa. Deve ser entendido que a descrição em formato de faixa é meramente para a conveniência e brevidade e não devem ser interpretados como uma limitação inflexível no escopo da presente divulgação. Consequentemente, a descrição de uma faixa deve ser considerada por ter divulgado especificamente todas as subfaixas possíveis, assim como individual valores numéricos nesta faixa. Por exemplo, a descrição de uma faixa, como de 1 a 6, deve ser considerada por ter especificamente subfaixas divulgadas, como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., assim como números individuais nesta faixa, por exemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3, e 6. Como outro exemplo, uma faixa, como 95 a 99% de identidade, inclui algo com 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade, e inclui subfaixas, como 96 a 99%, 96 a 98%, 96 a 97%, 97 a 99%, 97 a 98% e 98 a 99% de identidade. Isto se aplica independentemente da amplitude da faixa.

DESCRIÇÃO

[0132] São fornecidas no presente documento as composições da matéria e métodos para uso para o tratamento de uma doença, como câncer, com o uso de células T modificadas que compreendem uma proteína de fusão (TFP) de receptores de célula T (TCR) e um domínio constante de TCR, em que a célula T modificada também tem uma subunidade de TCR endógeno funcionalmente interrompida. Conforme usado no presente documento, uma “proteína de fusão de receptor de célula T (TCR)” ou “TFP” inclui um polipeptídeo recombinante derivado dos vários polipeptídeos que compreendem o TCR que tem geralmente capacidade para i) se ligar a um antígeno de superfície em células alvo e ii) interagir com outros componentes de polipeptídeo do complexo de TCR intacto, tipicamente quando colocalizados sobre ou na superfície de uma célula T. Conforme fornecido no presente documento, TFPs fornecem benefícios substanciais em comparação com

os receptores de antígeno quimérico. O termo “receptor de antígeno quimérico” ou alternativamente um “CAR” se refere a um polipeptídeo recombinante que compreende um domínio extracelular de ligação ao antígeno na forma de um scFv, um domínio transmembranar, e domínios de sinalização citoplásmica (também denominados no presente documento como “domínios de sinalização intracelular”) que compreendem um domínio de sinalização funcional derivado de uma molécula estimuladora, conforme definido abaixo. Em geral, o domínio de sinalização intracelular central de um CAR é derivado da cadeia zeta CD3 que é normalmente encontrada associada ao complexo de TCR. O domínio de sinalização de CD3 zeta pode ser fundido com um ou mais domínios de sinalização funcional derivados de pelo menos uma estimuladora coestimuladora, como 4-1BB (isto é, CD137), CD27 e/ou CD28.

PROTEÍNAS DE FUSÃO (TFP) DE RECEPTOR DE CÉLULA T (TCR)

[0133] A presente divulgação abrange construtos de DNA recombinantes que codificam TFPs, em que a TFP compreende um fragmento de anticorpo que se liga especificamente a CD19, *por exemplo*, CD19 humano, em que a sequência do fragmento de anticorpo é contígua com e no mesmo quadro de leitura que uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma subunidade de TCR ou porção da mesma. A presente divulgação abrange construtos de DNA recombinantes que codificam TFPs, em que a TFP compreende um fragmento de anticorpo que se liga especificamente a BCMA, *por exemplo*, BCMA humano, em que a sequência do fragmento de anticorpo é contígua com e no mesmo quadro de leitura que uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma subunidade de TCR ou porção da mesma. A presente divulgação abrange construtos de DNA recombinantes que codificam TFPs, em que a TFP compreende um fragmento de anticorpo que se liga especificamente a ROR1, *por exemplo*, ROR1 humano, em que a sequência do fragmento de anticorpo é contígua com e no mesmo quadro de leitura que uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma subunidade de TCR ou porção da mesma. A presente divulgação abrange construtos de DNA recombinantes que

codificam TFPs, em que a TFP compreende um fragmento de anticorpo que se liga especificamente a CD22, *por exemplo*, CD22 humano, em que a sequência do fragmento de anticorpo é contígua com e no mesmo quadro de leitura que uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma subunidade de TCR ou porção da mesma. As TFPs fornecidas no presente documento podem se associar a uma ou mais subunidades de TCR endógenas (ou alternativamente, uma ou mais exógenas, ou uma combinação de endógenas e exógenas) a fim de formar um complexo de TCR funcional.

[0134] Num aspecto, a TFP da presente divulgação compreende um elemento de ligação específico de alvo denominado de outro modo como um domínio de ligação ao antígeno. A escolha de porção química depende do tipo e número de antígeno-alvo que define a superfície de uma célula-alvo. Por exemplo, o domínio de ligação ao antígeno pode ser escolhido para reconhecer um antígeno alvo que atua como um marcador de superfície celular em células-lavo associadas a um estado de doença particular. Deste modo, os exemplos de marcadores de superfície celular que podem atuar como antígenos-alvo para o domínio de ligação ao antígeno numa TFP da presente divulgação incluem aqueles associados a infecções virais, bacterianas e parasíticas; doenças autoimunes; e doenças cancerosas (*por exemplo*, doenças malignas).

[0135] Num aspecto, a resposta de célula T mediada por TFP pode ser direcionada a um antígeno de interesse a título de manipulação de um domínio de ligação ao antígeno na TFP que se liga especificamente a um antígeno desejável.

[0136] Num aspecto, a porção da TFP que compreende o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio de ligação ao antígeno que alveja CD19. Num aspecto, o domínio de ligação ao antígeno alveja CD19 humano. Num aspecto, a porção da TFP que compreende o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio de ligação ao antígeno que alveja BCMA. Num aspecto, o domínio de ligação ao antígeno alveja BCMA humano.

[0137] O domínio de ligação ao antígeno pode ser qualquer domínio que se

liga ao antígeno incluindo, mas sem limitação, um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo recombinante, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, e um fragmento funcional do mesmo, incluindo, mas sem limitação um anticorpo de domínio único, como um domínio variável de cadeia pesada (V_H), um domínio variável de cadeia leve (V_L) e um domínio variável (V_{HH}) de um nanocorpo derivado de camelídeo, e a um arcabouço alternativo conhecido na técnica funcionado como o domínio de ligação ao antígeno, como um domínio de fibronectina recombinante, anticalina, DARPIN e semelhantes. De modo semelhante, um ligante natural ou sintético reconhecendo especificamente e ligando o antígeno-alvo pode ser usado como domínio de ligação ao antígeno para a TFP. Em alguns casos, é benéfico que o domínio de ligação ao antígeno seja derivado da mesma espécie em que a TFP será finalmente usada. Por exemplo, para uso em seres humanos, pode ser benéfico para o domínio de ligação ao antígeno da TFP compreender resíduos humanos ou humanizados para o domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo ou fragmento de anticorpo.

[0138] Deste modo, num aspecto, o domínio de ligação ao antígeno compreende um anticorpo humanizado ou humano ou um fragmento de anticorpo, ou um anticorpo murino ou fragmento de anticorpo. Numa modalidade, o domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA humanizado ou humano compreende uma ou mais (*por exemplo*, todas as três) dentre a região determinante de complementaridade 1 de cadeia leve (LC CDR1), região determinante de complementaridade 2 de cadeia leve (LC CDR2), e região determinante de complementaridade 3 de cadeia leve (LC CDR3) de um domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA humanizado ou humano descrito no presente documento, e/ou uma ou mais (*por exemplo*, todas as três) dentre a região determinante de complementaridade 1 de cadeia pesada (HC CDR1), região determinante de complementaridade 2 de cadeia pesada (HC CDR2), e região determinante de complementaridade 3 de cadeia pesada (HC CDR3) de um domínio de ligação anti-CD19 humanizado ou humano descrito no presente documento, *por exemplo*, um

domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA humanizado ou humano que compreende uma ou mais, *por exemplo*, todas as três, LC CDRs e uma ou mais, *por exemplo*, todas as três, HC CDRs. Numa modalidade, o domínio de ligação anti-CD19 humanizado ou humano compreende uma ou mais (*por exemplo*, todas as três) dentre a região determinante de complementaridade 1 de cadeia pesada (HC CDR1), região determinante de complementaridade 2 de cadeia pesada (HC CDR2), e região determinante de complementaridade 3 de cadeia pesada (HC CDR3) de um domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA humanizado ou humano descrito no presente documento, *por exemplo*, o domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA humanizado ou humano tem duas regiões de cadeia pesada variáveis que compreendem, cada uma, um HC CDR1, um HC CDR2 e um HC CDR3 descritos no presente documento. Numa modalidade, o domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA humanizado ou humano compreende uma região variável de cadeia leve humanizada ou humana descrita no presente documento e/ou uma região variável de cadeia pesada humanizada ou humana descrita no presente documento. Numa modalidade, o domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA humanizado ou humano compreende uma região variável de cadeia pesada humanizada descrita no presente documento, *por exemplo*, pelo menos duas regiões variáveis de cadeia pesada humanizada ou humana descritas no presente documento. Numa modalidade, o domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA é um scFv que compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada de uma sequência de aminoácidos fornecida no presente documento. Numa modalidade, o domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA (*por exemplo*, um scFv) compreende: uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos uma, duas ou três modificações (*por exemplo*, substituições), mas não mais que 30, 20 ou 10 modificações (*por exemplo*, substituições) de uma sequência de aminoácidos de uma região variável de cadeia leve fornecida no presente documento, ou uma sequência com 95 a 99% de identidade com uma sequência de aminoácidos fornecida no presente documento; e/ou uma região

variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos uma, duas ou três modificações (*por exemplo*, substituições), mas não mais que 30, 20 ou 10 modificações (*por exemplo*, substituições) de uma sequência de aminoácidos de uma região variável de cadeia pesada fornecida no presente documento, ou uma sequência com 95 a 99% de identidade com uma sequência de aminoácidos fornecida no presente documento. Numa modalidade, o domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA humanizado ou humano é um scFv, e uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos descrita no presente documento, é ligado a uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos descrita no presente documento, por meio de um ligante, *por exemplo*, um ligante descrito no presente documento. Numa modalidade, o domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA humanizado inclui um ligante $(Gly_4\text{-}Ser)_n$, em que n é 1, 2, 3, 4, 5, ou 6, preferencialmente 3 ou 4. A região variável de cadeia leve e região variável de cadeia pesada de um scFv pode ser, *por exemplo*, em qualquer uma das seguintes orientações: região variável de cadeia leve-ligante-região variável de cadeia pesada ou região variável de cadeia pesada-ligante-região variável de cadeia leve. Em alguns casos, a sequência ligante compreende uma sequência ligante longa (LL). Em alguns casos, a sequência ligante longa compreende $(G_4S)_n$, em que n=2 a 4. Em alguns casos, a sequência ligante compreende uma sequência ligante curta (SL). Em alguns casos, a sequência ligante curta compreende $(G_4S)_n$, em que n=1 a 3.

[0139] Em alguns aspectos, um anticorpo não humano é humanizado, em que sequências ou regiões específicas do anticorpo são modificadas para aumentar a similaridade num anticorpo naturalmente produzido num ser humano ou fragmento do mesmo. Num aspecto, o domínio de ligação ao antígeno é humanizado.

[0140] Um anticorpo humanizado pode ser produzido com o uso de uma variedade de técnicas conhecidas na arte, incluindo, mas sem limitação, enxerto de

CDR (consultar, *por exemplo*, Patente nº EP 239.400; Publicação Internacional nº WO 91/09967; e Patentes nº U.S. 5.225.539, 5.530.101, e 5.585.089, em que cada uma é incorporada ao presente documento em sua totalidade, a título de referência), folheamento ou recomposição de superfície (consultar, *por exemplo*, Patentes nº EP 592.106 e EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814; e Roguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973, em que cada um é incorporado ao presente documento em sua totalidade, a título de referência), embaralhamento de cadeia (consultar, *por exemplo*, Patente nº U.S. 5.565.332, que é incorporada ao presente documento em sua totalidade, a título de referência), e técnicas divulgadas em, *por exemplo*, Publicação de Pedido de Patente nº U.S. US2005/0042664, Publicação de Pedido de Patente nº U.S. US2005/0048617, Patente nº U.S. 6.407.213, Patente nº U.S. 5.766.886, Publicação Internacional nº WO 9317105, Tan et al., J. Immunol., 169:1119-1125 (2002), Caldas et al., Protein Eng., 13(5):353-360 (2000), Morea et al., Methods, 20(3):267-279 (2000), Baca et al., J. Biol. Chem., 272(16):10678-10684 (1997), Roguska et al., Protein Eng., 9(10):895-904 (1996), Couto et al., Cancer Res., 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., Cancer Res., 55(8):1717-1722 (1995), Sandhu J S, Gene, 150(2):409-410 (1994), e Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235(3):959-973 (1994), em que cada um é incorporado ao presente documento em sua totalidade, a título de referência. Frequentemente, os resíduos de framework nas regiões de framework serão substituídos pelo resíduo correspondente do anticorpo doador de CDR para alterar, por exemplo, melhorar, a ligação de antígeno. Estas substituições de framework são identificadas por métodos bem conhecidos na técnica, *por exemplo*, modelando-se as interações da CDR e resíduos de framework para identificar resíduos de framework importantes para ligação de antígeno e comparação de sequência para identificar resíduos de framework não usuais em posições particulares (consultar, *por exemplo*, Queen et al., Patente nº U.S. 5.585.089; e Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323, os quais são incorporados ao presente

documento a título de referência, em suas totalidades.)

[0141] Um anticorpo ou fragmento de anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácido restantes de uma fonte que é não humana. Estes resíduos de aminoácido não humano são frequentemente denominados como resíduos de “importação”, os quais são tipicamente tomados a partir de um domínio variável de "importação". Conforme fornecido no presente documento, os anticorpos humanizados ou fragmentos de anticorpo compreendem um ou mais CDRs de moléculas de imunoglobulina não humana e regiões de framework, em que os resíduos de aminoácido compreendem o framework são derivados completamente ou principalmente de linha germinativa humana. As múltiplas técnicas para a humanização de anticorpos ou fragmentos de anticorpo são bem conhecidas na técnica e podem ser essencialmente realizadas após o método de Winter e cotrabalhadores (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), substituindo-se CDRs de roedor ou sequências de CDR para as sequências correspondentes de um anticorpo humano, isto é, enxerto de CDR (EP 239.400; Publicação PCT nº WO 91/09967; e Patentes nº U.S. 4.816.567; 6.331.415; 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 6.548.640, cujos conteúdos são incorporados ao presente documento a título de referência, em sua totalidade). Em tais anticorpos humanizados e fragmentos de anticorpo, substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não-humana. Os anticorpos humanizados são frequentemente anticorpos humanos em que alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de framework (FR) são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedor. A humanização de anticorpos e fragmentos de anticorpo também pode ser alcançada por folheamento ou recomposição de superfície (documentos nº EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); e Roguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994)) ou embaralhamento de cadeia (Patente

nº U.S. 5.565.332), cujos conteúdos são incorporados ao presente documento a título de referência, em sua totalidade.

[0142] A escolha de domínios variáveis humanos, tanto leves quanto pesados, a serem usados na produção de anticorpos humanizados é destinada a reduzir a antigenicidade. De acordo com o chamado método “mais adequado”, a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é triada contra a biblioteca inteira de sequências de domínio variável humano conhecidas. A sequência humana que é mais próxima daquela do roedor é, então, aceita como o framework humano (FR) para o anticorpo humanizado (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987), cujos conteúdos são incorporados ao presente documento a título de referência ao presente documento, em sua totalidade). Outro método usa um framework particular derivado da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias leves ou pesadas. O mesmo framework pode ser usado para diversos anticorpos humanizados diferentes (consultar, *por exemplo*, Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993), cujos conteúdos são incorporados ao presente documento a título de referência ao presente documento, em sua totalidade). Em algumas modalidades, a região de framework, *por exemplo*, todas as quatro regiões de framework, da região variável de cadeia pesada são derivadas de uma sequência de linha germinativa de V_H4-4-59. Numa modalidade, a região de framework pode compreender, uma, duas, três, quatro ou cinco modificações, *por exemplo*, substituições, *por exemplo*, do aminoácido na sequência murina correspondente. Numa modalidade, a região de framework, *por exemplo*, todas as quatro regiões de framework da região variável de cadeia leve são derivadas de uma sequência de linha germinativa VK3-1.25. Numa modalidade, a região de framework pode compreender, uma, duas, três, quatro ou cinco modificações, *por exemplo*, substituições, *por exemplo*, do aminoácido na sequência murina correspondente.

[0143] Em alguns aspectos, a porção de uma composição de TFP da presente divulgação que compreende um fragmento de anticorpo é humanizada com a retenção de alta afinidade para o antígeno-alvo e outras propriedades biológicas favoráveis. De acordo com um aspecto da presente divulgação, os anticorpos humanizados e fragmentos de anticorpo são preparados por um processo de análise das sequências parentais e vários produtos humanizados conceituais com o uso de modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Os modelos de imunoglobulina tridimensional estão comumente disponíveis e são familiares àqueles versados na técnica. Os programas de computador estão disponíveis, os quais ilustram e exibem estruturas conformacionais tridimensionais de sequências de imunoglobulina candidatas selecionadas. A inspeção destas exibições permite a análise da função provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, *por exemplo*, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata se ligar ao antígeno-alvo. Desta maneira, os resíduos de FR podem ser selecionados e combinados das sequências de recipiente e importadas de modo que a característica de anticorpo ou fragmento de anticorpo desejável, como afinidade aumentada pelo antígeno alvo, seja alcançada. Em geral, os resíduos de CDR são diretamente e mais substancialmente envolvidos na influência de ligação ao antígeno.

[0144] Um anticorpo humanizado ou fragmento de anticorpo pode reter uma especificidade antigênica similar como o anticorpo original, *por exemplo*, na presente divulgação, a capacidade de ligar CD19 humano. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado ou fragmento de anticorpo pode ter afinidade e/ou especificidade melhorada de ligação ao CD19 humano ou BCMA humano.

[0145] Num aspecto, o domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA é caracterizado por recursos ou propriedades funcionais particulares de um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Por exemplo, num aspecto, a porção de uma

composição de TFP da presente divulgação que compreende um domínio de ligação ao antígeno se liga especificamente a CD19 humano ou BCMA humano. Num aspecto, o domínio de ligação ao antígeno tem a mesma ou uma especificidade de ligação similar com o CD19 humano em relação ao FMC63 scFv descrito em Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997). Num aspecto, a presente divulgação se refere a um domínio de ligação ao antígeno que compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que o domínio de ligação de anticorpo se liga especificamente a uma proteína de CD19 ou BCMA ou fragmento da mesma, em que o anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende uma cadeia leve variável e/ou uma cadeia pesada variável que inclui uma sequência de aminoácidos fornecida no presente documento. Em certos aspectos, o scFv está em contiguidade com e no mesmo quadro de leitura que uma sequência de iniciação.

[0146] Num aspecto, o domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA é um fragmento, *por exemplo*, um fragmento variável de cadeia única (scFv). Num aspecto, o domínio de ligação anti-CD19 é um Fv, um Fab, um $(Fab')_2$, ou um anticorpo bifuncional (*por exemplo*, biespecífico) híbrido (*por exemplo*, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). Num aspecto, os anticorpos e fragmentos do mesmo da presente divulgação se ligam a uma proteína de CD19 com afinidade de tipo selvagem ou intensificada.

[0147] Também são fornecidos no presente documento os métodos para obter um domínio de anticorpo de ligação ao antígeno específico para um antígeno-alvo (*por exemplo*, CD19, BCMA ou qualquer antígeno-alvo descrito em outra parte no presente documento para alvos de domínios de ligação de porção química de fusão), em que o método compreende fornecer por meio de adição, deleção, substituição ou inserção de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácidos de um domínio V_H definido no presente documento um domínio V_H que é uma variante de sequência de aminoácidos do domínio V_H, combinando opcionalmente o domínio V_H assim fornecido com um ou mais domínios V_L, e testando o domínio

V_H ou a combinação V_H/V_L ou combinações para identificar um membro de ligação específico ou um domínio de anticorpo de ligação ao antígeno específico para um antígeno alvo de interesse (*por exemplo*, CD19 ou BCMA) e opcionalmente com uma ou mais propriedades desejáveis.

[0148] Em alguns casos, os domínios V_H e scFvs podem ser preparados de acordo com o método conhecido na técnica (consultar, por exemplo, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 e Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). As moléculas de scFv podem ser produzidas ligando-se as regiões V_H e V_L junto com o uso de ligantes de polipeptídeo flexíveis. As moléculas de scFv compreendem um ligante (*por exemplo*, um ligante Ser-Gly) com um comprimento otimizado e/ou composição de aminoácido. O comprimento de ligante pode afetar grandemente como as regiões variáveis de um scFv se dobram e interagem. De fato, se um polipeptídeo ligante curto é empregado (*por exemplo*, entre 5 a 10 aminoácidos) a dobra entre cadeias é impedida. A dobra entre cadeias também é necessária para unir as duas regiões variáveis para formar um sítio de ligação de epítopo funcional. Em alguns casos, a sequência ligante compreende uma sequência ligante longa (LL). Em alguns casos, a sequência ligante longa compreende $(G_4S)_n$, em que n=2 a 4. Em alguns casos, a sequência ligante compreende uma sequência ligante curta (SL). Em alguns casos, o ligante de sequência curta compreende $(G_4S)_n$, em que n=1 a 3. Para exemplos de orientação e tamanho de ligante consultar, *por exemplo*, Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, Publicação de Pedido de Patente nº U.S. 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, e as publicações PCT nº WO2006/020258 e WO2007/024715 são incorporadas ao presente documento a título de referência.

[0149] Um scFv pode compreender um ligante de cerca de 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou mais que 15 resíduos entre suas regiões V_L e V_H. A sequência ligante pode compreender qualquer aminoácido de ocorrência natural. Em algumas modalidades, a sequência ligante compreende aminoácidos glicina e serina. Em outra modalidade, a sequência ligante compreende conjuntos de repetições de

glicina e serina, como $(Gly_4Ser)_n$, em que n é um número inteiro positivo igual a ou maior do que 1. Numa modalidade, o ligante pode ser $(Gly_4Ser)_4$ ou $(Gly_4Ser)_3$. A variação no comprimento de ligante pode reter ou intensificar a atividade, dar origem à eficácia superior em estudos de atividade. Em alguns casos, a sequência ligante compreende uma sequência ligante longa (LL). Em alguns casos, a sequência ligante longa compreende $(G_4S)_n$, em que n=2 a 4. Em alguns casos, a sequência ligante compreende uma sequência ligante curta (SL). Em alguns casos, a sequência ligante curta compreende $(G_4S)_n$, em que n=1 a 3.

ESTABILIDADE E MUTAÇÕES

[0150] A estabilidade de um domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA, *por exemplo*, moléculas de scFv (*por exemplo*, scFv solúvel) pode ser avaliada em referência às propriedades biofísicas (*por exemplo*, estabilidade térmica) de uma molécula de scFv de controle convencional ou a anticorpo de comprimento completo. Numa modalidade, o scFv humanizado ou humano tem uma estabilidade térmica que é maior do que cerca de 0,1, cerca de 0,25, cerca de 0,5, cerca de 0,75, cerca de 1, cerca de 1,25, cerca de 1,5, cerca de 1,75, cerca de 2, cerca de 2,5, cerca de 3, cerca de 3,5, cerca de 4, cerca de 4,5, cerca de 5, cerca de 5,5, cerca de 6, cerca de 6,5, cerca de 7, cerca de 7,5, cerca de 8, cerca de 8,5, cerca de 9, cerca de 9,5, cerca de 10 graus, cerca de 11 graus, cerca de 12 graus, cerca de 13 graus, cerca de 14 graus, ou cerca de 15 graus Celsius do que um scFv parental nos ensaios descritos.

[0151] A estabilidade térmica melhorada do domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA, *por exemplo*, scFv é subsequentemente conferido ao construto de CD19-TFP inteiro, que leva às propriedades terapêuticas melhoradas do construto de TFP anti-CD19 ou anti-BCMA. A estabilidade térmica do domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA, *por exemplo*, scFv pode ser melhorada em pelo menos cerca de 2 °C ou 3 °C, como em comparação com um anticorpo convencional. Numa modalidade, o domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA, *por exemplo*, scFv tem uma estabilidade térmica melhorada de 1 °C em comparação com um anticorpo

convencional. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD19, *por exemplo*, scFv tem uma estabilidade térmica melhorada de 2 °C em comparação com um anticorpo convencional. Em outra modalidade, o scFv tem uma estabilidade térmica melhorada de 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C ou 15 °C em comparação com um anticorpo convencional. As comparações podem ser feitas, por exemplo, entre as moléculas de scFv divulgadas no presente documento e moléculas de scFv ou fragmentos Fab de um anticorpo do qual V_H e V_L de scFv foram derivadas. A estabilidade térmica pode ser medida com o uso de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, numa modalidade, T_M pode ser medida. Os métodos para medir T_M e outros métodos para determinar a estabilidade de proteína são descritos em mais detalhes abaixo.

[0152] As mutações em scFv (que surgem através da humanização ou mutagênese direta do scFv solúvel) alteram a estabilidade do scFv e melhoram a estabilidade geral do scFv e do construto de TFP anti-CD19 ou anti-BCMA. A estabilidade do scFv humanizado é comparada com o scFv murino com o uso de medições, como T_M, desnaturação de temperatura e agregação de temperatura. Numa modalidade, o domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA, *por exemplo*, um scFv, compreende pelo menos uma mutação que surgiu do processo de humanização, de modo que o scFv que sofreu mutação confira estabilidade melhorada ao construto de TFP anti-CD19. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD19, *por exemplo*, scFv compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mutações que surgem do processo de humanização de modo que o scFv que sofreu mutação confira estabilidade melhorada ao construto de CD19-TFP ou BCMA-TFP.

[0153] Num aspecto, o domínio de ligação ao antígeno da TFP compreende uma sequência de aminoácidos que é homóloga a uma sequência de aminoácidos de domínio de ligação ao antígeno descrita no presente documento, e o domínio de ligação ao antígeno retém as propriedades funcionais desejáveis dos fragmentos de anticorpo anti-CD19 ou anti-BCMA descritos no presente documento. Num

aspecto específico, a composição de TFP da presente divulgação compreende um fragmento de anticorpo. Num aspecto adicional, este fragmento de anticorpo compreende um scFv.

[0154] Em vários aspectos, o domínio de ligação ao antígeno da TFP é manipulado modificando-se um ou mais aminoácidos numa ou ambas as regiões variáveis (*por exemplo*, V_H e/ou V_L), por exemplo, numa ou mais regiões de CDR e/ou numa ou mais regiões de framework. Num aspecto específico, a composição de TFP da presente divulgação compreende um fragmento de anticorpo. Num aspecto adicional, este fragmento de anticorpo compreende um scFv.

[0155] Será entendido por indivíduo de habilidade comum na técnica que o anticorpo ou fragmento de anticorpo da presente divulgação pode ser adicionalmente modificado de modo que os mesmos variem na sequência de aminoácidos (*por exemplo*, de tipo selvagem), mas não em atividade desejável. Por exemplo, as substituições de nucleotídeo adicionais que levam às substituições de aminoácido em resíduos de aminoácido “não essenciais” podem ser feitas na proteína. Por exemplo, um resíduo de aminoácido não essencial numa molécula pode ser substituído por outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeia lateral. Em outra modalidade, uma corrente de aminoácidos pode ser substituída com uma corrente estruturalmente similar que difere em ordem e/ou composição de membros de família de cadeia lateral, *por exemplo*, uma substituição conservativa, em que um resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral similar, pode ser feita.

[0156] As famílias de resíduos de aminoácido que têm cadeias laterais similares foram definidas na técnica, incluindo cadeias laterais básicas (*por exemplo*, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (*por exemplo*, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (*por exemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (*por exemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (*por exemplo*, treonina,

valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (*por exemplo*, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).

[0157] A porcentagem de identidade no contexto de dois ou mais ácidos nucleicos ou sequências de polipeptídeo se referem a duas ou mais sequências que são iguais. Duas sequências são “substancialmente idênticas” se duas sequências têm uma porcentagem especificada de resíduos de aminoácido ou nucleotídeos que são iguais (*por exemplo*, 60% de identidade, opcionalmente 70%, 71% , 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade por uma região especificada, ou, quando não especificada, pela sequência inteira), quando em comparação com e alinhada para uma correspondência máxima por um intervalo de comparação, ou região designada, conforme medido com o uso de um dentre os algoritmos de comparação de sequência seguintes ou por alinhamento manual e inspeção visual. Opcionalmente, a identidade existe por uma região que tem pelo menos cerca de 50 nucleotídeos (ou 10 aminoácidos) em comprimento, ou mais preferencialmente por uma região que tem 100 a 500 ou 1000 ou mais nucleotídeos (ou 20, 50, 200 ou mais aminoácidos) em comprimento.

[0158] Para comparação de sequência, tipicamente uma sequência atua como uma sequência de referência, à qual as sequências de teste são comparadas. Quando com o uso de um algoritmo de comparação de sequência, sequências de teste e referência são inseridas num computador, coordenadas de subsequência são projetadas, se necessário, e os parâmetros de programa de algoritmo de sequência são designados. Os parâmetros de programa padrão podem ser usados, ou parâmetros alternativos podem ser designados. O algoritmo de comparação de sequência calcula, então, a porcentagem de identidade de sequência para as sequências de teste em relação à sequência de referência, com base nos parâmetros de programa. Os métodos para alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos na técnica. O alinhamento otimizado de

sequências para comparação pode ser conduzido, *por exemplo*, pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443, pela busca por método de similaridade de Pearson e Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, por implantações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA no Pacote de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), ou por alinhamento manual e inspeção visual (consultar, *por exemplo*, Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology). Dois exemplos de algoritmos que são adequados para determinar a porcentagem de identidade de sequência e a similaridade de sequência são os algoritmos BLAST e BLAST 2.0, os quais são descritos em Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; e Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. O software para realizar análises de BLAST está publicamente disponível por National Center for Biotechnology Information.

[0159] Num aspecto, a presente divulgação contempla modificações da sequência de aminoácidos de anticorpo inicial ou fragmento (*por exemplo*, scFv) que gera moléculas funcionalmente equivalentes. Por exemplo, a V_H ou V_L de um domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA, *por exemplo*, scFv, compreendido na TFP pode ser modificada para reter pelo menos cerca de 70%, 71%. 72%. 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade da região de framework V_H ou V_L inicial do domínio de ligação anti-CD19, *por exemplo*, scFv. A presente divulgação contempla modificações do construto de TFP inteiro, *por exemplo*, modificações numa ou mais sequências de aminoácidos dos vários domínios do construto de TFP a fim de gerar moléculas funcionalmente equivalentes. O construto de TFP pode ser modificado para reter pelo menos cerca de 70%, 71%. 72%. 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99% de identidade do construto de TFP inicial.

DOMÍNIO EXTRACELULAR

[0160] O domínio extracelular pode ser derivado de uma fonte natural ou recombinante. Quando a fonte é natural, o domínio pode ser derivado de qualquer proteína, mas, em particular, uma proteína ligada à membrana ou transmembranar. Num aspecto, o domínio extracelular tem capacidade para se associar ao domínio transmembranar. Um domínio extracelular de uso particular nesta presente divulgação pode incluir pelo menos a região extracelular (ou regiões extracelulares) de, *por exemplo*, a cadeia alfa, beta ou zeta do receptor de célula T, ou CD3 épsilon, CD3 gama, ou CD3 delta, ou, em modalidades alternativas, CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

DOMÍNIO TRANSMEMBRANAR

[0161] Em geral, uma sequência de TFP contém um domínio extracelular e um domínio transmembranar codificado por uma sequência genômica única. Em modalidades alternativas, uma TFP pode ser designada para compreender um domínio transmembranar que é heterólogo ao domínio extracelular da TFP. Um domínio transmembranar pode incluir um ou mais aminoácidos adicionais adjacentes à região transmembranar, *por exemplo*, um ou mais aminoácidos associados à região extracelular da proteína da qual a transmembrana foi derivada (*por exemplo*, pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, ou mais aminoácidos da região extracelular) e/ou um ou mais aminoácidos adicionais associados à região intracelular da proteína da qual a proteína transmembranar é derivada (*por exemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, ou mais aminoácidos da região intracelular). Em alguns casos, o domínio transmembranar pode incluir pelo menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ou mais aminoácidos da região extracelular. Em alguns casos, o domínio transmembranar pode incluir pelo menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ou mais

aminoácidos da região intracelular. Num aspecto, o domínio transmembranar é um associado a um dos outros domínios da TFP usada. Em alguns casos, o domínio transmembranar pode ser selecionado ou modificado por aminoácido substituição para evitar a ligação de tais domínios aos domínios transmembranares das mesmas ou diferentes proteínas de membrana de superfície, *por exemplo*, para minimizar as interações com outros membros do complexo de receptor. Num aspecto, o domínio transmembranar tem capacidade para homodimerização com outra TFP numa superfície celular T de TFP. Num aspecto diferente, a sequência de aminoácidos do domínio transmembranar pode ser modificada ou substituída de modo a minimizar interações com os domínios de ligação do parceiro de ligação nativo presente na mesma TFP.

[0162] O domínio transmembranar pode ser derivado de uma fonte natural ou recombinante. Quando a fonte é natural, o domínio pode ser derivado de qualquer proteína ligada à membrana ou transmembranar. Num aspecto, o domínio transmembranar tem capacidade para sinalizar ao domínio intracelular (ou domínios intracelulares) quando a TFP se ligou a um alvo. Um domínio transmembranar de uso particular nesta presente divulgação pode incluir pelo menos a região transmembranar (ou regiões transmembranares) de, *por exemplo*, a cadeia alfa, beta, gama, delta, ou zeta do receptor de célula T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

[0163] Em alguns casos, o domínio transmembranar pode estar ligado à região extracelular da TFP, *por exemplo*, o domínio de ligação ao antígeno da TFP, por meio de uma articulação, *por exemplo*, uma articulação de uma proteína humana. Por exemplo, numa modalidade, a articulação pode ser uma articulação de imunoglobulina humana (Ig), *por exemplo*, uma articulação de IgG4, ou uma articulação de CD8a.

LIGANTES

[0164] Opcionalmente, um ligante de oligo ou polipeptídeo curto, com entre

2 e 10 aminoácidos em comprimento pode formar a ligação entre o domínio transmembranar e a região citoplásmica da TFP. Em alguns casos, o ligante pode ter pelo menos cerca de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, ou mais em comprimento. Um dupleto de glicina-serina fornece um ligante particularmente adequado. Por exemplo, num aspecto, o ligante compreende a sequência de aminoácidos de GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 3). Em algumas modalidades, o ligante é codificado por uma sequência de nucleotídeo de GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 4).

DOMÍNIO CITOPLÁSMICO

[0165] O domínio citoplásmico da TFP pode incluir um domínio de sinalização intracelular, se a TFP contém polipeptídeos de CD3 gama, delta ou épsilon; subunidades de TCR alfa e TCR geralmente ausentes num domínio de sinalização. Um domínio de sinalização intracelular é geralmente responsável pela ativação de pelo menos uma das funções efetoras normais da célula imunológica na qual a TFP foi introduzida. O termo “função efetora” se refere a uma função especializada de uma célula. A função efetora de uma célula T, por exemplo, pode ser a atividade citolítica ou atividade auxiliar incluindo a secreção de citocinas. Deste modo, o termo “domínio de sinalização intracelular” se refere à porção de uma proteína que transduz a função efetora sinal e direciona a célula para realizar uma função especializada. Embora usualmente o domínio de sinalização intracelular inteiro possa ser empregado, em muitos casos, não é necessário usar a cadeia inteira. Até o ponto em que uma porção truncada do domínio de sinalização intracelular é usada, tal porção truncada pode ser usada no lugar da cadeia intacta enquanto transduz o sinal de função efetora. O termo domínio de sinalização intracelular é, deste modo, destinado a incluir qualquer porção truncada do domínio de sinalização intracelular suficiente para transduzir o sinal de função efetora.

[0166] Os exemplos de domínios de sinalização intracelular para uso na TFP da presente divulgação incluem as sequências citoplásmicas do receptor de célula

T (TCR) e correceptores que atuam em combinação para iniciar a transdução de sinal após o engate de receptor de antígeno, assim como qualquer derivado ou variante destas sequências e qualquer sequência recombinante que tem a mesma capacidade funcional.

[0167] Sabe-se que os sinais gerados através do TCR sozinho são insuficientes para ativação complexa de células T virgens e que um sinal secundário e/ou coestimulatório é necessário. Deste modo, a ativação de célula T virgem pode ser dita como mediada por duas classes distintas de sequências de sinalização citoplásmica: aquelas que iniciam a ativação primária dependente de antígeno através do TCR (domínios de sinalização intracelular primária) e aquelas que atuam de maneira independente de antígeno para fornecer um sinal secundário ou coestimulatório (domínio citoplásmico secundário, *por exemplo*, um domínio coestimulatório).

[0168] Um domínio de sinalização primário regula a ativação primária do complexo de TCR de maneira estimuladora, ou de maneira inibitória. Os domínios de sinalização intracelular primária que atuam de maneira estimuladora podem conter motivos de sinalização que são conhecidos como motivos de ativação à base de tirosina de imunorreceptor (ITAMs).

[0169] Os exemplos de ITAMs que contêm domínios de sinalização intracelular primária que são de uso particular na presente divulgação incluem aqueles de CD3 zeta, FcR gama, FcR beta, CD3 gama, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, e CD66d. Numa modalidade, uma TFP da presente divulgação compreende um domínio de sinalização intracelular, *por exemplo*, um domínio de sinalização primário de CD3-épsilon. Numa modalidade, um domínio de sinalização primário compreende um domínio de ITAM modificado, *por exemplo*, um domínio de ITAM que sofreu mutação que alterou (*por exemplo*, aumentou ou diminuiu) a atividade em comparação com o domínio de ITAM nativo. Numa modalidade, um domínio de sinalização primário compreende um ITAM modificado que contém domínio de sinalização intracelular primária, *por exemplo*, um ITAM

otimizado e/ou truncado que contém domínio de sinalização intracelular primária. Numa modalidade, um domínio de sinalização primário compreende um, dois, três, quatro ou mais motivos de ITAM.

[0170] O domínio de sinalização intracelular da TFP pode compreender o domínio de sinalização de CD3 zeta por si próprio ou pode ser combinado com qualquer outro domínio de sinalização intracelular desejável (ou domínios de sinalização intracelular desejáveis) útil no contexto de uma TFP da presente divulgação. Por exemplo, o domínio de sinalização intracelular da TFP pode compreender uma porção de cadeia de CD3 épsilon e um domínio de sinalização de coestimulatório. O domínio de sinalização coestimulatório se refere a uma porção da TFP que compreende o domínio intracelular de uma molécula coestimuladora. Uma molécula coestimuladora é uma molécula de superfície celular diferente de um receptor de antígeno ou seus ligantes que é necessária para uma resposta eficaz de linfócitos a um antígeno. Os exemplos de tais moléculas incluem CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, antígeno-1 associado à função de linfócito (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, e um ligante que se liga especificamente a CD83, e semelhantes. Por exemplo, o coestímulo de CD27 demonstrou intensificar a expansão, função efetora, e sobrevivência de células T de TFP humana *in vitro* e aumenta a persistência de célula T humana e atividade antitumoral *in vivo* (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706).

[0171] As sequências de sinalização intracelular na porção citoplásmica da TFP da presente divulgação podem ser ligadas entre si numa ordem aleatória ou ordem especificada. Opcionalmente, um short ligante de oligo ou polipeptídeo, por exemplo, entre 2 e 10 aminoácidos (*por exemplo*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 aminoácidos) em comprimento pode formar a ligação entre sequências de sinalização intracelular.

[0172] Numa modalidade, um dupleto de glicina-serina pode ser usado como um ligante adequado. Numa modalidade, um aminoácido único, *por exemplo*, uma

alanina, uma glicina, pode ser usado como um ligante adequado.

[0173] Num aspecto, a célula de expressão de TFP descrita no presente documento pode compreender adicionalmente uma segunda TFP, *por exemplo*, uma segunda TFP que inclui um domínio de ligação ao antígeno diferente, *por exemplo*, ao mesmo alvo (CD19 ou BCMA) ou um alvo diferente (*por exemplo*, CD123). Numa modalidade, quando a célula de expressão de TFP compreende duas ou mais TFPs diferentes, os domínios de ligação ao antígeno das TFPs diferentes podem ser tais que os domínios de ligação ao antígeno não interagem um com o outro. Por exemplo, uma célula que expressa uma primeira e uma segunda TFP pode ter um domínio de ligação ao antígeno da primeira TFP, *por exemplo*, como um fragmento, *por exemplo*, um scFv, que não forma uma associação ao domínio de ligação ao antígeno da segunda TFP, *por exemplo*, o domínio de ligação ao antígeno da segunda TFP é uma V_{HH}.

[0174] Em outro aspecto, a célula de expressão de TFP descrita no presente documento pode expressar adicionalmente outro agente, *por exemplo*, um agente que intensifica a atividade de uma célula T modificada. Por exemplo, numa modalidade, o agente pode ser um agente que inibe uma molécula inibitória. As moléculas inibidoras, *por exemplo*, PD1, podem, em algumas modalidades, diminuir a capacidade de uma célula T modificada para montar uma resposta efetora imunológica. Exemplos de moléculas inibidoras incluem PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 e TGFR beta. Numa modalidade, o agente que inibe uma molécula inibitória compreende um primeiro polipeptídeo, *por exemplo*, uma molécula inibitória, associada a um segundo polipeptídeo que fornece um sinal positivo para a célula, *por exemplo*, um domínio de sinalização intracelular descrito no presente documento. Numa modalidade, o agente compreende um primeiro polipeptídeo, *por exemplo*, de uma molécula inibitória, como PD1, LAG3, CTLA4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4 e TIGIT, ou um fragmento de qualquer um dos mesmos (*por exemplo*, pelo menos uma porção de um domínio extracelular de qualquer um dos mesmos), e um segundo polipeptídeo

que é um domínio de sinalização intracelular descrito no presente documento (*por exemplo*, que compreende um domínio coestimulatório (*por exemplo*, 4-1BB, CD27 ou CD28, *por exemplo*, conforme descrito no presente documento) e/ou a domínio de sinalização primário (*por exemplo*, um domínio de sinalização de CD3 zeta descrito no presente documento). Numa modalidade, o agente compreende um primeiro polipeptídeo de PD1 ou um fragmento do mesmo (*por exemplo*, pelo menos uma porção de um domínio extracelular de PD1), e um segundo polipeptídeo de um domínio de sinalização intracelular descrito no presente documento (*por exemplo*, um domínio de sinalização de CD28 descrito no presente documento e/ou um domínio de sinalização de CD3 zeta descrito no presente documento). PD1 é um membro inibidor da família de CD28 de receptores que também inclui CD28, CTLA-4, ICOS e BTLA. PD-1 é expresso em células B ativadas, células T e células mieloides (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-775). Dois ligandos para PD1, PD-L1 e PD-L2, mostraram regular de modo decrescente a ativação de célula T mediante ligação a PD1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-1034; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-268; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-643). PD-L1 é abundante em cânceres humanos (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-287; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). A supressão imunológica pode ser revertida inibindo-se a interação local de PD1 com PD-L1.

[0175] Numa modalidade, o agente compreende o domínio extracelular (ECD) de uma molécula inibitória, *por exemplo*, Morte Programada 1 (PD1) pode ser fundida a um domínio transmembranar e opcionalmente um domínio de sinalização intracelular, como 41BB e CD3 zeta (também denominada no presente documento como PD1 TFP). Numa modalidade, a PD1 TFP, quando usada em combinações com uma TFP anti-CD19 descrita no presente documento, melhora a persistência da célula T. Numa modalidade, a TFP é uma PD1 TFP que compreende o domínio extracelular de PD 1. Alternativamente, são fornecidas TFPs que contêm um anticorpo ou fragmento de anticorpo como um scFv que se

liga especificamente ao Ligando de Morte Programada 1 (PD-L1) ou Ligando de Morte Programada 2 (PD-L2).

[0176] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma população de células T que expressam TFP, *por exemplo*, células T de TFP. Em algumas modalidades, a população de células T que expressam TFP compreende uma mistura de células que expressam TFPs diferentes. Por exemplo, numa modalidade, a população de células T de TFP pode incluir uma primeira célula que expressa uma TFP que tem um domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA descrito no presente documento, e uma segunda célula que expressa uma TFP que tem um domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA diferente, *por exemplo*, um domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA descrito no presente documento que difere do domínio de ligação anti-CD19 na TFP expressada pela primeira célula. Como outro exemplo, a população de células que expressam TFP pode incluir uma primeira célula que expressa uma TFP que inclui um domínio de ligação anti-CD19 ou anti-BCMA, *por exemplo*, conforme descrito no presente documento, e uma segunda célula que expressa uma TFP que inclui um domínio de ligação ao antígeno a um alvo diferente de CD19 ou BCMA (*por exemplo*, outro antígeno associado a tumor).

[0177] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma população de células em que pelo menos uma célula na população expressa uma TFP que tem um domínio anti-CD19 ou anti-BCMA descrito no presente documento, e uma segunda célula que expressa outro agente, *por exemplo*, um agente que intensifica a atividade de uma célula T modificada. Por exemplo, numa modalidade, o agente pode ser um agente que inibe uma molécula inibitória. As moléculas inibidoras, *por exemplo*, podem, em algumas modalidades, diminuir a capacidade de uma célula T modificada para montar uma resposta efetora imunológica. Exemplos de moléculas inibidoras incluem PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 e TGFR beta. Numa modalidade, o agente que inibe uma molécula inibitória compreende um primeiro polipeptídeo, *por exemplo*,

uma molécula inibitória, associada a um segundo polipeptídeo que fornece um sinal positivo para a célula, *por exemplo*, um domínio de sinalização intracelular descrito no presente documento.

[0178] São divulgados no presente documento os métodos para produzir RNA transcrito *in vitro* que codifica TFPs. A presente divulgação também inclui uma TFP que codifica o construto de RNA que pode ser diretamente transfectado numa célula. Um método para gerar mRNA para uso em transfecção pode envolver transcrição *in vitro* (IVT) de um modelo com iniciadores especialmente projetados, seguidos pela adição de poliA, para produzir um construto que contém uma sequência não traduzida 3' e 5' ("UTR"), um cap 5' e/ou Sítio de Entrada de Ribossomo Interna (IRES), o ácido nucleico a ser expresso, e uma cauda poliA, tipicamente 50 a 2000 bases em comprimento. O RNA então produzido pode transfectar de modo eficaz tipos diferentes de células. Num aspecto, o modelo inclui sequências para a TFP.

[0179] Num aspecto, a TFP anti-CD19 ou anti-BCMA é codificada por uma RNA mensageira (mRNA). Num aspecto, o mRNA que codifica a TFP anti-CD19 ou anti-BCMA é introduzida numa célula T para produção de uma célula T de TFP. Numa modalidade, o TFP de RNA transcrito *in vitro* pode ser introduzido numa célula como uma forma de transfecção transiente. O RNA é produzido por transcrição *in vitro* com o uso de uma reação em cadeia do modelo gerado por reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA de interesse de qualquer fonte pode ser diretamente convertido por PCR num modelo para síntese de mRNA *in vitro* com o uso de iniciadores apropriados e RNA polimerase. A fonte do DNA pode ser, por exemplo, DNA genômico, plasmídeo DNA, DNA de fago, cDNA, sequência de DNA sintético ou qualquer outra fonte apropriada de DNA. O modelo desejável para transcrição *in vitro* é uma TFP da presente divulgação. Numa modalidade, o DNA a ser usado para PCR contém um quadro de leitura aberto. O DNA pode ser de uma sequência de DNA de ocorrência natural do genoma de um organismo. Numa modalidade, o ácido nucleico pode incluir algumas ou todas as regiões não

traduzidas 5’ e/ou 3’ (UTRs). O ácido nucleico pode incluir éxons e íntrons. Numa modalidade, o DNA a ser usado para PCR é uma sequência de ácidos nucleicos humana. Em outra modalidade, o DNA a ser usado para PCR é uma sequência de ácidos nucleicos humano incluindo as UTRs 5’ e 3’. O DNA pode ser alternativamente uma sequência de DNA artificial que não é normalmente expressada num organismo de ocorrência natural. Uma sequência de DNA artificial exemplificativa é uma que contém porções de genes que são ligados juntos para formar um quadro de leitura aberto que codifica uma proteína de fusão. As porções de DNA que são ligadas podem ser de um organismo único ou de mais que um organismo.

[0180] PCR é usada para gerar um modelo para transcrição *in vitro* de mRNA que é usada para transfecção. Os métodos para realizar PCR são bem conhecidos na técnica. Os iniciadores para uso em PCR são projetados para ter regiões que são substancialmente complementares às regiões do DNA a serem usadas como um modelo para a PCR. “Substancialmente complementar” conforme usado no presente documento, se refere a sequências de nucleotídeos em que uma maioria ou todas as bases na sequência de iniciador são complementares, ou uma ou mais bases são não complementares, ou não correspondidas. As sequências substancialmente complementares podem anelar ou hibridizar com o DNA destinado sob condições de anelamento usadas para PCR. Os iniciadores podem ser projetados para serem substancialmente complementares a qualquer porção do modelo de DNA. Por exemplo, os iniciadores podem ser projetados para amplificar a porção de um ácido nucleico que é normalmente transcrita em células (o quadro de leitura aberto), incluindo UTRs 5’ e 3’. Os iniciadores também podem ser projetados para amplificar uma porção de um ácido nucleico que codifica um domínio particular de interesse. Numa modalidade, os iniciadores são projetados para amplificar a região de codificação de um cDNA humano, incluindo todas ou porções das UTRs 5’ e 3’. Os iniciadores úteis para PCR podem ser gerados por métodos sintéticos que são bem conhecidos na técnica. “Iniciadores diretos” são

iniciadores que contêm uma região de nucleotídeos que são substancialmente complementares aos nucleotídeos no modelo de DNA que está a montante da sequência de DNA que será amplificada. “A montante” é usado no presente documento para se referir a uma localização 5, à sequência de DNA a ser amplificada em relação ao filamento de codificação. “Iniciadores reversos” são iniciadores que contêm uma região de nucleotídeos que é substancialmente complementar a um modelo de DNA de fita dupla que está a jusante da sequência de DNA que deve ser amplificada. “A jusante” é usado no presente documento para se referir a uma localização 3’, à sequência de DNA a ser amplificada em relação ao filamento de codificação.

[0181] Qualquer DNA polimerase útil para PCR pode ser usada nos métodos divulgados no presente documento. Os reagentes e polimerase estão comercialmente disponíveis a partir de várias fontes.

[0182] As estruturas químicas com a capacidade para promover estabilidade e/ou eficácia de tradução também podem ser usadas. O RNA tem preferencialmente UTRs 5’ e 3’. Numa modalidade, a UTR 5’ tem entre um e 3000 nucleotídeos em comprimento. O comprimento de sequências de UTR 5' e 3' a serem adicionadas à região de codificação pode ser alterado por métodos diferentes, incluindo, mas sem limitação, projetar iniciadores para PCR que anelam em regiões diferentes das UTRs. Com o uso desta abordagem, o indivíduo de habilidade comum na técnica pode modificar os comprimentos de UTR 5’ e 3’ necessários para alcançar a eficácia de tradução otimizada após a transfecção do RNA transcrito.

[0183] As UTRs 5’ e 3’ podem ser as UTRs 5’ e 3’ endógenas de ocorrência natural para o ácido nucleico de interesse. Alternativamente, as sequências de UTR que são não endógenas ao ácido nucleico de interesse podem ser adicionadas incorporando-se as sequências de UTR nos iniciadores direto e reverso ou por quaisquer outras modificações do modelo. O uso de sequências de UTR que não são endógenas ao ácido nucleico de interesse pode ser útil para modificar a

estabilidade e/ou eficácia de tradução do RNA. Por exemplo, se sabe que elementos ricos em AU nas sequências de UTR 3’ podem diminuir a estabilidade de mRNA. Portanto, UTRs de 3’ podem ser selecionadas ou projetadas para aumentar a estabilidade do RNA transcrito com base nas propriedades de UTRs que são bem conhecidas na técnica.

[0184] Numa modalidade, a UTR de 5’ pode conter a sequência Kozak do ácido nucleico endógeno. Alternativamente, quando uma UTR 5’ que não é endógena ao ácido nucleico de interesse é adicionada por PCR, conforme descrito acima, uma sequência Kozak de consenso pode ser reprojetada adicionando-se a sequência de UTR 5’. As sequências Kozak podem aumentar a eficácia de tradução de algumas transcrições de RNA, mas não parece ser necessário que todos os RNAs possibilitem a tradução eficaz. O necessário para sequências Kozak para muitos mRNAs é conhecido na técnica. Em outras modalidades a UTR 5’ pode ser UTR 5’ de um vírus de RNA cujo genoma de RNA é estável em células. Em outras modalidades, vários análogos de nucleotídeo podem ser usados na UTR 3’ ou 5’ para impedir a degradação de exonuclease do mRNA.

[0185] Para possibilitar a síntese de RNA de um modelo de DNA sem a necessidade por clonagem de gene, um promotor de transcrição deve ser ligado ao modelo de DNA a montante da sequência a ser transcrita. Quando uma sequência que funciona como um promotor para uma RNA polimerase é adicionada à extremidade 5’ do iniciador direto, o promotor de RNA polimerase se torna incorporado ao produto de PCR a montante do quadro de leitura aberto será transcrito. Numa modalidade preferencial, o promotor é um promotor de polimerase T7, conforme descrito em outra parte no presente documento. Outros promotores úteis incluem, mas sem limitação, promotores de RNA polimerase T3 e SP6. As sequências de nucleotídeo para promotores T7, T3 e SP6 são conhecidas na técnica.

[0186] Em algumas modalidades, o mRNA tem tanto um cap na extremidade 5’ quanto uma cauda poli(A) 3’ que determina uma ligação de ribossomo, iniciação

de mRNA de tradução e estabilidade na célula. Num modelo de DNA circular, por exemplo, DNA de plasmídeo, a RNA polimerase produz um produto concatemérico longo que não é adequado para a expressão em células eucarióticas. A transcrição de DNA de plasmídeo linearizada na extremidade da UTR 3' resulta em mRNA dimensionado normal que não é eficaz em transfecção eucariótica até mesmo se for poliadenilada após a transcrição.

[0187] Num modelo de DNA linear, a RNA polimerase T7 de fago pode estender a extremidade 3' da transcrição além da última base do modelo (Schenborn e Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-6236 (1985); Nacheva e Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-1465 (2003).

[0188] O método convencional de integração de estiramentos de poliA/T num modelo de DNA é clonagem molecular. Entretanto, a sequência poliA/T integrada em DNA de plasmídeo pode causar a instabilidade de plasmídeo, que é o porquê modelos de DNA de plasmídeo obtidos de células bacterianas são altamente contaminados com frequência com deleções e outras aberrações. Isto torna os procedimentos de clonagem não apenas trabalhosos e longos, como também frequentemente não confiáveis. Por este motivo um método que permite a construção de modelos de DNA com estiramento de poliA/T 3' sem a clonagem altamente desejável.

[0189] O segmento de poliA/T do modelo de DNA de transcrição pode ser produzido durante a PCR usando-se um iniciador reverso que contém uma cauda poliT, como uma cauda de 100 T (tamanho pode ser 50 a 5000 T), ou após a PCR por qualquer outro método, incluindo, mas sem limitação, ligação de DNA ou recombinação *in vitro* As caudas de poli(A) também fornecem a estabilidade aos RNAs e reduzem sua degradação. Em geral, o comprimento de uma cauda poli(A) se correlaciona positivamente com a estabilidade do RNA transcrito. Numa modalidade, a cauda poli(A) está entre 100 e 5000 adenosinas.

[0190] As caudas de poli(A) de RNAs podem ser estendidas adicionalmente após a transcrição *in vitro* com o uso de uma poli(A) polimerase, como E. coli poliA

polimerase (E-PAP). Numa modalidade, aumentar o comprimento de uma cauda poli(A) de 100 nucleotídeos para entre 300 e 400 nucleotídeos resulta em cerca de um aumento de duas vezes na eficácia de tradução do RNA. Adicionalmente, a ligação de grupos químicos diferentes à extremidade 3' pode aumentar a estabilidade de mRNA. Tal ligação pode conter nucleotídeos modificados/artificiais, aptâmeros e outros compostos. Por exemplo, os análogos de ATP podem ser incorporados à cauda poli(A) com o uso de poli(A) polimerase. Os análogos de ATP podem aumentar adicionalmente a estabilidade do RNA.

[0191] Os caps 5' também podem fornecer a estabilidade a moléculas de RNA. Em algumas modalidades, os RNAs produzidos pelos métodos divulgados no presente documento incluem um cap 5'. O cap 5' é fornecido com o uso de técnicas conhecidas na arte e descritas no presente documento (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-1495 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

[0192] Os RNAs produzidos pelos métodos divulgados no presente documento também podem conter uma sequência de sítio de entrada de ribossomo interno (IRES). A sequência de IRES pode ser qualquer sequência viral, cromossômica ou artificialmente projetada que inicia a ligação de ribossomo independente de cap à mRNA e facilita a iniciação de tradução. Quaisquer solutos adequados para eletroporação de célula, os quais podem conter fatores que facilitam a permeabilidade e viabilidade celulares, como açúcares, peptídeos, lipídios, proteínas, antioxidantes e tensoativos podem ser incluídos.

[0193] O RNA pode ser introduzido em células-alvo com o uso de qualquer um dentre vários métodos diferentes, por exemplo, métodos comercialmente disponíveis que incluem, mas sem limitação, eletroporação (Amaxa Nucleofector®-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Alemanha)), ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) ou o Gene Pulser® II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator® (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), transfecção mediada por lipossomo catiônico com o uso de lipofecção, encapsulação de polímero, transfecção mediada por

peptídeo, ou sistemas de administração de partícula biolístico, como “pistolas de genes” (consultar, por exemplo, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-870 (2001).

Ácido Nucleico Recombinante que Codifica uma TFP e um Domínio Constante de TCR

[0194] São divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os ácidos nucleicos recombinantes que compreendem (a) uma sequência que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) que compreende (i) uma subunidade de TCR que compreende (1) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (2) um domínio transmembranar, e (3) um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta, e (ii) um anticorpo humano ou humanizado que compreende um domínio de ligação ao antígeno; e (b) uma sequência que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta ou um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta; em que a subunidade de TCR e o anticorpo são operacionalmente ligados, e em que a TFP incorpora funcionalmente num complexo de TCR quando expressada numa célula T.

[0195] Em alguns casos, o domínio constante de TCR se incorpora a um complexo de TCR funcional quando expresso numa célula T. Em alguns casos, o domínio constante de TCR se incorpora num mesmo complexo de TCR funcional que o complexo de TCR funcional que incorpora a TFP quando expresso numa célula T. Em alguns casos, a sequência que codifica a TFP e a sequência que codifica o domínio constante de TCR estão contidas numa mesma molécula de ácido nucleico. Em alguns casos, a sequência que codifica a TFP e a sequência que codifica o domínio constante de TCR estão contidas em moléculas de ácido nucleico diferentes.

[0196] Em alguns casos, a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo, o

domínio de antígeno ou o ligante de ligação ou fragmento do mesmo são operacionalmente ligados por uma sequência ligante. Em alguns casos, a sequência ligante compreende (G4S)n, em que n=1 a 4.

[0197] Em alguns casos, o domínio transmembranar é um domínio transmembranar de TCR a partir de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta. Em alguns casos, o domínio intracelular é derivado de apenas CD3 épsilon, apenas CD3 gama, apenas CD3 delta, apenas TCR alfa ou apenas TCR beta.

[0198] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (ii) um domínio transmembranar de TCR, e (iii) um domínio intracelular de TCR, em que pelo menos dois dentre (i), (ii), e (iii) são da mesma subunidade de TCR.

[0199] Em alguns casos, o domínio extracelular de TCR compreende um domínio extracelular ou porção do mesmo de uma proteína selecionada do grupo que consiste numa cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, fragmentos funcionais dos mesmos, e sequências de aminoácidos do mesmo que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações.

[0200] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um domínio transmembranar que compreende um domínio transmembranar de uma proteína selecionada do grupo que consiste numa cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, uma cadeia de TCR zeta, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, fragmentos funcionais dos mesmos, e sequências de aminoácidos dos mesmos que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações.

[0201] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um domínio

intracelular de TCR que compreende um domínio estimulatório de uma proteína selecionada a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta, ou uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos uma modificação na mesma.

[0202] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório de uma proteína selecionada a partir de um domínio de sinalização funcional de 4-1BB e/ou um domínio de sinalização funcional de CD3 zeta, ou uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos uma modificação na mesma.

[0203] Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio coestimulatório. Em alguns casos, o domínio coestimulatório compreende um domínio de sinalização funcional de uma proteína selecionada do grupo que consiste em OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), e 4-1BB (CD137), e sequências de aminoácidos da mesma que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações nas mesmas.

[0204] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um motivo de ativação à base de tirosina de imunorreceptor (ITAM) de uma subunidade de TCR que compreende um ITAM ou porção do mesmo de uma proteína selecionada do grupo que consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama, subunidade de TCR de CD3 delta, cadeia de TCR zeta, cadeia de receptor Fc épsilon 1, cadeia de receptor Fc épsilon 2, cadeia de receptor Fc gama 1, cadeia de receptor Fc gama 2a, cadeia de receptor Fc gama 2b1, cadeia de receptor Fc gama 2b2, cadeia de receptor Fc gama 3a, cadeia de receptor Fc gama 3b, cadeia de receptor Fc beta 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, fragmentos funcionais dos mesmos, e sequências de aminoácidos dos mesmos que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações nas mesmas. Em alguns casos, o ITAM substitui um ITAM de CD3 gama, CD3 delta ou

CD3 épsilon. Em alguns casos, o ITAM é selecionado do grupo que consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama, e subunidade de TCR de CD3 delta e substitui um ITAM diferente selecionado do grupo que consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama e subunidade de TCR de CD3 delta.

[0205] Em alguns casos, a TFP, o domínio constante de TCR alfa, o domínio constante de TCR beta, e qualquer combinação dos mesmos é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno. Em alguns casos, (a) o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa e a TFP funcionalmente se integra a um complexo de TCR que compreende uma subunidade endógena de TCR beta, CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, ou uma combinação dos mesmos; (b) o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR beta e a TFP se integra funcionalmente num complexo de TCR que compreende uma subunidade endógena de TCR alfa, CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, ou uma combinação dos mesmos; ou (c) o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta e a TFP se integra funcionalmente num complexo de TCR que compreende uma subunidade endógena de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, ou uma combinação dos mesmos.

[0206] Em alguns casos, a pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações no mesmo compreendem uma modificação de um aminoácido que medeia a sinalização celular ou uma modificação de um aminoácido que é fosforilado em resposta a um ligante que se liga à TFP.

[0207] Em alguns casos, o anticorpo humano ou humanizado é um fragmento de anticorpo. Em alguns casos, o fragmento de anticorpo é um scFv, um domínio de anticorpo de domínio único, um domínio VH ou um domínio VL. Em alguns casos, o anticorpo humano ou humanizado que compreende um domínio de ligação ao antígeno é selecionado de um grupo que consiste num domínio de

ligação anti-CD19, domínio de ligação antiantígeno de maturação de célula B (BCMA), domínio de ligação antimesotelina (MSLN), domínio de ligação anti-CD22, domínio de ligação anti-PD-1, domínio de ligação anti-BAFF ou receptor BAFF, e domínio de ligação anti-ROR-1.

[0208] Em alguns casos, o ácido nucleico é selecionado do grupo que consiste num DNA e um RNA. Em alguns casos, o ácido nucleico é um mRNA. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende um análogo de ácido nucleico, em que o análogo de ácido nucleico não está numa sequência de codificação do ácido nucleico recombinante. Em alguns casos, o análogo nucleico é selecionado a partir do grupo que consiste em 2’-O-metila, 2’-O-metoxietila (2’-O-MOE), 2’-O-aminopropila, 2’-desóxi, T-desoxi-2’-fluoro, 2’-O-aminopropila (2’-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetila (2’-O-DMAOE), 2’-O-dimetilaminopropila (2’-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietila (2’-O-DMAEOE), 2’-O-N-metilacetamido (2’-O-NMA) modificado, um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido etileno nucleico (ENA), um ácido nucleico de peptídeo (PNA), um ácido 1’,5’- anidro-hexitol nucleico (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo tiolfosfonato, e um 2’-fluoro N3-P5’-fosforamidita.

[0209] Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência de iniciação. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência promotora. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica uma cauda poli(A). Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência 3’UTR. Em alguns casos, o ácido nucleico é um ácido nucleico isolado ou um ácido nucleico de ocorrência não natural. Em alguns casos, o ácido nucleico é um ácido nucleico transcrito in vitro.

[0210] Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR alfa. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR beta. Em alguns

casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR alfa e uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR beta.

[0211] São divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os ácidos nucleicos recombinantes que compreendem (a) uma sequência que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) que compreende (i) uma subunidade de TCR que compreende (1) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (2) um domínio transmembranar, e (3) um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta, e (ii) um ligante de ligação ou um fragmento do mesmo que é capaz de se ligar a um anticorpo ou fragmento do mesmo; e (b) uma sequência que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta ou um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta; em que a subunidade de TCR e o ligante de ligação ou fragmento do mesmo são operacionalmente ligados, e em que a TFP incorpora funcionalmente a um complexo de TCR quando expressada numa célula T. Em alguns casos, o ligante de ligação é capaz de se ligar a um domínio de Fc do anticorpo. Em alguns casos, o ligante de ligação é capaz de se ligar seletivamente a um anticorpo de IgG1. Em alguns casos, o ligante de ligação é capaz de se ligar especificamente a um anticorpo de IgG1. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento do mesmo se liga a um antígeno de superfície celular. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento do mesmo se liga a um antígeno de superfície celular sobre a superfície de uma célula de tumor. Em alguns casos, o ligante de ligação compreende um monômero, um dímero, um trímero, um tetrâmero, um pentâmero, um hexâmero, um heptâmero, um octômero, um nonâmero ou um decâmero. Em alguns casos, o ligante de ligação não compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo. Em alguns casos, o ligante de ligação compreende um polipeptídeo de CD16 ou fragmento do mesmo. Em alguns casos,

o ligante de ligação compreende um polipeptídeo de ligação a CD16. Em alguns casos, o ligante de ligação é humano ou humanizado. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um anticorpo ou fragmento do mesmo capaz de ser ligado pelo ligante de ligação. Em alguns casos, o anticorpo ou fragmento do mesmo é capaz de ser secretado a partir de uma célula.

[0212] Em alguns casos, o domínio constante de TCR se incorpora a um complexo de TCR funcional quando expresso numa célula T. Em alguns casos, o domínio constante de TCR se incorpora num mesmo complexo de TCR funcional que o complexo de TCR funcional que incorpora a TFP quando expresso numa célula T. Em alguns casos, a sequência que codifica a TFP e a sequência que codifica o domínio constante de TCR estão contidas numa mesma molécula de ácido nucleico. Em alguns casos, a sequência que codifica a TFP e a sequência que codifica o domínio constante de TCR estão contidas em moléculas de ácido nucleico diferentes.

[0213] Em alguns casos, a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo, o domínio de antígeno ou o ligante de ligação ou fragmento do mesmo são operacionalmente ligados por uma sequência ligante. Em alguns casos, a sequência ligante compreende $(G_4S)n$, em que n=1 a 4.

[0214] Em alguns casos, o domínio transmembranar é um domínio transmembranar de TCR a partir de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta. Em alguns casos, o domínio intracelular é derivado de apenas CD3 épsilon, apenas CD3 gama, apenas CD3 delta, apenas TCR alfa ou apenas TCR beta.

[0215] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (ii) um domínio transmembranar de TCR, e (iii) um domínio intracelular de TCR, em que pelo menos dois dentre (i), (ii), e (iii) são da mesma subunidade de TCR.

[0216] Em alguns casos, o domínio extracelular de TCR compreende um

domínio extracelular ou porção do mesmo de uma proteína selecionada do grupo que consiste numa cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, fragmentos funcionais dos mesmos, e sequências de aminoácidos do mesmo que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações.

[0217] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um domínio transmembranar que compreende um domínio transmembranar de uma proteína selecionada do grupo que consiste numa cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, uma cadeia de TCR zeta, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, fragmentos funcionais dos mesmos, e sequências de aminoácidos dos mesmos que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações.

[0218] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular de TCR que compreende um domínio estimulatório de uma proteína selecionada a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta, ou uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos uma modificação na mesma.

[0219] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório de uma proteína selecionada a partir de um domínio de sinalização funcional de 4-1BB e/ou um domínio de sinalização funcional de CD3 zeta, ou uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos uma modificação na mesma.

[0220] Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio coestimulatório. Em alguns casos, o domínio coestimulatório compreende um domínio de sinalização funcional de uma proteína selecionada do grupo que consiste em OX40, CD2, CD27, CD28,

CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), e 4-1BB (CD137), e sequências de aminoácidos da mesma que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações nas mesmas.

[0221] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um motivo de ativação à base de tirosina de imunorreceptor (ITAM) de uma subunidade de TCR que compreende um ITAM ou porção do mesmo de uma proteína selecionada do grupo que consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama, subunidade de TCR de CD3 delta, cadeia de TCR zeta, cadeia de receptor Fc épsilon 1, cadeia de receptor Fc épsilon 2, cadeia de receptor Fc gama 1, cadeia de receptor Fc gama 2a, cadeia de receptor Fc gama 2b1, cadeia de receptor Fc gama 2b2, cadeia de receptor Fc gama 3a, cadeia de receptor Fc gama 3b, cadeia de receptor Fc beta 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, fragmentos funcionais dos mesmos, e sequências de aminoácidos dos mesmos que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações nas mesmas. Em alguns casos, o ITAM substitui um ITAM de CD3 gama, CD3 delta ou CD3 épsilon. Em alguns casos, o ITAM é selecionado do grupo que consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama, e subunidade de TCR de CD3 delta e substitui um ITAM diferente selecionado do grupo que consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama e subunidade de TCR de CD3 delta.

[0222] Em alguns casos, a TFP, o domínio constante de TCR alfa, o domínio constante de TCR beta, e qualquer combinação dos mesmos é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno. Em alguns casos, (a) o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa e a TFP funcionalmente se integra a um complexo de TCR que compreende uma subunidade endógena de TCR beta, CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, ou uma combinação dos mesmos; (b) o domínio

constante de TCR é um domínio constante de TCR beta e a TFP se integra funcionalmente num complexo de TCR que compreende uma subunidade endógena de TCR alfa, CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, ou uma combinação dos mesmos; ou (c) o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta e a TFP se integra funcionalmente num complexo de TCR que compreende uma subunidade endógena de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, ou uma combinação dos mesmos.

[0223] Em alguns casos, a pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações no mesmo compreendem uma modificação de um aminoácido que medeia a sinalização celular ou uma modificação de um aminoácido que é fosforilado em resposta a um ligante que se liga à TFP.

[0224] Em alguns casos, o anticorpo humano ou humanizado é um fragmento de anticorpo. Em alguns casos, o fragmento de anticorpo é um scFv, um domínio de anticorpo de domínio único, um domínio VH ou um domínio VL. Em alguns casos, o anticorpo humano ou humanizado que compreende um domínio de ligação ao antígeno é selecionado de um grupo que consiste num domínio de ligação anti-CD19, domínio de ligação antiantígeno de maturação de célula B (BCMA), domínio de ligação antimesotelina (MSLN), domínio de ligação anti-CD22, domínio de ligação anti-PD-1, domínio de ligação anti-BAFF e domínio de ligação anti-ROR-1.

[0225] Em alguns casos, o ácido nucleico é selecionado do grupo que consiste num DNA e um RNA. Em alguns casos, o ácido nucleico é um mRNA. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende um análogo de ácido nucleico, em que o análogo de ácido nucleico não está numa sequência de codificação do ácido nucleico recombinante. Em alguns casos, o análogo nucleico é selecionado a partir do grupo que consiste em 2’-O-metila, 2’-O-metoxietila (2’-O-MOE), 2’-O-aminopropila, 2’-desóxi, T-desoxi-2’-fluoro, 2’-O-aminopropila (2’-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetila (2’-O-DMAOE), 2’-O-dimetilaminopropila (2’-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietila (2’-O-DMAEOE), 2’-O-N-metilacetamido (2’-O-NMA)

modificado, um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido etileno nucleico (ENA), um ácido nucleico de peptídeo (PNA), um ácido 1',5'- anidro-hexitol nucleico (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo tiolfosfonato, e um 2'-fluoro N3-P5'-fosforamidita.

[0226] Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência de iniciação. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência promotora. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica uma cauda poli(A). Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência 3'UTR. Em alguns casos, o ácido nucleico é um ácido nucleico isolado ou um ácido nucleico de ocorrência não natural. Em alguns casos, o ácido nucleico é um ácido nucleico transcrito in vitro.

[0227] Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR alfa. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR beta. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR alfa e uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR beta. Alternativamente, o ácido nucleico recombinante compreende uma sequência que codifica um TCR gama ou TCR delta domínio, por exemplo, um domínio transmembranar.

[0228] São revelados no presente documento, em algumas modalidades, os ácidos nucleicos recombinantes que compreendem (a) uma sequência que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) que compreende (i) uma subunidade de TCR que compreende (1) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (2) um domínio transmembranar, e (3) um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta, e (ii) um domínio de antígeno que compreende um ligante ou um fragmento

do mesmo que se liga a um receptor ou polipeptídeo expresso numa superfície de uma célula; e (b) uma sequência que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta ou um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta; em que a subunidade de TCR e o domínio de antígeno são operacionalmente ligados, e em que o TFP se incorpora funcionalmente a um complexo de TCR quando expresso numa célula T. Em alguns casos, o domínio de antígeno compreende um ligante. Em alguns casos, o ligante se liga ao receptor de uma célula. Em alguns casos, o ligante se liga ao polipeptídeo expresso numa superfície de uma célula. Em alguns casos, o receptor ou polipeptídeo expresso numa superfície de uma célula compreende um polipeptídeo ou receptor de resposta de estresse. Em alguns casos, o receptor ou polipeptídeo expresso numa superfície de uma célula é uma glicoproteína relacionada a MHC classe I. Em alguns casos, a glicoproteína relacionada a MHC classe I é selecionada do grupo que consiste em MICA, MICB, RAET1E, RAET1G, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4 e combinações dos mesmos. Em alguns casos, o domínio de antígeno compreende um monômero, um dímero, um trímero, a tetrâmero, um pentâmero, um hexâmero, um heptâmero, um octômero, um nonâmero ou um decâmero. Em alguns casos, o domínio de antígeno compreende um monômero ou um dímero do ligante ou fragmento do mesmo. Em alguns casos, o ligante ou fragmento do mesmo é um monômero, um dímero, um trímero, a tetrâmero, um pentâmero, um hexâmero, um heptâmero, um octômero, um nonâmero ou um decâmero. Em alguns casos, o ligante ou fragmento do mesmo é um monômero ou um dímero. Em alguns casos, o domínio de antígeno não compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo. Em alguns casos, o domínio de antígeno não compreende uma região variável. Em alguns casos, o domínio de antígeno não compreende uma CDR. Em alguns casos, o ligante ou fragmento do mesmo é um ligante de grupo Natural Killer 2D (NKG2D) ou um fragmento do mesmo.

[0229] Em alguns casos, o domínio constante de TCR se incorpora a um

complexo de TCR funcional quando expresso numa célula T. Em alguns casos, o domínio constante de TCR se incorpora num mesmo complexo de TCR funcional que o complexo de TCR funcional que incorpora a TFP quando expresso numa célula T. Em alguns casos, a sequência que codifica a TFP e a sequência que codifica o domínio constante de TCR estão contidas numa mesma molécula de ácido nucleico. Em alguns casos, a sequência que codifica a TFP e a sequência que codifica o domínio constante de TCR estão contidas em moléculas de ácido nucleico diferentes.

[0230] Em alguns casos, a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo, o domínio de antígeno ou o ligante de ligação ou fragmento do mesmo são operacionalmente ligados por uma sequência ligante. Em alguns casos, a sequência ligante compreende (G4S)n, em que n=1 a 4.

[0231] Em alguns casos, o domínio transmembranar é um domínio transmembranar de TCR a partir de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta. Em alguns casos, o domínio intracelular é derivado de apenas CD3 épsilon, apenas CD3 gama, apenas CD3 delta, apenas TCR alfa ou apenas TCR beta.

[0232] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (ii) um domínio transmembranar de TCR, e (iii) um domínio intracelular de TCR, em que pelo menos dois dentre (i), (ii), e (iii) são da mesma subunidade de TCR.

[0233] Em alguns casos, o domínio extracelular de TCR compreende um domínio extracelular ou porção do mesmo de uma proteína selecionada do grupo que consiste numa cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, fragmentos funcionais dos mesmos, e sequências de aminoácidos do mesmo que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações.

[0234] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um domínio

transmembranar que compreende um domínio transmembranar de uma proteína selecionada do grupo que consiste numa cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, uma cadeia de TCR zeta, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, fragmentos funcionais dos mesmos, e sequências de aminoácidos dos mesmos que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações.

[0235] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular de TCR que compreende um domínio estimulatório de uma proteína selecionada a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta, ou uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos uma modificação na mesma.

[0236] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório de uma proteína selecionada a partir de um domínio de sinalização funcional de 4-1BB e/ou um domínio de sinalização funcional de CD3 zeta, ou uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos uma modificação na mesma.

[0237] Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio coestimulatório. Em alguns casos, o domínio coestimulatório compreende um domínio de sinalização funcional de uma proteína selecionada do grupo que consiste em OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), e 4-1BB (CD137), e sequências de aminoácidos da mesma que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações nas mesmas.

[0238] Em alguns casos, a subunidade de TCR compreende um motivo de ativação à base de tirosina de imunorreceptor (ITAM) de uma subunidade de TCR que compreende um ITAM ou porção do mesmo de uma proteína selecionada do grupo que consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de

CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama, subunidade de TCR de CD3 delta, cadeia de TCR zeta, cadeia de receptor Fc épsilon 1, cadeia de receptor Fc épsilon 2, cadeia de receptor Fc gama 1, cadeia de receptor Fc gama 2a, cadeia de receptor Fc gama 2b1, cadeia de receptor Fc gama 2b2, cadeia de receptor Fc gama 3a, cadeia de receptor Fc gama 3b, cadeia de receptor Fc beta 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, fragmentos funcionais dos mesmos, e sequências de aminoácidos dos mesmos que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações nas mesmas. Em alguns casos, o ITAM substitui um ITAM de CD3 gama, CD3 delta ou CD3 épsilon. Em alguns casos, o ITAM é selecionado do grupo que consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama, e subunidade de TCR de CD3 delta e substitui um ITAM diferente selecionado do grupo que consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama e subunidade de TCR de CD3 delta.

[0239] Em alguns casos, a TFP, o domínio constante de TCR alfa, o domínio constante de TCR beta, e qualquer combinação dos mesmos é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno. Em alguns casos, (a) o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa e a TFP funcionalmente se integra a um complexo de TCR que compreende uma subunidade endógena de TCR beta, CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, ou uma combinação dos mesmos; (b) o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR beta e a TFP se integra funcionalmente num complexo de TCR que compreende uma subunidade endógena de TCR alfa, CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, ou uma combinação dos mesmos; ou (c) o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta e a TFP se integra funcionalmente num complexo de TCR que compreende uma subunidade endógena de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, ou uma combinação dos mesmos.

[0240] Em alguns casos, a pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações no mesmo compreendem uma modificação de um aminoácido que medeia a sinalização celular ou uma modificação de um aminoácido que é fosforilado em resposta a um ligante que se liga à TFP.

[0241] Em alguns casos, o anticorpo humano ou humanizado é um fragmento de anticorpo. Em alguns casos, o fragmento de anticorpo é um scFv, um domínio de anticorpo de domínio único, um domínio VH ou um domínio VL. Em alguns casos, o anticorpo humano ou humanizado que compreende um domínio de ligação ao antígeno é selecionado de um grupo que consiste num domínio de ligação anti-CD19, domínio de ligação antiantígeno de maturação de célula B (BCMA), domínio de ligação antimesotelina (MSLN), domínio de ligação anti-CD22, domínio de ligação anti-BAFF, domínio de ligação anti-PD-1 e domínio de ligação anti-ROR-1.

[0242] Em alguns casos, o ácido nucleico é selecionado do grupo que consiste num DNA e um RNA. Em alguns casos, o ácido nucleico é um mRNA. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende um análogo de ácido nucleico, em que o análogo de ácido nucleico não está numa sequência de codificação do ácido nucleico recombinante. Em alguns casos, o análogo nucleico é selecionado a partir do grupo que consiste em 2’-O-metila, 2’-O-metoxietila (2’-O-MOE), 2’-O-aminopropila, 2’-desóxi, T-desoxi-2’-fluoro, 2’-O-aminopropila (2’-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetila (2’-O-DMAOE), 2’-O-dimetilaminopropila (2’-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietila (2’-O-DMAEOE), 2’-O-N-metilacetamido (2’-O-NMA) modificado, um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido etileno nucleico (ENA), um ácido nucleico de peptídeo (PNA), um ácido 1’,5’- anidro-hexitol nucleico (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo tiolfosfonato, e um 2’-fluoro N3-P5’-fosforamidita.

[0243] Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência de iniciação. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência promotora. Em alguns

casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica uma cauda poli(A). Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência 3’UTR. Em alguns casos, o ácido nucleico é um ácido nucleico isolado ou um ácido nucleico de ocorrência não natural. Em alguns casos, o ácido nucleico é um ácido nucleico transcrito in vitro.

[0244] Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR alfa. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR beta. Em alguns casos, o ácido nucleico recombinante compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR alfa e uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR beta.

[0245] São adicionalmente divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os vetores que compreendem o ácido nucleico recombinante divulgado no presente documento. Em alguns casos, o vetor é selecionado do grupo que consiste num DNA, num RNA, num plasmídeo, num vetor de lentivírus, vetor adenoviral, um vetor viral adenoassociado (AAV), um vetor viral de sarcoma de Rous (RSV), ou um vetor de retrovírus. Em alguns casos, o vetor é um vetor AAV6. Em alguns casos, o vetor compreende adicionalmente um promotor. Em alguns casos, o vetor é um vetor transcrito in vitro.

[0246] As sequências de ácido nucleico que codificam as moléculas desejáveis podem ser obtidas com o uso de métodos recombinantes conhecidos na técnica, como, por exemplo, triando-se bibliotecas de células que expressam o gene, derivando-se o gene de um vetor conhecido por incluir o mesmo, ou isolando-se o mesmo diretamente de células e tecidos que contêm o mesmo, com o uso de técnicas padrão. Alternativamente, o gene de interesse pode ser produzido sinteticamente, em vez de clonado.

[0247] A presente divulgação também fornece vetores em que um DNA da presente divulgação é inserido. Os derivados de retrovírus, como o lentivírus, são

ferramentas adequadas para alcançar a transferência de gene a longo prazo visto que permitem a integração estável a longo prazo de um transgene e sua propagação em células-filhas. Os vetores lentivirais têm a vantagem adicionada sobre vetores derivados de oncorretrovírus, como vírus de leucemia murino por poderem transduzir células não proliferantes, como hepatócitos. Os mesmos também têm a vantagem adicionada de baixa imunogenicidade.

[0248] Em outra modalidade, o vetor que compreende o ácido nucleico que codifica a TFP desejável da presente divulgação é um vetor adenoviral (A5/35). Em outra modalidade, a expressão de ácidos nucleicos que codificam TFPs pode ser alcançada com o uso de transposons, como sleeping beauty, crisper, CAS9 e nucleases de dedo de zinco. Consultar abaixo June et al. 2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716, o qual é incorporado ao presente documento a título de referência.

[0249] Os construtos de expressão da presente divulgação também podem ser usados para imunização de ácido nucleico e terapia de gene, com o uso de protocolos de administração de gene padrão. Os métodos para administração de genes são conhecidos na técnica (consultar, *por exemplo*, Patentes nº U.S. 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466, incorporadas a título de referência no presente documento, em suas totalidades). Em outra modalidade, a presente divulgação fornece um vetor de terapia de gene.

[0250] O ácido nucleico pode ser clonado em vários tipos de vetores. Por exemplo, o ácido nucleico pode ser clonado num vetor incluindo, mas sem limitação, um plasmídeo, um fagomídeo, um derivado de fago, um vírus animal, e um cosmídeo. Os vetores de interesse particular incluem vetores de expressão, vetores de replicação, vetores de geração de sonda e vetores de sequenciamento.

[0251] Adicionalmente, o vetor de expressão pode ser fornecido a uma célula na forma de um vetor viral. A tecnologia de vetor viral é bem conhecida na técnica e é descrita, por exemplo, em Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), e em outros

manuais de biologia e virologia molecular. Os vírus, os quais são úteis como vetores, incluem, mas sem limitação, retrovírus, adenovírus, vírus adenoassociados, vírus da herpes e lentivírus. Em geral, um vetor adequado contém uma origem de replicação funcional em pelo menos um organismo, uma sequência promotora, sítios de endonuclease de restrição conveniente, e um ou mais marcadores selecionáveis, (*por exemplo*, documentos nº WO 01/96584; WO 01/29058; e Patente nº U.S. 6.326.193).

[0252] Vários sistemas de base viral foram desenvolvidos para transferência de gene em células de mamíferos. Por exemplo, o retrovírus fornece uma plataforma conveniente para sistemas de administração de gene. Um gene selecionado pode ser inserido num vetor e empacotado em partículas retrovirais com o uso de técnicas conhecidas na arte. O vírus recombinante pode ser, então, isolado e entregue a células do sujeito *in vivo* ou *ex vivo*. Vários sistemas retrovirais são conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, os vetores de adenovírus são usados. Vários vetores de adenovírus são conhecidos na técnica. Numa modalidade, vetores de lentivírus são usados.

[0253] Os elementos promotores adicionais, *por exemplo*, intensificadores, regulam a frequência de iniciação de transcrição. Tipicamente, os mesmos estão localizados na região 30 a 110 bp a montante do sítio de início, embora vários promotores tenham demonstrado conter elementos funcionais a jusante do sítio de início. O espaçamento entre elementos promotores é frequentemente flexível, de modo que a função de promotor seja preservada quando elementos são invertidos ou movidos um em relação ao outro. No promotor de timidina quinase (tk), o espaçamento entre elementos promotores pode ser aumentado para 50 bp de distância antes da atividade começar a declinar. Dependendo do promotor, parece que elementos individuais podem funcionar cooperativamente ou independentemente para ativar a transcrição.

[0254] Um exemplo de um promotor que tem capacidade para expressar um transgene de TFP numa célula T de mamífero é o promotor EF1a. O promotor EF1a

nativo aciona a expressão da subunidade alfa do complexo de fator 1 de alongamento, o qual é responsável pela administração enzimática de aminoacil tRNAs ao ribossomo. O promotor EF1a foi extensivamente usado em plasmídeos de expressão de mamífero e demonstrou ser eficaz no acionamento de expressão de TFP de transgenes clonados num vetor lentiviral (consultar, *por exemplo*, Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)). Outro exemplo de um promotor é a sequência promotora de citomegalovírus (CMV) imediatamente inicial. Esta sequência promotora é uma sequência promotora constitutiva forte com capacidade para acionar altos níveis de expressão de qualquer sequência de polinucleotídeo operacionalmente ligada à mesma. Entretanto, outras sequências promotoras constitutivas também podem ser usadas, incluindo, mas sem limitação, o promotor inicial de vírus de símio 40 (SV40), vírus de tumor mamário de camundongo (MMTV), promotor de repetição terminal longa (LTR) de vírus da imunodeficiência humana (HIV), promotor de MoMuLV, um promotor de vírus de leucemia aviária, um promotor inicial imediato de vírus Epstein-Barr, um promotor de vírus de sarcoma de Rous, assim como promotores de gene humano, como, mas sem limitação, o promotor de actina, o promotor de miosina, o promotor de fator-1a de alongamento, o promotor de hemoglobina e o promotor de creatina quinase. Adicionalmente, a presente divulgação não deve ser limitada ao uso de promotores constitutivos. Os promotores induzíveis também são contemplados como parte da presente divulgação. O uso de um promotor induzível fornece uma capacidade de comutação molecular para ativar a expressão da sequência de polinucleotídeo que é operacionalmente ligada quando tal expressão é desejável ou desativar a expressão quando a expressão não é desejável. Os exemplos de promotores induzíveis incluem, mas sem limitação, um promotor de metalotionina, um promotor glicocorticoide, um promotor de progesterona e um promotor regulado por tetraciclina.

[0255] A fim de avaliar a expressão de um polipeptídeo de TFP ou porções do mesmo, o vetor de expressão a ser introduzido numa célula também pode conter

um gene marcador selecionável ou um gene repórter ou tanto para facilitar a identificação quanto a seleção de células de expressão da população de células das quais se busca sua transfecção ou infecção através de vetores virais. Em outros aspectos, o marcador selecionável pode ser carreado numa peça separada de DNA e usado num procedimento de cotransfecção. Tanto os marcadores selecionáveis quanto os genes repórteres podem ser flanqueados com as sequências reguladoras apropriadas para possibilitar a expressão nas células hospedeiras. Os marcadores selecionáveis úteis incluem, por exemplo, genes de resistência antibiótica, como neo e semelhantes.

[0256] Os genes repórter são usados para identificar células potencialmente transfectadas e para avaliar a funcionalidade de sequências reguladoras. Em geral, um gene repórter é um gene que não está presente em ou expresso pelo organismo ou tecido recipiente e que codifica um polipeptídeo cuja expressão é manifestada por alguma propriedade facilmente detectável, *por exemplo*, atividade enzimática. A expressão do gene repórter é avaliada num tempo adequado após o DNA ter sido introduzido nas células receptoras. Os genes repórteres adequados podem incluir genes que codificam a luciferase, beta-galactosidase, acetil transferase de cloranfenicol, fosfatase alcalina secretada, ou o gene de proteína fluorescente verde (*por exemplo*, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Os sistemas de expressão adequados são bem conhecidos e podem ser preparados com o uso de técnicas conhecidas ou obtidas comercialmente. Em geral, o construto com a região de flanqueamento 5’ mínima que mostra o nível mais alto de expressão de gene repórter é identificado como o promotor. Tais regiões de promotor podem ser ligadas a um gene repórter e usadas para avaliar os agentes para a capacidade para modular a transcrição acionada por promotor.

[0257] Os métodos para introduzir e expressar genes numa célula são conhecidos na técnica. no contexto de um vetor de expressão, o vetor pode ser prontamente introduzido numa célula hospedeira, *por exemplo*, célula de mamíferos, bacterianas, de levedura ou insetos por qualquer método na técnica.

Por exemplo, o vetor de expressão pode ser transferido para uma célula hospedeira por meios físicos, químicos ou biológicos.

[0258] Os métodos físicos para introduzir um polinucleotídeo a uma célula hospedeira incluem precipitação de fosfato de cálcio, lipofecção, bombardeio de partículas, microinjeção, eletroporação e semelhantes. Os métodos para produzir células que compreendem vetores e/ou ácidos nucleicos exógenos são bem conhecidos na técnica. Consultar, por exemplo, Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Um método preferencial para a introdução de um polinucleotídeo a uma célula hospedeira é transfecção de fosfato de cálcio.

[0259] Os métodos biológicos para introduzir um polinucleotídeo de interesse numa célula hospedeira incluem o uso de vetores de DNA e RNA. Os vetores virais, e especialmente vetores retrovirais, se tornaram o método mais amplamente usados para inserir genes em mamíferos, *por exemplo*, células humanas. Outros vetores virais podem ser derivados de lentivírus, poxvírus, vírus de herpes simples I, adenovírus e vírus adenoassociado, e semelhantes (consultar, *por exemplo*, Patentes nº U.S. 5.350.674 e 5.585.362.

[0260] Os meios químicos para introduzir um polinucleotídeo numa célula hospedeira incluem sistemas de dispersão coloidais, como complexos de macromolécula, nanocápsulas, microesferas, esferas, e sistemas à base de lipídio incluindo emulsões de óleo em água, micelas, micelas misturadas e lipossomos. Um sistema coloidal exemplificativo para uso como um veículo de administração *in vitro* e *in vivo* é um lipossomo (*por exemplo*, uma vesícula de membrana artificial). Outros métodos de administração alvejada de estado da técnica de ácidos nucleicos estão disponíveis, como administração de polinucleotídeos com nanopartículas alvejadas ou outro sistema de administração dimensionada de submícrons adequada.

[0261] No caso em que um sistema de administração não viral é utilizado, um veículo de administração exemplificativo é um lipossomo. O uso de formulações

de lipídio é contemplado para a introdução dos ácidos nucleicos numa célula hospedeira (*in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*). Em outro aspecto, o ácido nucleico pode ser associado a um lipídio. O ácido nucleico associado a um lipídio pode ser encapsulado no interior aquoso de um lipossomo, intercalado na bicamada de lipídio de um lipossomo, ligado a um lipossomo por meio de uma molécula de ligação que é associada tanto ao lipossomo quanto ao oligonucleotídeo, retido num lipossomo, complexado com um lipossomo, dispersado numa solução que contém um lipídio, misturado com um lipídio, combinado com um lipídio, contido como uma suspensão num lipídio, contido ou complexado com uma micela, ou associado de outro modo a um lipídio. As composições associadas a lipídio, lipídio/DNA ou lipídio/vetor de expressão não são limitadas a qualquer estrutura particular em solução. Por exemplo, as mesmas podem estar presentes numa estrutura de bicamada, como micelas, ou com uma estrutura “colapsada”. As mesmas também podem ser simplesmente intercaladas numa solução, possivelmente formando agregados que não são uniformes em tamanho ou formato. Os lipídios são substâncias graxas que podem ser lipídios sintéticos ou de ocorrência natural. Por exemplo, os lipídios incluem as gotículas graxas que ocorrem naturalmente no citoplasma, assim como a classe de compostos que contêm hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa e seus derivados, como ácidos graxos, álcoois, aminas, aminoálcoois, e aldeídos.

[0262] Os lipídios adequados para uso podem ser obtidos a partir de fontes comerciais. Por exemplo, dimiristil fosfatidilcolina (“DMPC”) pode ser obtida de Sigma, St. Louis, Mo.; fosfato de dicetila (“DCP”) pode ser obtido de K & K Laboratories (Plainview, N.Y.); colesterol (“Choi”) pode ser obtido de Calbiochem-Behring; dimiristil fosfatidilglicerol (“DMPG”) e outros lipídios podem ser obtidos de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.). As soluções de estoque de lipídios em clorofórmio ou clorofórmio/metanol podem ser armazenadas a cerca de -20 °C. O clorofórmio é usado como o único solvente, visto que é mais prontamente evaporado do que o metanol. “Lipossomo” é um termo genérico que abrange uma

variedade de veículos de lipídio únicos e multilamelares formados pela geração de bicamadas de lipídio envolvidas ou agregados. Os lipossomos podem ser caracterizados como tendo estruturas vesiculares com uma membrana de bicamada fosfolipídica e um meio aquoso interno. Os lipossomos multilamelares têm múltiplas camadas de lipídio separadas por meio aquoso. Os mesmos se formam espontaneamente quando os fosfolipídios são suspensos num excesso de solução aquosa. Os componentes de lipídio são submetidos à autorredisposição antes da formação de estruturas fechadas e retêm água e solutos dissolvidos entre as bicamadas de lipídio (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-510). Entretanto, as composições que têm estruturas diferentes em solução em relação à estrutura vesicular normal também são abrangidas. Por exemplo, os lipídios podem assumir uma estrutura micelar ou meramente existir como agregados não uniformes de moléculas de lipídio. Também são contemplados os complexos de lipofectamina-ácido nucleico.

[0263] Independentemente do método usado para introduzir ácidos nucleicos exógenos numa célula hospedeira ou expor de outro modo uma célula ao inibidor da presente divulgação, a fim de confirmar a presença da sequência de DNA recombinante na célula hospedeira, uma variedade de ensaios pode ser realizada. Tais ensaios incluem, por exemplo, ensaios “biológicos moleculares” bem conhecidos por aqueles versados na técnica, como técnica de Southern e Northern blot, RT-PCR e PCR; ensaios “bioquímicos”, como detectando a presença ou ausência de um peptídeo particular, *por exemplo*, por meios imunológicos (ELISAs e western blots) ou por ensaios descritos no presente documento para identificar agentes dentro do escopo da presente divulgação.

[0264] A presente divulgação fornece adicionalmente um vetor que compreende uma TFP que codifica molécula de ácido nucleico. Num aspecto, um vetor de TFP pode ser diretamente transduzido numa célula, *por exemplo*, uma célula T. Num aspecto, o vetor é um vetor de clonagem ou expressão, *por exemplo*, um vetor incluindo, mas sem limitação, um ou mais plasmídeos (*por exemplo*,

plasmídeos de expressão, vetores de clonagem, minicírculos, minivetores, cromossomos de minuto duplo), construtos lentivirais de vetor e retrovirais. Num aspecto, o vetor tem capacidade para expressar o construto de TFP em células T de mamíferos. Num aspecto, a célula T de mamífero é uma célula T humana.

CÉLULAS MODIFICADAS T

[0265] São divulgadas no presente documento, em algumas modalidades, as células T modificadas que compreende o ácido nucleico recombinante divulgado no presente documento, ou os vetores divulgados no presente documento; em que a célula T modificada compreende uma ruptura funcional de um TCR endógeno. Também são divulgadas no presente documento, em algumas modalidades, as células T modificadas que compreendem a sequência que codifica a TFP do ácido nucleico divulgado no presente documento ou uma TFP codificada pela sequência do ácido nucleico divulgado no presente documento, em que a célula T modificada compreende uma ruptura funcional de um TCR endógeno. São adicionalmente divulgadas no presente documento, em algumas modalidades, as células T alogênicas modificadas que compreendem a sequência que codifica a TFP divulgada no presente documento ou uma TFP codificada pela sequência do ácido nucleico divulgado no presente documento.

[0266] Em alguns casos, a célula T compreende adicionalmente uma sequência heteróloga que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta ou um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta. Em alguns casos, o TCR endógeno que é funcionalmente interrompido é uma cadeia de TCR alfa endógena, uma cadeia de TCR beta endógena, ou uma cadeia de TCR alfa endógena e uma cadeia de TCR beta endógena. Em alguns casos, o TCR endógeno que é funcionalmente interrompido tem ligação reduzida ao complexo de MHC-peptídeo em comparação com aquela de uma célula T de controle não modificada. Em alguns casos, a ruptura funcional é uma ruptura de um gene que codifica o TCR endógeno. Em alguns casos, a

ruptura de um gene que codifica o TCR endógeno é uma remoção de uma sequência do gene que codifica o TCR endógeno a partir do genoma de uma célula T. Em alguns casos, a célula T é uma célula T humana. Em alguns casos, a célula T é uma célula T CD8+ ou CD4+. Em alguns casos, a célula T é uma célula T alogênica. Em alguns casos, as células T modificadas compreendem adicionalmente um ácido nucleico que codifica uma molécula inibitória que compreende um primeiro polipeptídeo que compreende pelo menos uma porção de uma molécula inibitória, associada a um segundo polipeptídeo que compreende um sinal positivo de um domínio de sinalização intracelular. Em alguns casos, a molécula inibitória compreende o primeiro polipeptídeo que compreende pelo menos uma porção de PD1 e o segundo polipeptídeo que compreende um domínio coestimulatório e domínio de sinalização primário.

FONTES DE CÉLULAS T

[0267] Anterior à expansão e à modificação genética, uma fonte de células T é obtida de um sujeito. O termo “sujeito” é destinado a incluir organismos vivos nos quais uma resposta imunológica pode ser elicitada (*por exemplo*, mamíferos). Os exemplos de sujeitos incluem seres humanos, cães, gatos, camundongos, ratos e espécies transgênicas dos mesmos. As células T podem ser obtidas a partir de várias fontes, incluindo células mononucleares de sangue periférico, medula óssea, tecido de linfonodo, sangue de cordão umbilical, tecido de timo, tecido de um sítio de infecção, asciite, efusão pleural, tecido de baço e tumores. Em certos aspectos da presente divulgação, qualquer número de linhagens de célula T disponíveis na técnica pode ser usado. Em certos aspectos da presente divulgação, as células T podem ser obtidas de uma unidade de sangue coletado de um sujeito com o uso de qualquer número de técnicas conhecidas pelo sujeito versado na técnica, como separação de Ficoll™. Num aspecto preferencial, as células do sangue de circulação de um indivíduo são obtidas por aferese. O produto de aferese contém tipicamente linfócitos, incluindo células T, monócitos, granulócitos, células B, outros glóbulos brancos nucleados, glóbulos vermelhos e plaquetas. Num aspecto, as

células coletadas por aferese podem ser lavadas para remover a fração de plasma e colocar as células num tampão apropriado ou meios para etapas de processamento subsequentes. Num aspecto da presente divulgação, as células são lavadas com solução salina tamponada de fosfato (PBS). Num aspecto alternativo, a solução de lavagem não tem cálcio e pode não ter magnésio ou pode não ter muitos (se não todos) os cátions divalentes. As etapas de ativação inicial na ausência de cálcio podem levar à ativação ampliada. Como aqueles de habilidade comum na técnica observariam prontamente, uma etapa de lavagem pode ser alcançada por métodos conhecidos por aqueles na técnica, como usando-se uma centrífuga de “fluxo atravessante” semiautomatizada (por exemplo, o processador de células Cobe® 2991, o Baxter OncologyCytoMate, ou o Haemonetics® Cell Saver® 5) de acordo com as instruções do fabricante. Após a lavagem, as células podem ser ressuspensas numa variedade de tampões biocompatíveis, como, por exemplo, livre de Ca, PBS livre de Mg, PlasmaLyte A, ou outra solução salina com ou sem tampão. Alternativamente, os componentes indesejáveis da amostra de aferese podem ser removidos, e as células diretamente ressuspensas em meios de cultura.

[0268] Num aspecto, as células T são isoladas de linfócitos de sangue periférico lisando-se os glóbulos vermelhos e depletando-se os monócitos, por exemplo, por centrifugação através de um gradiente PERCOLL® ou por elutriação centrífuga contrafluxo. Uma subpopulação específica de células T, como células T CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+, e CD45RO+, podem ser adicionalmente isoladas por técnicas de seleção positivas ou negativas. Por exemplo, num aspecto, as células T são isoladas por incubação com esferas conjugadas anti-CD3/anti-CD28 (*por exemplo*, 3x28), como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, por um período de tempo suficiente para seleção positiva das células T desejáveis. Num aspecto, o período de tempo é cerca de 30 minutos. Num aspecto adicional, o período de tempo está na faixa de 30 minutos a 36 horas ou mais e todos os valores de número inteiro estão entre a mesma. Num aspecto adicional, o período de tempo

é pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 horas. Em ainda outro aspecto preferencial, o período de tempo é 10 a 24 horas. Num aspecto, o período de tempo de incubação é 24 horas. Os tempos de incubação mais longos podem ser usados para isolar células T em qualquer situação em que há poucas células T em comparação com outros tipos de célula, como no isolamento de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) de tecido tumoral ou de indivíduos imunocomprometidos. Adicionalmente, o uso de tempos de incubação mais longos pode aumentar a eficácia de captura de células T CD8+. Deste modo, simplesmente encurtando-se ou alongando-se o tempo permite-se que as células T se liguem às esferas de CD3/CD28 e/ou aumentando-se ou diminuindo-se a razão entre esferas e células T (conforme descrito adicionalmente no presente documento), as subpopulações de células T podem ser preferencialmente selecionadas para ou contra uma iniciação de cultura ou em outros pontos no tempo durante o processo. Adicionalmente, aumentando-se ou diminuindo-se a razão entre anticorpos anti-CD3 e/ou anti-CD28 nas esferas ou outra superfície, as subpopulações de células T podem ser preferencialmente selecionadas para ou contra uma iniciação de cultura ou em outros pontos no tempo desejáveis. O artesão versado na técnica reconheceria que múltiplos ciclos de seleção também podem ser usados no contexto desta presente divulgação. Em certos aspectos, pode ser desejável realizar o procedimento de seleção e usar as células “não selecionadas” no processo de ativação e expansão. As células “não selecionadas” também podem ser submetidas a ciclos adicionais de seleção.

[0269] O enriquecimento de uma população de célula T por seleção negativa pode ser alcançado com uma combinação de anticorpos direcionados a marcadores de superfície únicos para as células negativamente selecionadas. Um método é classificação de célula e/ou seleção por meio de imunoaderência magnética negativa ou citometria de fluxo que usa um coquetel de anticorpos monoclonais direcionado a marcadores de superfície celular presentes nas células negativamente selecionadas. Por exemplo, para enriquecer as células CD4+ por seleção negativa, um coquetel de anticorpo monoclonal inclui tipicamente os

anticorpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR e CD8. Em certos aspectos, pode ser desejável enriquecer para ou selecionar positivamente para as células T reguladoras que expressam tipicamente CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+, e FoxP3+. Alternativamente, em certos aspectos, as células reguladoras T são depletadas por esferas conjugadas anti-C25 ou outro método similar de seleção.

[0270] Numa modalidade, uma população de célula T pode ser selecionada, a qual expressa um ou mais dentre IFN-γ TNF-alfa, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, granzima B, e perforina, ou outras moléculas apropriadas, *por exemplo*, outras citocinas. Os métodos para triagem para expressão de célula podem ser determinados, *por exemplo*, pelos métodos descritos na Publicação PCT nº: WO 2013/126712.

[0271] Para o isolamento de uma população desejável de células por seleção positiva ou negativa, a concentração de células e superfície (*por exemplo*, partículas, como esferas) pode ser variada. Em certos aspectos, pode ser desejável diminuir significativamente o volume em que as esferas e as células são misturadas juntas (*por exemplo*, aumentar a concentração de células), para garantir o contato máximo de células e esferas. Por exemplo, num aspecto, uma concentração de 2 bilhões de células/ml é usada. Num aspecto, uma concentração de 1 bilhões de células/ml é usada. Num aspecto adicional, mais que 100 milhões de células/ml são usados. Num aspecto adicional, uma concentração de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 milhões de células/ml é usada. Ainda num aspecto adicional, uma concentração de células de 75, 80, 85, 25, 30, 35, 90, 95, ou 100 milhões de células/ml é usada. Em aspectos adicionais, as concentrações de 125 ou 150 milhões de células/ml podem ser usadas. O uso de altas concentrações pode resultar em rendimento de célula aumentado, ativação de célula e expansão de célula. Adicionalmente, o uso de altas concentrações de célula permite a captura mais eficaz de células que podem expressar fracamente os antígenos alvo de interesse, como células T negativas CD28, ou de amostras em que há muitas células tumorais presentes (*por exemplo*, sangue leucêmico, tecido de tumor, etc.).

Tais populações de células podem ter valor terapêutico e seriam desejáveis de obter. Por exemplo, o uso de alta concentração de células permite a seleção mais eficaz de células T CD8+ que teriam normalmente a expressão de CD28 mais fraca.

[0272] Num aspecto relacionado, pode ser desejável usar concentrações mais baixas de células. Diluindo-se significativamente a mistura de células T e superfície (*por exemplo*, partículas, como esferas), as interações entre as partículas e células é minimizada. Isto seleciona células que expressam altas quantidades de antígenos desejáveis a serem ligados às partículas. Por exemplo, as células T CD4+ expressam níveis mais altos de CD28 e são capturadas de modo mais eficaz do que as células T CD8+ em concentrações diluídas. Num aspecto, a concentração de células usada é $5x10^6$/ml. Em outros aspectos, a concentração usada pode ser de cerca de $1x10^5$/ml a $1x10^6$/ml, e qualquer valor de número inteiro entre as mesmas. Em outros aspectos, as células podem ser incubadas num rotor por comprimentos variáveis de tempo em velocidades variáveis em 2 a 10 °C ou à temperatura ambiente.

[0273] As células T para estímulo também podem ser congeladas após uma etapa de lavagem. Sem desejar se atrelar à teoria, o congelamento e a etapa de descongelamento subsequente fornecem um produto mais uniforme removendo-se granulócitos e, até certo ponto, monócitos na população de célula. Após a etapa de lavagem que remove plasma e plaquetas, as células podem ser suspensas numa solução de congelamento. Embora muitas soluções e parâmetros de congelamento sejam conhecidas na técnica e sejam úteis neste contexto, um método envolve o uso de PBS que contém DMSO 20% e albumina sérica humana 8%, ou meios de cultura que contêm Dextrano 40 10% e Dextrose 5%, Albumina Sérica Humana 20% e DMSO 7,5%, ou Plasmalyte-A 31,25%, Dextrose 5% 31,25%, NaCl 0,45%, Dextrano 40 10% e Dextrose 5%, Albumina Sérica Humana 20% e DMSO 7,5% ou outros meios de congelamento de célula adequados que contêm por exemplo, Hespan e PlasmaLyte A, as células são, então, congeladas a -80 °C a uma taxa de 1 por minuto e armazenadas na fase de vapor de um tanque de armazenamento

de nitrogênio líquido. Outros métodos de congelamento controlado podem ser usados assim como congelamento não controlado imediatamente a -20 °C ou em nitrogênio líquido. Em certos aspectos, as células criopreservadas são descongeladas e lavadas conforme descrito no presente documento e permite-se que repousem por uma hora à temperatura ambiente antes da ativação com o uso dos métodos da presente divulgação.

[0274] Também é contemplada no contexto da presente divulgação é a coleta de amostras de sangue ou produto de aferese de um sujeito num período de tempo antes de quando as células expandidas conforme descrito no presente documento podem ser necessárias. Como tal, a fonte das células a serem expandidas pode ser coletada em qualquer ponto no tempo necessário, e células desejáveis, como células T, isoladas e congeladas para uso posterior em terapia de célula T para quaisquer várias doenças ou afecções que se beneficiariam da terapia de célula T, como aquelas descritas no presente documento. Num aspecto, uma amostra sanguínea ou uma aferese é tomada de um sujeito geralmente saudável. Em certos aspectos, uma amostra sanguínea ou uma aferese é tomada de um sujeito geralmente saudável que tem risco de desenvolver uma doença, mas que ainda não desenvolveu uma doença, e as células de interesse são isoladas e congeladas para uso posterior. Em certos aspectos, as células T podem ser expandidas, congeladas e usadas num momento posterior. Em certos aspectos, as amostras são coletadas de um paciente logo após o diagnóstico de uma doença particular, conforme descrito no presente documento, mas anterior a quaisquer tratamentos. Num aspecto adicional, as células são isoladas de uma amostra sanguínea ou uma aferese de um sujeito antes de qualquer número de modalidades de tratamento relevantes, incluindo, mas sem limitação, tratamento com agentes, como natalizumab, efalizumab, agentes antivirais, quimioterapia, radiação, agentes imunossupressores, como ciclosporina, azatioprina, metotrexato e micofenolato, anticorpos, ou outros agentes imunoablativos, como alemtuzumab, anticorpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, ácido

micofenólico, esteroides, romidepsina e irradiação.

[0275] Num aspecto adicional da presente divulgação, as células T são obtidas de um paciente diretamente após o tratamento que deixa o sujeito com células T funcionais. Neste aspecto, foi observado que após os certos tratamentos de câncer, em tratamentos particulares com fármacos que danificam o sistema imunológico, logo após o tratamento durante o período quando pacientes normalmente se recuperariam do tratamento, a qualidade de células T obtidas pode ser otimizada ou melhorada para sua capacidade de se expandir *ex vivo*. De modo semelhante, após a manipulação *ex vivo* com o uso dos métodos descritos no presente documento, estas células podem estar num estado preferencial para enxerto intensificado e expansão *in vivo*. Deste modo, é contemplado no contexto da presente divulgação para coletar células sanguíneas, incluindo células T, células dendríticas, ou outras células da linhagem hematopoiética, durante esta fase de recuperação. Adicionalmente, em certos aspectos, mobilização (por exemplo, mobilização com GM-CSF) e regimes de condicionamento podem ser usados para criar uma afecção num sujeito em que a repopulação, recirculação, regeneração e/ou expansão de tipos de célula particulares é favorecida, especialmente durante um intervalo definido de tempo após a terapia. Os tipos de célula ilustrativos incluem células T, células B, células dendríticas, e outras células do sistema imunológico.

ATIVAÇÃO E EXPANSÃO DE CÉLULAS T

[0276] As células T podem ser ativadas e expandidas geralmente com o uso de métodos conforme descrito, por exemplo, nas Patentes nº U.S. 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; e 7.572.631.

[0277] Em geral, as células T da presente divulgação podem ser expandidas por contato com uma superfície que tem ligada à mesma um agente que estimula um sinal associado ao complexo de CD3/TCR e um ligante que estimula uma

molécula coestimuladora na superfície das células T. Em particular, as populações de célula T podem ser estimuladas conforme descrito no presente documento, como por contato com um anticorpo anti-CD3, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou um anticorpo anti-CD2 imobilizado numa superfície, ou por contato com um ativador de proteína quinase C (*por exemplo*, briostatina) em combinação com um ionóforo de cálcio. Para coestímulo de uma molécula de acessório na superfície das células T, um ligante que liga a molécula de acessório é usado. Por exemplo, uma população de células T pode fazer contato com um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28, sob condições apropriadas para estimular a proliferação das células T. Para estimular a proliferação de células T CD4+ ou células T CD8+, um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28. Os exemplos de um anticorpo anti-CD28 incluindo 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besancon, França) podem ser usados, assim como outros métodos comumente conhecidos na técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol. Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

[0278] As células T que foram expostas a tempos de estímulo variados podem exibir características diferentes. Por exemplo, os produtos de célula mononuclear sanguínea periférica com aferese ou sanguínea típica têm uma população de células T auxiliares (TH, CD4+) que é maior do que a população de células T citotóxicas ou supressoras (TC, CD8+). A expansão *ex vivo* de células T estimulando-se receptores CD3 e CD28 produz uma população de células T que antes de em torno dos dias 8 a 9 consiste predominantemente em células TH, enquanto após de em torno dos dias 8 a 9, a população de células T compreende uma população crescentemente maior de células TC. Consequentemente, dependendo do propósito de tratamento, infundir um sujeito com uma população de células T que compreende predominantemente células TH pode ser vantajoso. De modo similar, se um subconjunto específico de antígeno de células TC foi isolado, pode ser benéfico expandir para este subconjunto a um grau maior.

[0279] Adicionalmente, além de marcadores de CD4 e CD8, outros marcadores fenotípicos variam de modo significativo, mas em grande parte, de modo reproduzível durante o curso do processo de expansão de célula. Deste modo, tal reprodutibilidade possibilita a capacidade de personalizar um produto de célula T ativado com propósitos específicos.

[0280] Uma vez que uma TFP anti-CD19, anti-BCMA, anti-CD22, anti-ROR1, anti-PD-1, ou anti-BAFF é construída, vários ensaios podem ser usados para avaliar a atividade da molécula, como, mas sem limitação, a capacidade de expandir células T após o estímulo de antígeno, sustentar expansão de célula T na ausência de reestimulo, e atividades anticâncer em modelos *in vitro* e animais apropriados. Os ensaios para avaliar os efeitos de uma TFP anti-CD19 anti-BCMA, anti-CD22, anti-ROR1, anti-PD-1, ou anti-BAFF são descritos em detalhes adicionais abaixo.

[0281] A análise de Western blot de expressão de TFP em células T primárias pode ser usada para detectar a presença de monômeros e dímeros (consultar, *por exemplo*, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). Muito brevemente, as células T (mistura 1:1 de células T $CD4^+$ e $CD8^+$) que expressam TFPs são expandidas *in vitro* por mais que 10 dias após a lise e SDS-PAGE sob condições de redução. TFPs são detectadas por técnica de western blot com o uso de um anticorpo para uma cadeia de TCR. Os mesmos subconjuntos de célula T são usados para análise de SDS-PAGE sob condições não redutoras para permitir a avaliação de formação de dímero covalente.

[0282] A expansão *in vitro* de células T TFP^+ após o estímulo de antígeno pode ser medida por citometria de fluxo. Por exemplo, uma mistura de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ é estimulada com alfaCD3/alfaCD28 e APCs seguida por transdução com vetores lentivirais que expressam GFP sob o controle dos promotores a serem analisados. Os promotores exemplificativos incluem o gene CMV IE, EF-1alfa, ubiquitina C, ou promotores de fosfogliceroquinase (PGK). A fluorescência de GFP é avaliada no dia 6 de cultura nos subconjuntos de célula T CD4+ e/ou por

citometria de fluxo (consultar, *por exemplo*, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). Alternativamente, uma mistura de células T CD4+ e CD8+ é estimulada com esferas magnéticas revestidas alfaCD3/alfaCD28 no dia 0, e transduzidas com TFP no dia 1 com o uso de um vetor bicistrônico lentiviral que expressa TFP juntamente com eGFP com o uso de uma sequência de salto ribossômico 2A. As culturas são reestimuladas com células CD19+ K562 (K562-CD19), células K562 de tipo selvagem (tipo selvagem K562) ou células K562 que expressam hCD32 e 4-1BBL na presença de anticorpo antiCD3 e anti-CD28 (K562-BBL-3/28) após a lavagem. IL-2 exógena é adicionada às culturas dia sim, dia não a 100 IU/ml. As células T GFP+ são numeradas por citometria de fluxo com o uso de contagem com base em esfera (consultar, *por exemplo*, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)).

[0283] A expansão de célula T TFP+ sustentada na ausência de reestimulo também ser medida (consultar, *por exemplo*, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). Brevemente, o volume de célula T médio (fl) é medido no dia 8 de cultura com o uso de um contador de partículas Coulter Multisizer III após o estímulo com esferas magnéticas revestidas alfaCD3/alfaCD28 no dia 0, e transdução com a TFP indicada no dia 1.

[0284] Os modelos animais também podem ser usados para medir uma atividade de TFP-T. Por exemplo, o modelo de xenoenxerto com o uso de células T TFP+ específicas de CD19 humano para tratar uma ALL pré-B humana primária em camundongos imunodeficientes pode ser usado (consultar, *por exemplo*, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). Muito brevemente, após o estabelecimento de ALL, os camundongos são aleatorizados quanto aos grupos de tratamento. Os números diferentes de células T manipuladas são coinjetados a uma razão 1:1 em camundongos NOD/SCID/γ-/- que portam B-ALL. O número de cópias de cada vetor em DNA de baço de camundongos é avaliado em vários tempos após a injeção de célula T. Os animais são avaliados em relação à leucemia em intervalos semanais. As contagens de célula de blasto CD19+ B-ALL de sangue

periférico são medidas em camundongos que são injetados com células T TFP+ alfaCD19-zeta ou células T transduzidas simuladas. As curvas de sobrevivência para os grupos são comparadas com o uso do teste de classificação de log. Além disto, as contagens de célula T CD4+ e CD8+ de sangue periférico absolutas 4 semanas após a injeção de células T em camundongos NOD/SCID/γ-/- também podem ser analisadas. Os camundongos são injetados com células leucêmicas e 3 semanas depois de serem injetados com células T manipuladas para expressar TFP por um vetor lentiviral bicistrônico que codifica a TFP ligada a eGFP. As células T são normalizadas para células T GFP+ de entrada 45 a 50% misturando-se com células transduzidas simuladas antes da injeção, e confirmadas por citometria de fluxo. Os animais são avaliados em relação à leucemia em intervalos de 1 semana. As curvas de sobrevivência para os grupos de célula T TFP+ são comparadas com o uso do teste de classificação de log.

[0285] A resposta de tratamento de TFP dependente de dose pode ser avaliada (consultar, *por exemplo*, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). Por exemplo, o sangue periférico é obtido 35 a 70 dias após estabelecer a leucemia em camundongos injetados no dia 21 com células T TFP, um número equivalente de células T transduzidas simuladas, ou nenhuma célula T. Os camundongos de cada grupo são aleatoriamente sangrados para determinação de contagens de blasto de CD19+ ALL de sangue periférico e, então, exterminados nos dias 35 e 49. Os animais restantes são avaliados nos dias 57 e 70.

[0286] A avaliação de proliferação de célula e produção de citocina foi anteriormente descrita, *por exemplo*, em Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Brevemente, a avaliação de proliferação mediada por TFP é realizada em placas de microtitulação misturando-se células T lavadas com células K562 que expressam CD19 (K19) ou CD32 e CD137 (KT32-BBL) para uma razão final de célula T:K562 de 2:1. As células K562 são irradiadas com radiação gama antes do uso. Os anticorpos monoclonais anti-CD3 (clone OKT3) e anti-CD28 (clone 9.3) são adicionados às culturas com células KT32-BBL para servir como

controle positivo para estimular a proliferação de célula T visto que estes sinais suportam expansão de célula T CD8+ a longo prazo *ex vivo*. As células T são numeradas em culturas com o uso de esferas fluorescentes CountBright™ (Invitrogen) e citometria de fluxo conforme descrito pelo fabricante. As células T TFP+ são identificadas por expressão de GFP com o uso de células T que são manipuladas com vetores lentivirais que expressam TFP ligados por eGFP-2A. Para células T TFP+ que não expressam GFP, as células T TFP+ são detectadas com proteína CD19 recombinante biotinilada e um conjugado de avidina-PE secundário. A expressão de CD4+ e CD8+ em células T também é simultaneamente detectada com anticorpos monoclonais específicos (BD Biosciences). As medições de citocina são realizadas em sobrenadantes coletados 24 horas após o reestimulo com o uso do kit de arranjo de esfera citométrica de citocina TH1/TH2 humana (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. A fluorescência é avaliada com o uso de um citômetro de fluxo FACScalibur™ (BD Biosciences), e os dados são analisados de acordo com as instruções do fabricante.

[0287] A citotoxicidade pode ser avaliada por um ensaio de liberação de ^{51}Cr padrão (consultar, *por exemplo*, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). As células-alvo (linhagens K562 e células pro-B-ALL primárias) são carregadas com ^{51}Cr (como $NaCrO_4$, New England Nuclear) a 37 °C por 2 horas com agitação frequente, lavadas duas vezes em RPMI completa e transferidas para placa em placas de microtítulo. As células T efetoras são misturadas com células-alvo nos poços em RPMI completa em razões variáveis de célula efetora:célula-alvo (E:T). Os poços adicionais que contêm apenas meios (liberação espontânea, SR) ou uma solução 1% de detergente Triton-X 100 (liberação total, TR) também são preparados. Após 4 horas de incubação a 37 °C, o sobrenadante de cada poço é colhido. O ^{51}Cr liberado é, então, medido com o uso de um contador de partículas gama (Packard Instrument Co., Waltham, Mass.). Cada afecção é realizada em pelo menos triplicata, e a porcentagem de lise é calculada com o uso da fórmula:

% de Lise=(ER-SR)/(TR-SR), em que ER representa o ^{51}Cr médio liberado para cada afecção experimental.

[0288] As tecnologias de imaginologia podem ser usadas para avaliar tráfego específico e proliferação de TFPs em modelos animais que portam tumor. Tais ensaios têm sido descritos, *por exemplo*, em Barrett et al., Human Gene Therapy 22:1575-1586 (2011). Os camundongos NOD/SCID/γc-/- (NSG) são injetados IV com células Nalm-6 (ATCC® CRL-3273™) após 7 dias com células T 4 horas após a eletroporação com os construtos de TFP. As células T são estavelmente transfectadas com um construto lentiviral para expressar a luciferase de vagalume, e camundongos são submetidos à imaginologia para bioluminescência. Alternativamente, a eficácia terapêutica e a especificidade de uma injeção única de células T TFP+ em modelo de xenoenxerto Nalm-6 podem ser medidas como o seguinte: os camundongos NSG são injetados com Nalm-6 transduzido para expressar de modo estável a luciferase de vagalume, seguido por uma injeção de veia caudal única de células T eletroporadas com TFP CD19 7 dias depois. Os animais são submetidos à imaginologia em vários pontos no tempo após a injeção. Por exemplo, os mapas de calor de densidade fotônica de leucemia positiva de luciferase de vagalume em camundongos representativos no dia 5 (2 dias antes do tratamento) e dia 8 (24 horas após PBLs TFP+) podem ser gerados.

[0289] Outros ensaios, incluindo aqueles descritos na seção de Exemplos no presente documento, assim como aqueles que são conhecidos na técnica, também podem ser usados para avaliar os construtos de TFP anti-CD19, anti-BCMA, , anti-CD22, anti-ROR1, anti-PD-1, ou anti-BAFF divulgados no presente documento.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

[0290] São divulgadas no presente documento, em algumas modalidades, as composições farmacêuticas que compreendem: (a) as células T modificadas da divulgação; e (b) um carreador farmaceuticamente aceitável. Tais composições podem compreender tampões, como solução salina tamponada neutra, solução salina tamponada de fosfato e semelhantes; carboidratos, como glicose, manose,

sacarose ou dextranos, manitol; proteínas; polipeptídeos ou aminoácidos, como glicina; antioxidantes; agentes quelantes, como EDTA ou glutationa; adjuvantes (*por exemplo*, hidróxido de alumínio); e conservantes. As composições da presente divulgação são, num aspecto, formuladas para administração intravenosa.

[0291] As composições farmacêuticas da presente divulgação podem ser administradas de maneira apropriada para a doença a ser tratada (ou prevenida). A quantidade e a frequência de administração serão determinadas por tais fatores, como a afecção do paciente, e o tipo e a severidade da doença do paciente, embora as dosagens apropriadas possam ser determinadas por testes clínicos.

[0292] Numa modalidade, a composição farmacêutica é substancialmente livre de, *por exemplo*, não há níveis detectáveis de um contaminante, *por exemplo*, selecionado do grupo que consiste em endotoxina, micoplasma, lentivírus competente de replicação (RCL), p24, ácido nucleico VSV-G, HIV gag, esferas revestidas anti-CD3/anti-CD28 residuais, anticorpos de camundongo, soro humano agrupado, albumina sérica bovina, soro bovino, componentes de meios de cultura, célula de empacotamento de vetor ou componentes de plasmídeo, uma bactéria e um fungo. Numa modalidade, a bactéria é pelo menos uma selecionada do grupo que consiste em *Alcaligenes faecalis, Candida albicans, Escherichia coli, Haemophilus influenza, Neisseria meningitides, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumonia*, e *Streptococcus pyogenes* grupo A.

[0293] Quando “uma quantidade imunologicamente eficaz,” “uma quantidade eficaz antitumoral”, “uma quantidade eficaz inibitória de tumor” ou “quantidade terapêutica” é indicada, a quantidade precisa das composições da presente divulgação a ser administrada pode ser determinada por um médico com a consideração de diferenças individuais em idade, peso, tamanho de tumor, extensão de infecção ou metástase e afecção do paciente (sujeito). Pode ser geralmente declarado que uma composição farmacêutica que compreende as células T descritas no presente documento pode ser administrada numa dosagem

de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, em alguns casos, 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluindo todos os valores de número inteiro nestas faixas. As composições de célula T também podem ser administradas múltiplas vezes nestas dosagens. As células podem ser administradas usando-se técnicas de infusão que são comumente conhecidas em imunoterapia (consultar, *por exemplo*, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

[0294] Em certos aspectos, pode ser desejável administrar células T ativadas para um sujeito e, então, recoletar subsequentemente o sangue (ou ter uma aferese realizada), ativar células T do mesmo de acordo com a presente divulgação, e reinfundir o paciente com estas células T ativadas e expandidas. Este processo pode ser executado múltiplas vezes a cada duas semanas. Em certos aspectos, as células T podem ser ativadas de coletas de sangue de 10 cc a 400 cc. Em certos aspectos, as células T são ativadas de coletas de sangue de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc, ou 100 cc.

[0295] A administração das presentes composições pode ser executada de qualquer maneira conveniente, incluindo por inalação de aerossol, injeção, ingestão, transfusão, implantação ou transplante. As composições descritas no presente documento podem ser administradas a um paciente de modo transarterial, subcutâneo, intradérmico, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, por injeção intravenosa (i.v.) ou de modo intraperitoneal. Num aspecto, as composições de célula T da presente divulgação são administradas a um paciente por injeção intradérmica ou subcutânea. Num aspecto, as composições de célula T da presente divulgação são administradas por injeção i.v. As composições de células T podem ser injetadas diretamente num tumor, linfonodo ou sítio de infecção.

[0296] Num aspecto exemplificativo particular, os sujeitos podem ser submetidos à leucaferese, em que leucócitos são coletados, enriquecidos ou depletados *ex vivo* para selecionar e/ou isolar as células de interesse, *por exemplo*, células T. Estes isolados de célula T podem ser expandidos por métodos conhecidos na técnica e tratados de modo que um ou mais construtos de TFP da

presente divulgação possam ser introduzidos, assim criando uma célula T-T modificada da presente divulgação. Os sujeitos que necessitam do mesmo podem ser subsequentemente submetidos ao tratamento padrão com quimioterapia de alta dose seguida por transplante de célula-tronco sanguínea periférica. Em certos aspectos, após ou concomitante com o transplante, os sujeitos recebem uma infusão das células T modificadas expandidas da presente divulgação. Num aspecto adicional, as células expandidas são administradas antes ou após a cirurgia.

[0297] A dosagem dos tratamentos acima a serem administrados a um paciente variarão com a natureza precisa da afecção em tratamento e o recipiente do tratamento. A escala de dosagens para administração humana pode ser realizada de acordo com práticas aceitadas pela técnica. A dose para alemtuzumab, por exemplo, estará geralmente na faixa de 1 a cerca de 100 mg para um paciente adulto, usualmente administrada diariamente por um período entre 1 e 30 dias. A dose diária preferencial é 1 a 10 mg por dia, embora, em alguns casos, doses maiores de até 40 mg por dia podem ser usadas (descrito na Patente nº U.S. 6.120.766).

[0298] Numa modalidade, a TFP é introduzida em células T, *por exemplo*, com o uso de transcrição *in vitro*, e o sujeito (*por exemplo*, humano) recebe uma administração inicial de células T TFP da presente divulgação, e uma ou mais administrações subsequentes das células T TFP da presente divulgação, em que a uma ou mais administrações subsequentes são administradas em menos do que 15 dias, *por exemplo*, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, ou 2 dias após a administração anterior. Numa modalidade, mais que uma administração das células T TFP da presente divulgação é administrada ao sujeito (*por exemplo*, humano) por semana, *por exemplo*, 2, 3, ou 4 administrações das células T TFP da presente divulgação são administradas por semana. Numa modalidade, o sujeito (*por exemplo*, sujeito humano) recebe mais que uma administração das células T TFP por semana (*por exemplo*, 2, 3 ou 4 administrações por semana) (também

denominado no presente documento como um ciclo), após uma semana de nenhuma administração de células T TFP, e, então, uma ou mais administrações adicionais das células T TFP (*por exemplo*, mais que uma administração das células T TFP por semana) são administradas ao sujeito. Em outra modalidade, o sujeito (*por exemplo*, sujeito humano) recebe mais que um ciclo de células T TFP, e o tempo entre cada ciclo é menos do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, ou 3 dias. Numa modalidade, as células T TFP são administradas dia sim, dia não por 3 administrações por semana. Numa modalidade, as células T TFP da presente divulgação são administradas por pelo menos duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito ou mais semanas.

[0299] Num aspecto, as células T TFP CD19 são geradas com o uso de vetores virais lentivirais, como lentivírus. As células T de TFP geradas desta maneira terão expressão de TFP estável.

[0300] Num aspecto, as células T TFP expressam de modo transiente vetores de TFP por 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 dias após a transdução. A expressão transiente de TFPs pode ser efetuada por administração de vetor de TFP de RNA. Num aspecto, o RNA de TFP é transduzido na célula T por eletroporação.

[0301] Um problema potencial que pode surgir em pacientes com tratamento com o uso de células T TFP que expressam de modo transiente (particularmente com células T TFP que portam scFv murino) é anafilaxia após os múltiplos tratamentos.

[0302] Sem se atrelar a esta teoria, acredita-se que tal resposta anafilática pode ser causada por um paciente que desenvolve uma resposta anti-TFP humoral, isto é, anticorpos anti-TFP que têm um isotipo anti-IgE. Considera-se que as células de produção de anticorpos de um paciente são submetidas a uma troca de classe de isotipo de IgG (isto não causa anafilaxia) ao isotipo de IgE quando há uma pausa de dez a catorze dias na exposição ao antígeno.

[0303] Se um paciente tem alto risco de gerar uma resposta de anticorpo anti-TFP durante o curso de terapia de TFP transiente (como aquela gerada por

transduções de RNA), as quebras de infusão de célula T TFP não devem durar mais que dez a catorze dias.

MÉTODOS PARA PRODUZIR CÉLULAS T MODIFICADAS

[0304] São divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os métodos para produzir a célula T modificada da divulgação, em que o método compreende (a) interromper um gene de TCR endógeno que codifica uma cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, uma cadeia de TCR gama, uma cadeia de TCR delta, ou qualquer combinação das mesmas; produzindo, assim, uma célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno; e (b) transduzir a célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno com o ácido nucleico recombinante da divulgação, ou os vetores divulgados no presente documento. Em alguns casos, a ruptura compreende transduzir a célula T com uma proteína de nuclease ou uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma proteína de nuclease que alveja o gene endógeno que codifica uma cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, ou uma cadeia de TCR alfa e uma cadeia de TCR beta.

[0305] São adicionalmente divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os métodos para produzir a célula T modificada da divulgação, o método que compreende transduzir a célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno com o ácido nucleico recombinante divulgado no presente documento, ou os vetores divulgados no presente documento. Em alguns casos, a célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno é uma célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno que codifica uma cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, ou uma cadeia de TCR alfa e uma cadeia de TCR beta.

[0306] Em alguns casos, a célula T é uma célula T humana. Em alguns casos, a célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno tem ligação reduzida ao complexo de MHC-peptídeo em comparação com àquela de uma célula T de controle não modificada.

[0307] Em alguns casos, a nuclease é uma meganuclease, uma nuclease de dedo de zinco (ZFN), uma nuclease efetora do tipo ativador de transcrição (TALEN), uma CRISPR/Cas nuclease, CRISPR/Cas nickase ou uma megaTAL nuclease. Em alguns casos, a sequência compreendida pelo ácido nucleico recombinante ou pelo vetor é inserida no gene de subunidade de TCR endógeno no sítio de clivagem, e em que a inserção da sequência no gene de subunidade de TCR endógeno interrompe funcionalmente a subunidade de TCR endógeno. Em alguns casos, a nuclease é uma meganuclease. Em alguns casos, a meganuclease compreende uma primeira subunidade e uma segunda subunidade, em que a primeira subunidade se liga a um primeiro meio-sítio de reconhecimento da sequência de reconhecimento, e em que a segunda subunidade se liga a um segundo meio-sítio de reconhecimento da sequência de reconhecimento. Em alguns casos, a meganuclease é uma meganuclease de cadeia única que compreende um ligante, em que o ligante une de modo covalente a primeira subunidade e a segunda subunidade.

TECNOLOGIAS DE EDIÇÃO DE GENES

[0308] Em algumas modalidades, as células T modificadas divulgadas no presente documento são manipuladas com o uso de uma técnica de edição de gene, como repetições palindrômicas curtas regularmente intercaladas agrupadas (CRISPR®, consultar, por exemplo, Patente nº U.S. 8.697.359), nucleases (TALENs, consultar, por exemplo, Patente Nº U.S. 9.393.257) de efetor de tipo ativador de transcrição (TALE), meganucleases (endodesoxirribonucleases que têm grandes sítios de reconhecimento que compreendem sequências de DNA de fita dupla de 12 a 40 pares de bases), nuclease de dedo de zinco (ZFN, consultar, por exemplo, Urnov et al., Nat. Rev. Genetics (2010) v11, 636-646), ou métodos de megaTAL nucleases (uma proteína de fusão de uma meganuclease para repetições de TAL). Desta maneira, um construto quimérico pode ser manipulado para combinar características desejáveis de cada subunidade, como conformação ou capacidades de sinalização. Também consultar Sander & Joung, Nat. Biotech.

(2014) v32, 347-355; e June et al., 2009 Nature Reviews Immunol. 9.10: 704-716, cada um incorporado ao presente documento a título de referência. Em algumas modalidades, um ou mais dentre o domínio extracelular, o domínio transmembranar, ou o domínio citoplásmico de uma subunidade de TFP são manipulados para ter aspectos de mais que um domínio de subunidade de TCR natural (isto é, são quiméricos).

[0309] Os desenvolvimentos recentes de tecnologias para alterar permanentemente o genoma humano e para introduzir modificações de genoma específicas de sítio em genes relevantes de doença constituem a base para aplicações terapêuticas. Estas tecnologias são agora comumente conhecidas como “edição de genoma”.

[0310] Em algumas modalidades, as técnicas de edição de gene são empregadas para perturbar um gene de TCR endógeno. Em algumas modalidades, o gene de TCR endógeno mencionado codifica uma cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta, ou uma cadeia de TCR alfa e uma cadeia de TCR beta. Em algumas modalidades, as técnicas de edição de gene preparam o caminho para edição genômica de multiplexação, o que permite a ruptura simultânea de múltiplos lóci genômicos em gene de TCR endógeno. Em algumas modalidades, as técnicas de edição genômica de multiplexação são aplicadas para gerar células T interrompidas por gene que são deficientes na expressão de TCR endógeno, e/ou antígenos de leucócito humano (HLAs), e/ou proteína de morte de célula programada 1 (PD1), e/ou outros genes.

[0311] As tecnologias de edição de gene atuais compreendem meganucleases, nucleases de dedo de zinco (ZFN), as nucleases de efetor de TAL (TALEN), e repetições palindrômicas curtas regularmente intercaladas agrupadas (CRISPR)/sistema associado a CRISPR (Cas). Estas quatro classes principais de técnicas de edição de gene compartilham um modo comum de ação em ligação de uma sequência definida por usuário de DNA e que media uma quebra de DNA de fita dupla (DSB). DSB pode ser, então, reparada por união de extremidade não

homóloga (NHEJ) ou –quando o DNA de doador está presente- recombinação homóloga (HR), um evento que introduz a sequência homóloga de um fragmento de DNA doador. Adicionalmente, as nucleases de nickase geram quebras de DNA de fita simples (SSB). DSBs podem ser reparadas por incorporação de DNA de fita simples (ssDI) ou reparo de modelo de modelo fita simples (ssTR), um evento que introduz a sequência homóloga de um DNA doador.

[0312] A modificação genética de DNA genômico pode ser realizada com o uso de endonucleases de corte raro sítio-específicas que são manipuladas para reconhecer sequências de DNA no lócus de interesse. Os métodos para produzir endonucleases sítio-específicas manipuladas são conhecidos na técnica. Por exemplo, nucleases de dedo de zinco (ZFNs) podem ser manipulados para reconhecer e cortar sítios predeterminados num genoma. ZFNs são proteínas quiméricas que compreendem um domínio de ligação de DNA de dedo de zinco fundido ao domínio de nuclease da enzima de restrição FokI. O domínio de dedo de zinco pode ser reprojetado através de meios racionais ou experimentais para produzir uma proteína que se liga a uma sequência de DNA predeterminada de 18 pares de base em comprimento. Fundindo-se este domínio de proteína manipulado à FokI nuclease, é possível alvejar as quebras de DNA com especificidade de nível de genoma. ZFNs foram usados extensivamente para alvejar a adição, a remoção e a substituição de gene numa ampla faixa de organismos eucarióticos (revisados em Durai et al. (2005), Nucleic Acids Res 33, 5978). De modo semelhante, as nucleases de efetor de TAL (TALENs) podem ser geradas para clivar sítios específicos em DNA genômico. Como um ZFN, uma TALEN compreende um domínio de ligação de DNA sítio específico manipulado fundido ao domínio de FokI nuclease (revisado em Mak et al. (2013), Curr Opin Struct Biol. 23:93-99). Entretanto, neste caso, o domínio de ligação de DNA compreende um arranjo em tandem de domínios de efetor de TAL, em que cada um reconhece especificamente um par de bases de DNA único. Os TALENs compactos têm uma arquitetura de endonuclease alternativa que evita a necessidade por dimerização (Beurdeley et

al. (2013), Nat Commun. 4: 1762). Uma TALEN compacta compreende um domínio de ligação de DNA de efetor de TAL sítio-específico manipulado fundido ao domínio de nuclease da I-TevI endonuclease de migração. Diferente de FokI, I-TevI não precisa dimerizar para produzir uma quebra de DNA de fita dupla para que uma TALEN compacta seja funcional como um monômero.

[0313] As endonucleases manipuladas com base no sistema CRISPR/Cas9 também são conhecidas na técnica (Ran et al. (2013), Nat Protoc. 8:2281-2308; Mali et al. (2013), Nat Methods 10:957-963). A tecnologia de edição de gene CRISPR é composta de uma proteína de endonuclease cuja especificidade de alvejamento de DNA e atividade de corte podem ser programadas por um RNA-guia curto ou um duplex crRNA/TracrRNA. Uma CRISPR endonuclease compreende dois componentes: (1) uma nuclease de efetor de caspase, Cas9 tipicamente microbiana; e (2) um “RNA-guia" curto ou um duplex de RNA que compreende uma sequência de alvejamento de 18 a 20 nucleotídeos que direciona a nuclease a uma localização de interesse no genoma. Expressando-se múltiplos RNAs guia na mesma célula, em que cada uma tem uma sequência de alvejamento diferente, é possível alvejar quebras de DNA simultaneamente para múltiplos sítios no genoma (edição genômica de multiplexação).

[0314] Há duas classes de sistemas CRISPR conhecidas na técnica (Adli (2018) Nat. Commun. 9:1911), em que cada uma contém múltiplos tipos de CRISPR. A classe 1 contém sistemas de CRISPR tipo I e tipo III que são comumente encontrados em Archaea. E a classe II contém sistemas de CRISPR de tipos II, IV, V, e VI. Embora o sistema CRISPR/Cas mais amplamente usado seja o sistema de CRISPR-Cas9 de tipo II, os sistemas de CRISPR/Cas foram redirecionados por pesquisadores para edição de genoma. Mais do que 10 proteínas de CRISPR/Cas diferentes foram remodeladas nos últimos anos (Adli (2018) Nat. Commun. 9:1911). Entre as mesmas, tais proteínas Cas12a (Cpf1) de Acidaminococcus sp (AsCpf1) e Lachnospiraceae bacterium (LbCpf1) são particularmente interessantes.

[0315] As endonucleases de migração são um grupo de nucleases de ocorrência natural que reconhecem sítios de clivagem de 15 a 40 pares de base comumente encontrados nos genomas de plantas e fungos. As mesmas são frequentemente associadas a elementos de DNA parasíticos, como íntrons e inteínas de auto-splicing de grupo 1. As mesmas promovem naturalmente a recombinação homóloga ou inserção de gene em localizações específicas no genoma hospedeiro produzindo-se uma quebra de fita dupla no cromossomo, as quais recrutam a maquinaria de reparo de DNA celular (Stoddard (2006), Q. Rev. Biophys. 38: 49-95). Subestações de aminoácido específicas podem reprogramar a especificidade de clivagem de DNA de nucleases de migração (Niyonzima (2017), Protein Eng Des Sel. 30(7): 503–522). Meganucleases (MN) são proteínas monoméricas com atividade de nuclease inata que são derivadas de endonucleases de migração bacterianas e manipuladas para um sítio-alvo único (Gersbach (2016), Molecular Therapy. 24: 430–446). Em algumas modalidades, meganuclease é endonuclease de migração I-CreI manipulada. Em outras modalidades, a meganuclease é endonuclease de migração I-SceI manipulada.

[0316] Além das quatro tecnologias de edição de gene principais, as proteínas quiméricas que compreendem fusões de meganucleases, ZFNs, e TALENs foram manipuladas para gerar enzimas monoméricas inovadoras que tomam vantagem da afinidade de ligação de ZFNs e TALENs e a especificidade de clivagem de meganucleases (Gersbach (2016), Molecular Therapy. 24: 430–446). Por exemplo, uma megaTAL é uma proteína quimérica única, que é a combinação dos domínios de ligação de DNA fáceis de personalizar de TALENs com a alta eficácia de clivagem de meganucleases.

[0317] A fim de realizar a técnica de edição de gene, as nucleases, e no caso do sistema CRISPR/ Cas9, um gRNA, deve ser entregue de modo eficaz às células de interesse. Os métodos de administração, como métodos físicos, químicos e virais também são conhecidos na técnica (Mali (2013). Indian J. Hum. Genet. 19: 3-8.). Em alguns casos, os métodos de administração física podem ser selecionados

dos métodos, mas sem limitação, eletroporação, microinjeção, ou uso de partículas balísticas. Por outro lado, os métodos de administração química necessitam do uso de moléculas complexas, como fosfato de cálcio, lipídio, ou proteína. Em algumas modalidades, os métodos de administração viral são aplicados para técnicas de edição de gene com o uso de vírus como, mas sem limitação, adenovírus, lentivírus, e retrovírus.

MÉTODOS PARA TRATAMENTO

[0318] São divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os métodos para tratar câncer num sujeito que precisa do mesmo, em que o método compreende administrar ao sujeito uma quantidade terapeuticamente eficaz das composições farmacêuticas divulgadas no presente documento. São adicionalmente divulgados no presente documento, em algumas modalidades, os métodos para tratar câncer num sujeito que precisa do mesmo, em que o método compreende administrar ao sujeito uma composição farmacêutica que compreende (a) uma célula T modificada produzida de acordo com os métodos divulgados no presente documento; e (b) um carreador farmaceuticamente aceitável.

[0319] Em alguns casos, a célula T modificada é uma célula T alogênica. Em alguns casos, menos citocinas são liberadas no sujeito em comparação com um sujeito administrado com uma quantidade eficaz de uma célula T de controle não modificada. Em alguns casos, menos citocinas são liberadas no sujeito em comparação com um sujeito administrado com uma quantidade eficaz de uma célula T modificada que compreende o ácido nucleico recombinante divulgado no presente documento, ou o vetor divulgado no presente documento.

[0320] Em alguns casos, o método compreende administrar a composição farmacêutica em combinação com um agente que aumenta a eficácia da composição farmacêutica. Em alguns casos, o método compreende administrar a composição farmacêutica em combinação com um agente que melhora um ou mais efeitos colaterais associados à composição farmacêutica.

[0321] Em alguns casos, o câncer é um câncer sólido, um linfoma ou uma

leucemia. Em alguns casos, o câncer é selecionado do grupo que consiste em carcinoma de célula renal, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer cervical, câncer de cérebro, câncer de fígado, câncer pancreático, câncer de rim e estômago.

[0322] A presente divulgação inclui um tipo de terapia celular em que as células T são geneticamente modificadas para expressar uma TFP e um domínio constante de TCR alfa e/ou beta e a célula T modificada é infundida a um recipiente que necessita do mesmo. A célula infundida pode exterminar células tumorais no recipiente. Diferente de terapias de anticorpo, as células T modificadas podem replicar *in vivo* em persistência a longo prazo que pode levar ao controle de tumor sustentado. Em vários aspectos, as células T administradas ao paciente, ou sua progênie, persistem no paciente por pelo menos quatro meses, cinco meses, seis meses, sete meses, oito meses, nove meses, dez meses, onze meses, doze meses, treze meses, catorze meses, quinze meses, dezesseis meses, dezessete meses, dezoito meses, dezenove meses, vinte meses, vinte e um meses, vinte e dois meses, vinte e três meses, dois anos, três anos, quatro anos, ou cinco anos após a administração da célula T ao paciente.

[0323] A presente divulgação também inclui um tipo de terapia celular em que as células T são modificadas, *por exemplo*, por RNA transcrito *in vitro*, para expressar de modo transiente uma TFP e um domínio constante de TCR alfa e/ou beta e a célula T modificada é infundida a um recipiente que necessita do mesmo. A célula infundida pode exterminar células tumorais no recipiente. Deste modo, em vários aspectos, as células T administradas ao paciente, estão presentes por menos do que um mês, *por exemplo*, três semanas, duas semanas, ou uma semana, após a administração da célula T ao paciente.

[0324] Sem se atrelar a qualquer teoria particular, a resposta de imunidade antitumoral elicitada pelas células T modificadas pode ser uma resposta imunológica ativa ou passiva, ou alternativamente devido a uma resposta imunológica direta vs indireta.

[0325] Num aspecto, as células T humanas modificadas da divulgação podem ser um tipo de vacina para terapia de imunização *ex vivo* e/ou *in vivo* num mamífero. Em um aspecto, o mamífero é um ser humano.

[0326] Em relação à imunização *ex vivo*, pelo menos um dos seguintes ocorre *in vitro* antes da administração da célula num mamífero: i) expansão das células, ii) introduzir um ácido nucleico que codifica uma TFP e um domínio constante de TCR alfa e/ou beta às células ou iii) criopreservação das células.

[0327] *Os procedimentos ex vivo* são bem conhecidos na técnica e são discutidos mais completamente abaixo. Brevemente, as células são isoladas de um mamífero (*por exemplo*, um ser humano) e geneticamente modificadas (isto é, transduzidas ou transfectadas *in vitro*) com um vetor divulgado no presente documento. A célula T modificada pode ser administrada a um recipiente mamífero para fornecer um benefício terapêutico. O recipiente mamífero pode ser um humano e a célula modificada pode ser autóloga em relação ao recipiente. Alternativamente, as células pode ser alogênicas, singênicas ou xenogênicas em relação ao recipiente.

[0328] O procedimento para a expansão *ex vivo* de células progenitoras e tronco hematopoiéticas é descrito na Patente nº U.S. 5.199.942, incorporado ao presente documento, a título de referência, pode ser aplicado às células da presente divulgação. Outros métodos adequados são conhecidos na técnica, portanto, a presente divulgação não é limitada a qualquer método particular de expansão *ex vivo* das células. Brevemente, a cultura *ex vivo* e a expansão de células T compreende: (1) coletar células progenitoras e tronco hematopoiéticas CD34+ de um mamífero de colheita de sangue periférica ou explantes de medula óssea; e (2) expandir tais células *ex vivo*. Além dos fatores de crescimento celular descritos na Patente nº U.S. 5.199.942, outros fatores, como ligante de flt3-L, IL-1, IL-3 e c-kit, pode ser usado para cultivo e a expansão das células.

[0329] Além do uso de uma vacina à base de células em termos de imunização *ex vivo*, a presente divulgação também fornece composições e

métodos para imunização *in vivo* para elicitar uma resposta imunológica direcionada a um antígeno num paciente.

[0330] Em geral, as células ativadas e expandidas conforme descrito no presente documento podem ser utilizadas no tratamento e na prevenção de doenças que surgem em indivíduos que são imunocomprometidos.

[0331] As células T modificadas da presente divulgação podem ser administradas sozinhas, ou como uma composição farmacêutica em combinação com diluentes e/ou com outros componentes, como IL-2 ou outras citocinas ou populações de células.

TERAPIAS DE COMBINAÇÃO

[0332] Uma célula T modificada descrita no presente documento pode ser usada em combinação com outros agentes e terapias conhecidos. Administrado "em combinação", conforme usado no presente documento, significa que dois (ou mais) tratamentos diferentes são entregues ao sujeito durante o curso da aflição do sujeito com o distúrbio, *por exemplo*, os dois ou mais tratamentos são entregues após o sujeito ter sido diagnosticado com o distúrbio e antes do distúrbio ter sido curado ou eliminado ou o tratamento ter cessado por outras razões. Em algumas modalidades, a administração de um tratamento que ainda ocorre quando a administração do segundo começa, de modo que haja sobreposição em termos de administração. Isto é algumas vezes denominado no presente documento como "administração simultânea" ou "concomitante". Em outras modalidades, a administração de um tratamento termina antes da administração do outro tratamento começar. Em algumas modalidades de cada caso, o tratamento é mais eficaz devido à administração combinada. Por exemplo, o segundo tratamento é mais eficaz, *por exemplo*, um efeito equivalente é visto com menos do segundo tratamento, ou o segundo tratamento reduz os sintomas por uma extensão maior em relação ao que seria visto se o segundo tratamento fosse administrado na ausência do primeiro tratamento ou a situação análoga fosse vista com o primeiro tratamento. Em algumas modalidades, a administração é tal que a redução num

sintoma, ou outro parâmetro relacionado ao distúrbio é maior em relação ao que seria observado com um tratamento administrado na ausência do outro. O efeito dos dois tratamentos pode ser parcialmente aditivo, inteiramente aditivo ou maior do que aditivo. A administração pode ser tal que um efeito do primeiro tratamento entregue ainda é detectável quando o segundo é entregue.

[0333] Em algumas modalidades, o “pelo menos um agente terapêutico adicional” inclui uma célula T modificada. Também são fornecidas células T que expressam múltiplas TFPs, que se ligam a antígenos-alvo iguais ou diferentes, ou epítopos iguais ou diferentes no mesmo antígeno-alvo. Também são fornecidas populações de células T em que um primeiro subconjunto de células T expressa uma primeira TFP e um domínio constante de TCR alfa e/ou beta e um segundo subconjunto de células T expressa uma segunda TFP e um domínio constante de TCR alfa e/ou beta.

[0334] Uma célula T modificada descrita no presente documento e o pelo menos um agente terapêutico adicional pode ser administrado simultaneamente, na mesma ou em composições separadas, ou sequencialmente. Para administração sequencial, a célula T modificada descrita no presente documento pode ser administrada primeiro, e o agente adicional pode ser administrado em segundo, ou a ordem de administração pode ser invertida.

[0335] Em aspectos adicionais, uma célula T modificada descrita no presente documento pode ser usada num regime de tratamento em combinação com cirurgia, quimioterapia, radiação, agentes imunossupressores, como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato, e FK506, anticorpos, ou outros agentes imunoablativos, como alemtuzumab, anticorpos anti-CD3 ou outras terapias de anticorpo, citoxina, fludarabina, cicloesporina, tacrolimus, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, romidepsina, citocinas, e irradiação. vacina de peptídeo, como aquela descrita em Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971.

[0336] Numa modalidade, o sujeito pode ser administrado com um agente que reduz ou melhora um efeito colateral associado à administração de uma célula

T modificada. Os efeitos colaterais associados à administração de uma célula T modificada incluem, mas sem limitação, síndrome de liberação de citocina (CRS), e linfo-histiocitose hemofagocítica (HLH), também denominada Síndrome de Ativação de Macrófago (MAS). Os sintomas de CRS incluem altas febres, náusea, hipotensão transiente, hipoxia e semelhantes. Consequentemente, os métodos divulgados no presente documento podem compreender administrar uma célula T modificada descrita no presente documento a um sujeito e administrar adicionalmente um agente para gerenciar níveis elevados de um fator solúvel que resulta do tratamento com uma célula T modificada. Numa modalidade, o fator solúvel elevado no sujeito é um ou mais dentre IFN-γ, TNFα, IL-2 e IL-6. Portanto, um agente administrado para tratar este efeito colateral pode ser um agente que neutraliza um ou mais destes fatores solúveis. Tais agentes incluem, mas sem limitação, um esteroide, um inibidor de TNFα, e um inibidor de IL-6. Um exemplo de um inibidor de TNFα é entanercept. Um exemplo de um inibidor de IL-6 é tocilizumab (toc).

[0337] Numa modalidade, o sujeito pode ser administrado com um agente que intensifica a atividade de uma célula T modificada. Por exemplo, numa modalidade, o agente pode ser um agente que inibe uma molécula inibitória. As moléculas inibidoras, *por exemplo*, Morte Progrmada 1 (PD1), podem, em algumas modalidades, diminuir a capacidade de uma célula T modificada para montar uma resposta efetora imunológica. Exemplos de moléculas inibidoras incluem PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 e TGFR beta. A inibição de uma molécula inibitória, *por exemplo*, por inibição no nível de DNA, RNA ou proteína, pode otimizar um desempenho de célula T modificada. EM modalidades, um ácido nucleico inibidor, *por exemplo*, um ácido nucleico inibidor, *por exemplo*, um dsRNA, *por exemplo*, um siRNA ou shRNA, pode ser usado para inibir a expressão de uma molécula inibitória na célula de expressão de TFP. Numa modalidade, o inibidor é um shRNA. Numa modalidade, a molécula inibitória é inibida numa célula T modificada. Nestas modalidades, uma molécula de dsRNA

que inibe a expressão da molécula inibitória é ligada ao ácido nucleico que codifica um componente, *por exemplo*, todos os componentes, da TFP. Numa modalidade, o inibidor de um sinal inibidor pode ser, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a uma molécula inibitória. Por exemplo, o agente pode ser um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga ao PD1, PD-L1, PD-L2 ou CTLA4 (*por exemplo*, ipilimumab (também denominado como MDX-010 e MDX-101, e comercializado como Yervoy®; Bristol-Myers Squibb; Tremelimumab (anticorpo monoclonal de IgG2 disponível de Pfizer, anteriormente conhecido como ticilimumab, CP-675,206)). Numa modalidade, o agente é um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a TIM3. Numa modalidade, o agente é um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a LAG3.

[0338] Em algumas modalidades, o agente que intensifica a atividade de uma célula T modificada pode ser, *por exemplo*, uma proteína de fusão que compreende um primeiro domínio e um segundo domínio, em que o primeiro domínio é uma molécula inibitória, ou fragmento da mesma, e o segundo domínio é um polipeptídeo que é associado a um sinal positivo, *por exemplo*, um polipeptídeo que compreende um domínio de sinalização intracelular conforme descrito no presente documento. Em algumas modalidades, o polipeptídeo que é associado a um sinal positivo pode incluir um domínio coestimulatório de CD28, CD27, ICOS, *por exemplo*, um domínio de sinalização intracelular de CD28, CD27 e/ou ICOS, e/ou um domínio de sinalização primário, *por exemplo*, de CD3 zeta, *por exemplo*, descrito no presente documento. Numa modalidade, a proteína de fusão é expressa pela mesma célula que expressou a TFP. Em outra modalidade, a proteína de fusão é expressa por uma célula, *por exemplo*, uma célula T que não expressa uma TFP anti-CD19.

EXEMPLOS

[0339] A invenção é adicionalmente descrita em detalhes a título de referência aos exemplos experimentais a seguir. Estes exemplos são fornecidos apenas com propósitos de ilustração, e não são destinados a serem limitantes a

menos que especificado de outro modo. Deste modo, a invenção não deve ser interpretada de modo algum como limitada aos seguintes exemplos, mas em vez disto, deve ser interpretada como abrangendo quaisquer e todas as variações que se tornam evidentes como resultado do ensinamento fornecido no presente documento. Sem descrição adicional, acredita-se que o indivíduo de habilidade comum na técnica pode, com o uso da descrição anterior e dos exemplos ilustrativos a seguir, produzir e utilizar os compostos da presente invenção e praticar os métodos reivindicados. Os exemplos de trabalho a seguir apontam especificamente vários aspectos da presente invenção, e não devem ser interpretados como limitantes de qualquer maneira no restante da divulgação.

FUNDAMENTOS PARA OS EXEMPLOS 1 A 5

[0340] Os receptores de célula T (TCRs) reconhecem antígenos estranhos que foram processados como peptídeos pequenos e ligados às moléculas de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) na superfície de células que apresentam antígenos (APCs). O complexo de receptor de célula T (TCR) é formado por um agrupamento de dímeros, incluindo: subunidades alfa e beta de receptor de célula T (TCRα/β) ou subunidades gama e delta (TCRγδ); e dímeros CD3 CD3γ/ε, CD3δ/ε, e CD3ζ/ζ. Os genes constantes alfa de receptor de célula T (TRAC) e constantes beta de receptor de célula T (TRBC) codificam a região C-terminal constante de TCRα e TCRβ, respectivamente.

[0341] A ruptura da região constante de TCR (regiões constantes de TCR) bloqueia a translocação de TCRα ou TCRβ para a superfície celular, inibindo, deste modo, a montagem do complexo de receptor de TCR. Prejudicar a translocação de TCRα ou TCRβ é o suficiente para inibir a montagem de receptor de TCR inteiro. A desativação do complexo de TCR pode, portanto, ser feita alvejando-se os genes TRAC ou TRBC com um método de edição de gene com o uso de método de repetição palindrômica curta regularmente intercalada agrupada (CRISPR), nucleases de efetor de tipo ativador de transcrição (TALENs), nucleases de dedo de zinco ou meganucleases. Entretanto, as células T TFP com base em proteínas

de fusão de CD3ε ou CD3γ ou CD3δ necessitam de expressão de superfície de TCR α/β para incorporar num complexo de TCR funcional.

[0342] A ativação do complexo de TCR na superfície de células T doadoras por antígenos receptores (isto é, o reconhecimento de antígenos apresentados pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC) em células que apresentam antígeno) pode acionar efeitos indesejáveis, como doença de enxerto versus hospedeiro (GvHD) e síndrome de liberação de citocina (CRS). Deste modo, os seguintes Exemplos descrevem métodos para introduzir um transgene em células de knock-out de TCR que codificam uma versão truncada de TCRα ou TCRβ, e a proteína de fusão em si separada por um sinal de autoclivagem (por exemplo, T2A). Numa modalidade, a versão truncada de TCRα ou TCRβ inclui o domínio transmembranar e o domínio de peptídeo de conexão (CP) de TCRα ou TCRβ. Em outra modalidade, o domínio de ligação ao antígeno de TFP é fundido na extremidade N-terminal do comprimento truncado ou completo TCRα e/ou TCRβ.

EXEMPLO 1. PROJETO DE crRNA (RNA DE CRISPR)

[0343] crRNAs para desativar TRA foram projetados com o algoritmo “Dunne 2017” acessível no sítio da web de biblioteca DeskGen™ CRISPR (www.deskgen.com). Quaisquer crRNAs que ligam o lócus de TRA podem gerar de modo eficaz as quebras de fita dupla no gene de TRA. Para minimizar a atividade sem alvo da CRISPR endonuclease, crRNAs usados têm uma pontuação sem alvo de >90%, que compreende pelo menos 3 divergências com a sequência homóloga mais próxima no genoma de Genome Reference Consortium Human versão 38 (GRCh38/hg38). Numa modalidade preferencial, uma divergência está localizada nos 8 bp a montante do motivo adjacente protoespaçador (PAM). As Tabelas 1 a 2 mostram as sequências de crRNA exemplificativas selecionadas para desativar o gene de TRA (Tabela 1) e atividade fora de alvo prevista (Tabela 2).

TABELA 1: crRNAs SELECIONADOS PARA DESATIVAR O GENE DE TRA:

ID	crRNA	PA	Alvo	Localização Genômica	Pontuação

		M			sem alvo (%)
TRAC1-4894	TCTCTCAGCTGGTACACGGC	AGG	TRAC1	chr14: 22547526 - 22547545	94
TRAC2-4598	CTCGACCAGCTTGACATCAC	AGG	TRAC2	chr14: 22549647 - 22549666	98
TRAC3-2998	GATTAAACCCGGCCACTTTC	AGG	TRAC3	chr14: 22550612 - 22550631	98

TABELA 2: SÍTIOS SEM ALVO PREVISTOS; DIVERGÊNCIAS ENTRE COM E SEM ALVO SÃO INDICADAS EM NEGRITO

crRNA	Sem Alvo	PAM	Divergência	Éxon	Localização Genômica
TRAC1 - 4894	TCCCTCAGCTGGTACAAGGA	TGG	3,17,20	Sim	chr1: 186070730 - 186070753
	TCTGTCAACTGGTACATGGC	AAG	4,8,17	Não	chrX: 83244396 - 83244419
	TCTCATAGCTGGTACATGGC	GGG	5,6,17	Não	chr15: 100865579 - 100865602
	TTTCTCAGCTGGTACATGGA	GGG	2,17,20	Não	chr1: 247923608 - 247923631
	GCACTCAGCTGGTACCCGGC	AAG	1,3,16	Não	chr16: 8713603 - 8713626
	TCACTCAGCTGGTACATGGG	CAG	3,17,20	Não	chr4: 130310607 - 130310630
	TCTCCCAGCTGGGACACGGT	GAG	5,13,20	Não	chr1: 55167399 - 55167422
	TCAATCAGCTGGTGCACGGC	TGG	3,4,14	Não	chr1: 236924538 -

					236924561
	TCTCACAGCTGATATACGGC	TGG	5,12,15	Não	chr12: 49641344 - 49641367
TRAC2 - 4598	CTCCACCACCTTGACCTCAC	CGG	4,9,16	Sim	chr10: 102422239 - 102422262
	CTCAACCAGAATGACATCAC	CAG	4,10,11	Não	chr2: 55715822 - 55715845
	CTAGACCAGCTTGACCTCCC	CAG	3,16,19	Não	chr4: 89585943 - 89585966
	CTAGACCAGCTTGGCAACAC	AGG	3,14,17	Não	chr5: 82123725 - 82123748
TRAC3 - 2998	GAATAAAACCGGCCACTTTG	GGG	3,8,20	Não	chr5: 128101267 - 128101290
	GATTATACCTGGCCACATTC	AAG	6,10,17	Não	chr2: 145719958 - 145719981

[0344] crRNAs para desativar TRB foram projetados com algoritmo Dunne 2017 conforme descrito acima. À medida que a região constante de TCRβ é codificada por dois genes, TRBC1 e TRBC2, crRNAs são direcionados a sequências idênticas tanto em TRBC1 quanto em TRBC2. Consequentemente, o escore sem alvo gerado por DeskGen™ é mais baixo do que 94%. Entretanto, além de alvejar TRBC1 e TRBC2, outras sequências homólogas entre crRNAs e o genoma GRCh38/hg38 têm pelo menos 3 divergências. Numa modalidade preferencial, uma destas divergências está localizada no s8 bp a montante do motivo adjacente protoespaçador (PAM). As Tabelas 3 a 4 mostram as sequências de crRNA exemplificativas selecionadas para desativar o gene de TRB (Tabela 3) e atividade fora de alvo prevista (Tabela 4).

TABELA 3: crRNAs SELECIONADOS PARA DESATIVAR O GENE DE

TRB:

ID	crRNA	PAM	Alvo	Localização	Pontuação sem alvo (%)
TRBC-44345	ACACTGGTGTGCCTGGCCAC	AGG	TRBC1	chr7: 142801121 - 142801140	45
			TRBC2	chr7_KI270803v1_alt: 814747 - 814766	
TRBC-45447a	AGGGCGGGCTGCTCCTTGAG	GGG	TRBC1	chr7: 142791879 - 142791898	47
			TRBC2	chr7: 142801226 - 142801245	
TRBC-45246	CTGCCTGAGCAGCCGCCTGA	GGG	TRBC1	chr7: 142791914 - 142791933	46
			TRBC2	chr7: 142801261 - 142801280	
TRBC-45447b	GCGGGGGTTCTGCCAGAAGG	TGG	TRBC1	chr7: 142791946 - 142791965	47
			TRBC2	chr7: 142801293 - 142801312	

TABELA 4: SEM ALVOS PREVISTOS, DIVERGÊNCIAS ENTRE COM E SEM ALVO SÃO INDICADAS EM NEGRITO

crRNA	Sem Alvo	PAM	Divergência	Éxon	Lócus
TRBC-44345	ACTCTGGGCTGCCTGGCCAC	GGG	3,8,9	Sim	chr14: 105601630-105601653
	ACTCTGTTGTGCCTGGACAC	CGG	3,7,17	Sim	chr20: 62963310-62963333
	TCACAGGTGAGCCTGGCCAC	AGG	1,5,10	Não	chr14: 98950719-98950742
	GCACGGGTGGGCCTGGCCAC	TGG	1,5,10	Não	chr12: 108839394-108839417
	GCAGGGGTGTGCCTGGCCAC	TGG	1,4,5	Não	chr16: 3010877-3010900
	ATCCTGCTGTGCCTGGCCAC	AGG	2,3,7	Não	chr6: 37655368-37655391

	TCTCTGGTGTGCCTGGCCAA	GAG	1,3,20	Não	chrX: 138046658-138046681
	ACACATGTGGGCCTGGCCAC	GGG	5,6,10	Não	chr16: 2438272-2438295
	AGCCTGGTGTGTCTGGCCAC	TGG	2,3,12	Não	chr2: 162055950-162055973
	CCTCTGGTGTGCCTGGCCCC	AGG	1,3,19	Não	chr2: 239228091-239228114
	CCACTTGTGTGCATGGCCAC	TAG	1,6,13	Não	chr1: 101657244-101657267
	ATAATGGTGTGCCTGGCAAC	TAG	2,4,18	Não	chr1: 230924183-230924206
	ACACTGGCCTGCCTGGGCAC	TAG	8,9,17	Não	chr1: 155926881-155926904
TRBC-45447a	AGCGCGGGCTCCTCCTTGAC	GGG	3,11,20	Sim	chr8: 143598506-143598529
	AGGGCCTGCTGCTCCTTCAG	CAG	6,7,18	Sim	chr3: 45030894-45030917
	AGGGCTGACAGCTCCTTGAG	TGG	6,8,10	Não	chr20: 683139-683162
	GGGGTGGGCTGCTCCTGGAG	CAG	1,5,17	Não	chr20: 63440195-63440218
	AGAGCGGCCTGCTCCTCGAG	GGG	3,8,17	Não	chr17: 50124057-50124080
	GGGGTGGGCTGCACCTTGAG	GGG	1,5,13	Não	chr12: 3189255-3189278
	AAGGCAGGCTCCTCCTTGAG	AGG	2,6,11	Não	chr5: 176733401-176733424
	AGGAAGGGCTGCTCTTTGAG	GAG	4,5,15	Não	chr10: 100783415-100783438
	AGGCTGGGCTGCTCTTTGAG	CAG	4,5,15	Não	chr1: 226617392-226617415
	AGTGCCGGCTGCTCCTGGAG	TGG	3,6,17	Não	chr15: 74624787-74624810
	AGGGTGGGGTGCTCCTCGAG	GGG	5,9,17	Não	chr7: 99165433-99165456
	TGGGCTGGCTGCACCTTGAG	TAG	1,6,13	Não	chr12: 92396203-92396226
	TGGGCGGGCTG	GAG	1,12,19	Não	chr5: 179287136-

	TTCCTTGGG				179287159
TRBC-45246	CTTCCTGAGCAGCCGTCTGC	AGG	3,16,20	Sim	chr5: 177525051-177525074
	CTGCCTGAGCAGCTGCCACA	AGG	14,18,19	Sim	chr21: 42085445-42085468
	CAGCGTTAGCAGCCGCCTGA	GGG	2,5,7	Não	chr6: 24719514-24719537
	CACCCAGAGCAGCCGCCTGA	CAG	2,3,6	Não	chr8: 58226030-58226053
	CTGCCTGGGAAGCCGCCTGC	CAG	8,10,20	Não	chr1: 41873106-41873129
	CTGCCTCCTCAGCCGCCTGA	GGG	7,8,9	Não	chr15: 89663036-89663059
	CTGTCTGACCAGCCGCCTGC	CGG	4,9,20	Não	chr1: 9401937-9401960
	CAGCCTGAGCTGCCGCCTGC	GGG	2,11,20	Não	chr17: 36923765-36923788
	CAACCTGAGCAGCCTCCTGA	GAG	2,3,15	Não	chr8: 127075998-127076021
	CTCCCTGATCAGCCGCATGA	GGG	3,9,17	Não	chr20: 63598726-63598749
	CGGCCGGAGCAGCCGCCTCA	GGG	2,6,19	Não	chr1: 204685196-204685219
	CTGCCTCAACATCCGCCTGA	AAG	7,9,12	Não	chrX: 58268037-58268060
TRBC-44547b	GTTGGGATTCTGCCAGAAGG	CAG	2,3,7	Não	chr17: 52505137-52505160
	GAGGGGGGCCTGCCAGAAGG	AGG	2,8,9	Não	chr8: 1547518-1547541
	GCGGAAGATCTGCCAGAAGG	GGG	5,6,8	Não	chr16: 1946717-1946740
	GGTGGGGTTCTGCCAGGAGG	AGG	2,3,17	Não	chr9: 135224974-135224997
	GCGGGGGATGTGCCAGGAGG	AGG	8,10,17	Não	chr11: 62414927-62414950
	GAGGGGATTCTGCCAGCAGG	CGG	2,7,17	Não	chr5: 133192714-133192737
	GAGGGGGTCCTGCCAGCAGG	GAG	2,9,17	Não	chr6: 13415078-13415101

	GAGGGTGTTCTGCCAGCAGG	CAG	2,6,17	Não	chr8: 23039425-23039448
	GCAGGGGTTCAGCCAGGAGG	CAG	3,11,17	Não	chr11: 60938213-60938236
	GAGGGGGTTCAGACAGAAGG	CAG	2,11,13	Não	chr18: 13654430-13654453
	GCAGGGGTTCTCCCAGTAGG	CAG	3,12,17	Não	chr3: 18516713-18516736
	GTGGGGGTTCTGCCAGCAGC	TGG	2,17,20	Não	chr17: 68030673-68030696

EXEMPLO 2: EDIÇÃO DE TCRα OU β ENDÓGENO EM CÉLULAS JURKAT

[0345] A desativação dos genes TRA ou TRB em células Jurkat foi feita por eletroporação de ribonucleoproteínas SpCas9 (RNPs) direcionadas contra a genes de TRA ou TRB. As células foram mantidas a $0,2x10^6$ células por ml em meio RPMI 1640 suplementado com Soro Bovino Fetal 10% (FBS) e L-Glutamina 300mg/L até a eletroporação. As ribonucleoproteínas SpCas9 que alvejam genes TRA ou TRB foram preparadas anelando-se crRNA que alveja TRAC (TRAC2-4598) ou TRBC (TRBC-44345) com tracrRNA numa razão molecular de 1:1. As duplexações aneladas foram misturadas com proteína SpCas9 numa razão molecular de 1,5:1. 0,61 µM de RNPs foram misturados com $2,5x10^6$ células T e eletroporados de acordo com o protocolo do fabricante para o Sistema de Transfecção Neon (ThermoFisher). A eletroporação foi definida em 1600V, 10ms, 3 pulsos. Após o pulso as células foram imediatamente transferidas para o meio aquecido e incubadas a 37℃ por três dias.

[0346] A eficácia de edição foi avaliada observando-se a perda de expressão de superfície de TCRαβ e CD3ε por meio de citometria de fluxo. Os resultados são mostrados na Figura 2 para células editadas de TRA (painel esquerdo) e células editadas de TRB (painel direito). As células Jurkat editadas foram purificadas por meio do sistema de separação de células Classificação Celular Ativada Magnética (MACS, Miltenyi Biotec). As células Jurkat editadas foram negativamente

selecionadas contra o anticorpo anti-TCRαβ IP27 (eBioscience nº 17-9986-42) e anticorpo anti-CD3ε SK7 (eBioscience nº 25-0036-42). As células que expressam TCRαβ ou CD3ε em sua superfície foram imobilizadas para as colunas MACS MS (nº de cat.130-041-301) ou LS (nº de cat.130-041-306), enquanto as células Jurkat editadas, negativas tanto para TCRαβ quanto para CD3ε, foram coletadas na coluna atravessante e mantidas em cultura em $0,4x10^6$ células/ml no meio especificado acima.

EXEMPLO 3. EDIÇÃO DE CÉLULAS T HUMANAS

[0347] Os genes de TRA ou TRB são, então, desativados em células T primárias de um doador humano. Dois a quatro dias antes da eletroporação, as células T foram ativadas com esferas ativadoras de célula T humana Dynabeads® para CD3/CD28 (Gibco nº11132D) numa razão de 1:1 em meios otimizadores CTS (Gibco nº A1022101) complementados com 10% de soro humano (hAB, Valley Biomedical HP1022) e 300 $U.ml^{-1}$ IL2 (Petrotech nº200-02). As ribonucleoproteínas SpCas9 que alvejam genes TRA ou TRB foram preparadas crRNA anelado que alveja TRAC (TRAC2-4598) ou TRBC (TRBC-44345) com tracrRNA numa razão molecular de 1:1. As duplexações aneladas foram misturadas com proteína SpCas9 numa razão molecular de 1,5:1. 0,61 µM de RNPs foram misturados com $2,5x10^6$ células T e eletroporados após o protocolo do fabricante para o Sistema de Transfecção Neon, a eletroporação foi definida em 1600V, 10ms, 3 pulsos. As células foram imediatamente transferidas para o meio aquecido (CTS Optimizer (Gibco nºA1048501) com hAB 10% (Valley Biomedical nºHP1022), 300 $u.ml^{-1}$ IL2(Petrotech nº200-02), 25 $ng.ml^{-1}$ IL7 (R & D System nº 207-IL-010) e incubadas a 37℃ para permitir a expansão de células T editadas com um tempo de duplicação aproximado de 3 a 5 dias. A eficácia de edição foi avaliada medindo-se a perda de expressão de superfície de TCRαβ e CD3ε por meio de citometria de fluxo. As células T editadas foram purificadas com o uso de Classificação Celular Ativada Magnética (MACS®, Miltenyi Biotec) de acordo com o sistema de separação de célula do fabricante e foram negativamente selecionadas contra o anticorpo anti-

TCRαβ IP27 (eBioscience nº14-9986-82) e anticorpos anti-CD3ε SK7 (eBioscience nº16-0036-81). As células que expressam TCRαβ ou CD3ε em sua superfície foram imobilizadas nas colunas MACS MS (nº de cat.130-041-301) ou LS (nº de cat.130-041-306), enquanto as células T editadas, tanto negativas para TCRαβ quanto para CD3ε, foram coletadas na coluna atravessante e mantidas em cultura em 10^6 células/ml no meio especificado acima. Os resultados são mostrados na Figura 3.

EXEMPLO 4: ALOGENICIDADE DE CÉLULAS T NEGATIVAS DE TCR

[0348] As células de knock-out de (KO) TCRαβ foram avaliadas em relação à alogenicidade usando-se um ensaio de reação de linfócitos misturados (MLR). O corante de identificação de éster succinimidílico de carbofluoresceína (CSFE) foi incorporado às células T TCRα e TCRβ KO e as células foram subsequentemente cocultivadas numa razão 1:1 com PBMCs retidas por proliferação (Streck, Inc.) de doadores de HLA (Doadores 1 e 2, respectivamente) convergentes (reação auto) ou divergentes (reação alo) Acetato de forbol miristato (PMA) a 5 ng/ml e ionomicina a 500 ng/ml foi usada como um controle positivo para estímulo de TCR independente. anti-CD3ε ligado a placa também foi usado como um controle indireto para confirmar a falta de receptor de TCR nas células T de knock-out de TCRα e TCRβ. A proliferação de células T doadoras foi monitorada por depleção de CSFE; os níveis basais de proliferação foram medidos após uma incubação de vinte e quatro horas sem estímulo, e os níveis foram medidos novamente após um período de incubação de cinco dias. O corante CSFE dilui pela metade mediante divisão celular e, deste modo, a quantidade de proliferação que ocorreu nas células T foi avaliada e comparada com os controles doadores de HLA correspondidos e não correspondidos. Os resultados são mostrados na Figura 4.

[0349] A expressão de superfície de TCRαβ e CD3ε foi analisada conforme descrito no Exemplo 2 para células T Jurkat (Figuras 9A a 9C) e células T doadoras (Figuras 10A a 10B). Figuras 9A a 9C mostram a expressão de superfície de CD3 vs TCRαβ em células de tipo selvagem (Figura 9A), células TRB KO sem transdução (Figura 9B), células TRB KO com transdução de TFPs de comprimento

completo de TCRβ (FL) (Figura 9C). As portas nos gráficos foram desenhadas como delineando a população negativa-negativa de CD3 e TCRαβ de células e as porcentagens de células restantes em cada quadrante são mostradas nos cantos.

[0350] As Figuras 10A a 10B mostram a expressão de superfície de CD3 vs TCRαβ em células de knockout de TRB transduzidas com um gene de TRBC humano truncado (Figura 10A) e com um gene TRAC-T2A-TRBC murino (Figura 10B). As portas nos gráficos foram desenhadas como delineando a população negativa-negativa de CD3 e TCRαβ de células e as porcentagens de células restantes em cada quadrante são mostradas nos cantos.

EXEMPLO 5: EXPRESSÃO DE PROTEÍNA DE FUSÃO DE RECEPTOR DE CÉLULA T EM CÉLULAS NEGATIVAS DE TCR

[0351] A inativação de TRA ou TRB bloqueia a translocação para a superfície celular de todas as subunidades de TCR. Consequentemente, um transgene de TRA ou TRB exógeno é expresso em células $TRA^{-/-}$ ou $TRB^{-/-}$, respectivamente, para obter uma célula T de TFP funcional.

TRANSDUÇÃO DE CÉLULAS JURKAT

[0352] Os transgenes de TFP foram introduzidos em células Jurkat com o uso de lentivírus, conforme descrito, por exemplo, na Publicação de Patente copendente nº U.S. 2017-0166622. As células Jurkat foram incubadas com vírus a uma multiplicidade de infecção (MOI) de cinco. O meio foi substituído vinte e quatro horas após a incubação. A eficácia de transdução e a expressão de TFP foi avaliada com citometria de fluxo com o uso de um ligante específico ao ligante de TFP de interesse e/ou superfície expressão de TCRαβ e CD3ε.

TRANSDUÇÃO DE CÉLULAS T

[0353] Os transgenes de TFP foram introduzidos em células T com o uso de lentivírus, conforme descrito, por exemplo, na Publicação de Patente copendente nº U.S. 2017-0166622. As células T foram centrifugadas junto com vírus numa multiplicidade de infecção (MOI) de cinco mais 5 µg/ml de polibreno durante 100 minutos a 600 g. O meio foi substituído vinte e quatro horas após a centrifugação.

A eficácia de transdução e a expressão de TFP foi avaliada com citometria de fluxo com o uso de um ligante específico ao ligante de TFP de interesse e/ou superfície expressão de TCRαβ e CD3ε.

EXPRESSÃO DE TFP DE TCRA/β HUMANO

[0354] À medida que as células negativas de TCRα ainda expressam TCRβ e, de modo recíproco, TCRα é expresso em células negativas de TCRβ; portanto, TCRα TFPs foram expressos em células $TRA^{-/-}$ e TFPs de TCRβ foram expressas em células $TRB^{-/-}$. O formato múltiplo de TFPs de TCRα/β e TCRα/β foi testado em células negativas de TCR para determinar a construção otimizada para restaurar a translocação do complexo de TCR inteiro (Figura 5). As TFPs de comprimento completo (FL) de TCRα/β foram geradas montando-se qualquer um dos éxons variáveis (V) com qualquer um dos éxons de junção (J) seguidos por todos os éxons constantes de lóci de TCR. Numa modalidade, um éxon de diversidade D pode ser colocado entre V e J. Possivelmente, a mutação ou indel pode ser adicionada na junção de cada éxon para imitar a atividade de enzimas de gene de ativação de recombinação (RAG). Os resíduos de TRAV são numerados de acordo com o sistema de informações ImMunoGeneTics internacional (IMGT, imgt.org).

[0355] $TCR\alpha_{(FL)}$ FMC63 TFP expressada em células $TRA^{-/-}$.

[0356] Nt-FMC63-TRA($V13\text{-}1_{(1\text{-}256)}$; J13; C)-Ct.

[0357] Nt- FMC63-TRA(V8-1; J20; C)-Ct.

[0358] Nt- FMC63-TRA(V29DV5 ; J44; C)-Ct.

[0359] TFP de TCRα truncado expressou células de $TRA^{-/-}$.

[0360] Nt-FMC63-TRA($V13\text{-}1_{(33\text{-}256)}$; J13; C)-Ct.

[0361] Nt-FMC63-TRA($V13\text{-}1_{(105\text{-}256)}$; J13; C)-Ct.

[0362] TCRα truncado expressou células $TRA^{-/-}$, resíduos TRAC são numerados de acordo com o sistema de informações ImMunoGeneTics internacional (IMGT, www.imgt.org).

[0363] Nt-$TRAC_{7\text{-}174}$-Ct.

[0364] Nt-$TRAC_{128\text{-}174}$-Ct.

TCRB$_{(FL)}$ FMC63 TFP EXPRESSADA EM CÉLULAS TRB$^{-/-}$

[0365] Nt-FMC63-TRB(V9; J1-1; C1)-Ct.

[0366] Nt- FMC63-TRB(V7-9; J1-5; C1)-Ct.

[0367] Nt- FMC63-TRB(V5-1 ; J2-2; C1)-Ct.

[0368] A TFP de TCRβ expressou células TRB$^{-/-}$, resíduos TRBC são numerados de acordo com o sistema de informações IMGT internacional, conforme observado acima.

[0369] Nt-FMC63-TRBC1$_{(-8)-173}$-Ct.

[0370] Nt-FMC63-TRBC1$_{122-174}$-Ct.

[0371] Nt-FMC63-TRBC1$_{127-174}$-Ct.

EXPRESSÃO DE TFP DE TCRα/β HUMANO TRUNCADO

[0372] A superexpressão dos domínios constantes tanto de TCRα quanto de TCRβ pode ser suficiente para acionar a translocação do complexo de TCR inteiro à superfície celular. Para testar isto, um transgene de TRP foi projetado, o qual codifica os domínios constantes de TCRα e TCRβ separados por um peptídeo autoclivante 2A. Numa modalidade, o ligante de TFP é fundido na extremidade N-terminal de TRAC e/ou TRBC. Em outra modalidade, a TFP é fundida a uma molécula de CD3 e expressada independentemente de transgene TR[A/B]C.

EXPRESSÃO DE TFP DE TCRα/β MURINO TRUNCADO

[0373] As regiões constantes de TCR humano são intercambiáveis com seus homólogos murinos. Adicionalmente, as regiões constantes de TCR de camundongo aumentam a estabilidade do complexo de CD3ζ/TCR quando expressadas em células humanas. Consequentemente, um transgene de TFP foi projetado, o qual codifica os domínios constantes de TCRα e TCRβ de camundongo separados por um peptídeo autoclivante 2A. Numa modalidade, o ligante de TFP é fundido na extremidade N-terminal de mTRAC e/ou mTRBC. Em outra modalidade, o ligante de TFP é carreado por moléculas CD3 e expresso independentemente de transgene mTR[A/B]C.

[0374] Os transgenes mTR[A/B]C expressam em células TRA$^{-/-}$ ou TRB$^{-/-}$.

[0375] Nt-FMC65-mTRAC$_{114-169}$-T2A-mTRBC$_{123-173}$-Ct.

[0376] Nt-mTRAC$_{114-169}$-T2A-mTRBC$_{123-173}$-Ct.

EXPRESSÃO DE TFP DE TCRα/β HUMANO MURINIZADO

[0377] Para aumentar a afinidade entre as regiões constantes de TCRα e TCRβ humanos, uma série de sequências foi manipulada, em que resíduos de TCR humano são substituídos por TCR de camundongo. As substituições foram introduzidas na região constante de TCRα, incluindo resíduos P90S, E91D, S92V, S93P. As substituições introduzidas na região constante de TCRβ foram E11K, S15A, F129I, E132A, Q135H. Estas substituições tornaram TRAC e TRBC suficientes para a translocação do complexo de TCR inteiro à superfície celular. Portanto, a TFP é expressa através de um transgene Nt-FMC63-TRAC$_{(-7)-174}$ P90S, E91D, S92V, S93P -T2A- TRBC1$_{(-8)-173}$ E11K, S15A, F129I, E132A, Q135H-Ct em células de TRA$^{-/-}$ ou TRB$^{-/-}$.

A EXPRESSÃO DE UMA TPF DE TCRα INTENSIFICADA

[0378] Diversas estruturas do complexo de TCRαβ humano estão disponíveis no banco de dados de proteína (PDB). Estas estruturas destacam resíduos envolvidos na interação TCRα/TCRβ e outros resíduos de TRAC próximos de TRBC, mas não envolvidos na interação de TCRα/TCRβ. Então, é possível intensificar a afinidade de TCRα para TCRβ por uma ou mais das seguintes substituições em TRAC: V22W, F85.5E, T84D, S85.1D, V84.1W.

[0379] A expressão de TRAC-TFP intensificado em células TRA$^{-/-}$ restauram a translocação à superfície celular do TCR inteiro. TRAC-TFP intensificado em células WT toma de modo eficaz o lugar de molécula de TCRα endógeno no complexo de TCR. Intensificar TRAC expressa sem o ligante de TFP restaurar de modo eficaz a translocação de complexo de TCR à superfície celular, no caso de o ligante de TFP ser fundido às moléculas de CD3 e expressados independentemente de transgene TRAC intensificado ou no mesmo transgene colocando-se um peptídeo autoclivante 2A entre ambas as sequências de codificação (CDS).

[0380] De modo similar, as substituições em TRBC intensificam a interação entre TCRα/TCRβ. As substituições V22W introduzidas individualmente ou em combinação em TRBC são suficientes para restaurar a translocação à superfície celular do TCR inteiro em células $TRB^{-/-}$. A expressão de TRBC-TFP intensificado em células $TRB^{-/-}$ restauram a translocação à superfície celular do TCR inteiro. A expressão de TRBC-TFP intensificada em células de tipo selvagem toma de modo eficaz o lugar de molécula de TCRβ endógeno no complexo de TCR. No caso de TRBC intensificado se expressar sem ligante de TFP, o ligante de TFP é fundido às moléculas CD3 e expresso independentemente de transgene de TRBC intensificado ou no mesmo transgene colocando-se um peptídeo autoclivante 2A entre ambas as CDS.

EXPRESSÃO DE UMA TFP de IgG/TCRα/β HÍBRIDA

[0381] A interação entre TCRα e TCRβ é intensificada substituindo-se o domínio variável de TCRα e TCRβ com domínios constantes de IgG. Portanto, os domínios CH1 constantes de cadeia pesada de IgG foram fundidos na extremidade N-terminal de TRBC enquanto os domínios CL constantes de cadeia leve de IgG foram fundidos na extremidade N-terminal de TRAC. Finalmente, a TFP foi adicionada na extremidade N-terminal de CL. Numa modalidade, ambos os construtos são codificados pelo mesmo transgene colocando-se um peptídeo autoclivante 2A entre os mesmos conforme indicado: Nt- FMC63 – $IgG_{CL(-7)-125}$ – $TRAC_{(-6)-174}$ – T2A – $IgG_{CH1(-7)-122}$ – $TRBC_{(-8)-173}$. Em outra modalidade, a posição de IgG_{CL} e IgG_{CH1} é trocada. Em outra modalidade, o ligante de TFP é fundido na extremidade N-terminal de IgG_{CL} ou/e IgG_{CH1} ou fundido às moléculas CD3 e expresso independentemente. Em outra modalidade, as substituições de resíduo são introduzidas para intensificar a interação de CH1/CL de IgG_{CL}F7A, IgG_{CH1}A20L.

EXPRESSÃO DE TCR-TFP DE DOMÍNIOS TROCADOS

[0382] As moléculas de TCRα/β/γ/δ adotam uma organização estrutural similar. Na extremidade N-terminal, suas regiões V(D)J adotam uma conformação do tipo imunoglobulina (IgV), enquanto suas regiões C são constituídas por um

domínio do tipo imunoglobulina (IgC) seguido por um peptídeo de conexão (CP) um domínio transmembranar (TM) e uma cauda intracelular (IC) curta na extremidade C-terminal. Apesar da alta homologia estrutural entre estas moléculas, TCRα apenas faz par com TCRβ e TCRγ apenas faz par com TCRδ. Consequentemente, trocar o domínio (ou domínios) de TCRα para domínio (ou domínios) de TCRγ e domínio (ou domínios) de TCRβ para domínio (ou domínios) de TCRγ gerará TFPs que não fazem par com moléculas de TCR endógeno. Por exemplo, Nt-FMC63 – IgCα – CPγ – TMγ – ICγ – 2A – IgCβ – CPδ – ICδ -Ct produz um receptor alogênico em que IgCαCPγTMγICγ interage especificamente com IgCbCPdICd e não com TCR endógenoβ em células $TRA^{-/-}$ ou TCRa endógeno em células $TRB^{-/-}$. Em outra modalidade, o ligante de TFP é fundido na extremidade N-terminal de IgCβ ou/e IgCα ou fundido às moléculas CD3 e expresso independentemente. Combinações diferentes de domínios trocados podem ser usadas com os métodos divulgados no presente documento.

KNOCK-IN (KI) DE UM PEPTÍDEO AUTOCLIVANTE 2A EM LÓCUS DE TCR

[0383] Introdução de um sinal de autoclivagem a montante do domínio de CP em quadro com genes TRAC ou TRBC gera uma versão truncada endógena de TCRα ou TCRβ. Deste modo, a sequência a jusante do sinal de clivagem que compreende os domínios de CP e TM é transcrita à superfície celular; em contraste, a parte a montante do sinal de clivagem que compreende as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) não é translocada à superfície celular. Numa modalidade, o sinal de autoclivagem é inserido em quadro nos genes TRAC ou TRBC por reparo direcionado de homologia (HDR) ou reparo de modelo de fita única (ssTR). HDR é induzido por uma quebra de fita única (SSB) de DNA ou uma quebra de fita dupla de DNA (DSB) enquanto ssTR é induzido apenas por SSB. Numa modalidade, uma endonuclease personalizada é usada para gerar uma DSB a montante de região de CP ou uma nickase para gerar uma SSB na mesma área de TRAC ou TRBC. O DNA de doador homólogo que compreende um sinal de

autoclivagem deve ter pelo menos homologia de 40 pares de base (bp) com o alvo endógeno, e pode ter fita simples ou dupla, linear ou circular. Adicionalmente, o DNA de doador homólogo compreende múltiplas substituições de base para não serem clivadas pela endonuclease ou nickase personalizada. Numa modalidade, um transgene de CD3-TFP é inserido nas células antes ou após da edição de gene. Em outra modalidade, o DNA de doador homólogo codifica a sequência de TFP a jusante do peptídeo de autoclivagem em quadro com TRAC ou TRBC. Consequentemente, a molécula de fusão de TFP-TCR está sob controle do receptor de TCR endógeno sem o risco de múltiplas inserções aleatórias de um promotor exógeno através do genoma. Um esquema é mostrado na Figura 6.

EXEMPLO 6: CITOTOXICIDADE DE CÉLULAS T NEGATIVAS DE TCR HUMANO QUE EXPRESSAM TFPS

[0384] O ensaio de citotoxicidade com base em luciferase (ensaio “Luc-Cyto”) avalia a citotoxicidade de células T TFP medindo-se indiretamente a atividade enzimática de luciferase nas células alvo vivas residuais após a cocultura.

Geração de células tumorais que expressam luciferase de vagalume (Luc)

[0385] As células-alvo usadas no ensaio Luc-Cyto foram Nalm6-Luc (CD19 positivas) e K562-Luc (CD19 negativas foram geradas transduzindo-se de modo estável células Nalm6 (DSMZ nº de cat. ACC 128) e K562 ((ATCC® nº de cat.CCL-243™)) para expressar luciferase de vagalume. A luciferase de vagalume de codificação de DNA foi sintetizada por GeneArt® (ThermoFisher) e inserida no sítio de clonagem múltipla de vetor lentiviral de promotor único pCDH527A-1 (System Biosciences). O lentivírus foi empacotado de acordo com as instruções do fabricante. As células tumorais foram, então, transduzidas com o lentivírus por 24 horas e, então, selecionadas com puromicina (5 µg/ml). A geração bem-sucedida de células Nalm6-Luc e K562-Luc foi confirmada medindo-se a atividade enzimática de luciferase nas células com Sistema de Ensaio de Luciferase Bright-Glo™ (Promega).

Caracterização fenotípica de células T TFP alo

[0386] As células T TFP alogênicas foram examinadas em relação à sua expressão de TCRαβ humano (com TCR anti-humano, Miltenyi Bio, clone BW242/412), TCRαβ de camundongo (com TCRβ anti-camundongo, BioLegend, clone H57-597), CD3ε humano (com CD3ε anti-humano BioLegend, clone UCHT1), CD4 humano (com CD4 anti-humano, BioLegend, clone RPA-T4), CD8 humano (com CD8 anti-humano, BioLegend, clone SK-1) e TFPs (com a detecção do ligante de CD19 FMC63 por CD19 biotinilado (nº Cat. CD9-H8259, AcroBio). As células T de tipo selvagem (não editadas) do mesmo doador foram examinadas com o mesmo painel como comparação.

[0387] Os resultados são mostrados na Figura 7. As células T de tipo selvagem mostram a expressão de superfície de TCRαβ e CD3ε humanos, mas não TCRβ de camundongo. Em contraste, as células T TFP alogênicas não mostram expressão de superfície de TCRαβ humano, o que indica edição com sucesso. A expressão de superfície de TCRβ de camundongo em células T TFP alogênicas é coerente com a detecção de CD3ε humano na superfície, o que sugere remontagem com sucesso do complexo de TCR completo. A expressão de CD4 e CD8 humanos não é significativamente diferente entre células T TFP e de tipo selvagem. A detecção de ligante de CD19 de superfície (FMC63, SEQ ID NO:X) é observada apenas para as células T TFP alogênicas.

ENSAIO DE LUC-CYTO QUE AVALIA A CITOTOXICIDADE DE CÉLULAS T

[0388] O ensaio Luc-Cyto foi definido misturando-se as células T com células tumorais em efetor diferente (célula T) para razões alvo (célula de tumor) (entre E e T). As células alvo (Nalm6-Luc ou K562-Luc) foram transferidas para placa em 10000 células por poço em placas de 96 poços com meio RPMI-1640 suplementado com FBS desativado por calor (HI) 10%. As células T TFP alogênicas foram adicionadas às células tumorais em 30000, 10000, ou 3333 células por poço para alcançar razões entre E e T de 3 para 1, 1 para 1, ou 1 para 3. As misturas de células foram incubadas por 24 horas a 37ºC com CO_2 5%. A atividade enzimática

de luciferase foi medida com o uso do Sistema de Ensaio de Luciferase Bright-Glo™ (Promega), que mede a atividade das células-alvo vivas residuais na célula T e cocultura de célula de tumor.

[0389] Os resultados são mostrados na Figura 8. As células T de TFP alogênica, células T TFP de CD3ε alo e mTCRαβ alo, mostraram lise robusta e específica com células tumorais positivas de CD19 Nalm6-Luc, mas não as células tumorais negativas de CD19 K562-Luc.

MLR de células T negativas de TCR humano que expressam TFPs

[0390] As células T negativas de TCR humano que expressam TFPs são avaliadas quanto à alogenicidade usando-se um ensaio de reação de linfócitos misturados (MLR). As células doadoras de PBMC divergentes são primeiramente depletadas de células B por Classificação Celular Ativada Magnética de células negativas de CD19. PBMCs são marcadas com o PKH de corante de marcação celular lipofílica e fixadas com paraformaldeído .4%. Simultaneamente, um corante de PKH colorido diferente é incorporado em células T alvo. As células T negativas de TCR humano que expressam TFPs e células T de tipo selvagem do mesmo doador são subsequentemente cocultivadas numa razão 1:1 (PBMCs para células T) ou as células T são cultivadas sozinhas. A proliferação de células T doadoras é monitorada rastreando-se o corante PKH por um ponto no tempo de seis a doze dias. O corante PKH dilui pela metade mediante divisão celular e, deste modo, a quantidade de proliferação que ocorre nas células T é avaliada e comparada com os controles de tipo selvagem.

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido nucleico recombinante **caracterizado** pelo fato de que compreende

(a) uma sequência que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) que compreende

(i) uma subunidade de TCR que compreende

(1) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR,

(2) um domínio transmembranar, e

(3) um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta, e

(ii) um anticorpo humano ou anticorpo humanizado que compreende um domínio de ligação ao antígeno; e

(b) uma sequência que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta ou um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta;

em que a subunidade de TCR e o anticorpo são operacionalmente ligados, e em que a TFP incorpora funcionalmente num complexo de TCR quando expressa numa célula T modificada que compreende uma ruptura funcional de uma TCR endógena.

2. Ácido nucleico recombinante **caracterizado** pelo fato de que compreende

(a) uma sequência que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) que compreende

(i) uma subunidade de TCR que compreende

(1) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de

TCR,

(2) um domínio transmembranar, e

(3) um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta, e

(ii) um ligante de ligação ou um fragmento do mesmo é capaz de se ligar a um anticorpo ou fragmento do mesmo; e

(b) uma sequência que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta ou um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta;

em que a subunidade de TCR e o ligante de ligação ou fragmento do mesmo são operacionalmente ligados, e

em que a TFP incorpora funcionalmente no complexo de TCR quando expressa numa célula T modificada que compreende uma ruptura funcional de uma TCR endógena.

3. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o ligante de ligação é capaz de se ligar a um domínio Fc do anticorpo.

4. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o ligante de ligação é capaz de se ligar seletivamente a um anticorpo IgG1.

5. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o ligante de ligação é capaz de se ligar especificamente a um anticorpo IgG4.

6. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo

ou fragmento do mesmo se liga a um antígeno de superfície celular.

7. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo se liga a um antígeno de superfície celular sobre a superfície de uma célula de tumor.

8. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o ligante de ligação compreende um monômero, um dímero, um trímero, um tetrâmero, um pentâmero, um hexâmero, um heptâmero, um octômero, um nonâmero ou um decâmero.

9. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o ligante de ligação não compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo.

10. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que o ligante de ligação compreende um polipeptídeo de CD16 ou fragmento do mesmo.

11. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o ligante de ligação compreende um polipeptídeo de ligação a CD16.

12. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o ligante de ligação é humano ou humanizado.

13. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um anticorpo ou fragmento do mesmo capaz de ser ligado pelo ligante de ligação.

14. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a

reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo é capaz de ser secretado a partir de uma célula.

15. Ácido nucleico recombinante **caracterizado** pelo fato de que compreende

(a) uma sequência que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) que compreende

(i) uma subunidade de TCR que compreende

(1) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR,

(2) um domínio transmembranar, e

(3) um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta, e

(ii) um domínio de antígeno que compreende um ligante ou um fragmento do mesmo que se liga a um receptor ou polipeptídeo expresso sobre uma superfície de uma célula; e

(b) uma sequência que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta ou um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta;

em que a subunidade de TCR e o domínio de antígeno são operacionalmente ligados, e em que a TFP incorpora funcionalmente num complexo de TCR quando expressa numa célula T modificada que compreende uma ruptura funcional de uma TCR endógena.

16. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de antígeno compreende um ligante.

17. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o ligante se liga ao receptor de uma célula.

18. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o ligante se liga ao polipeptídeo expresso sobre uma superfície de uma célula.

19. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o receptor ou polipeptídeo expresso sobre uma superfície de uma célula compreende um polipeptídeo ou receptor de resposta ao estresse.

20. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o receptor ou polipeptídeo expresso sobre uma superfície de uma célula é uma glicoproteína relacionada a MHC classe I.

21. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que a glicoproteína relacionada a MHC classe I é selecionada do grupo que consiste em MICA, MICB, RAET1E, RAET1G, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4 e combinações dos mesmos.

22. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de antígeno compreende um monômero, um dímero, um trímero, um tetrâmero, um pentâmero, um hexâmero, um heptâmero, um octômero, um nonâmero ou um decâmero.

23. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de antígeno compreende um monômero ou um dímero do ligante ou fragmento do mesmo.

24. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o ligante ou fragmento do mesmo é um monômero, um dímero, um trímero, um tetrâmero, um pentâmero, um hexâmero, um heptâmero, um octômero, um nonâmero ou um decâmero.

25. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado** pelo fato de que o ligante ou fragmento do mesmo é um monômero ou um dímero.

26. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de antígeno não compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo.

27. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de antígeno não compreende uma região variável.

28. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de antígeno não compreende uma CDR.

29. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o ligante ou fragmento do mesmo é um ligante de grupo Natural Killer 2D (NKG2D) ou um fragmento do mesmo.

30. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, **caracterizado** pelo fato de que o domínio constante de TCR incorpora num complexo de TCR funcional quando expresso numa célula T.

31. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, **caracterizado** pelo fato de que o domínio constante de TCR incorpora num mesmo complexo de TCR funcional que o complexo de TCR funcional que

incorpora a TFP quando expresso numa célula T.

32. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, **caracterizado** pelo fato de que a sequência que codifica a TFP e a sequência que codifica o domínio constante de TCR estão contidas numa mesma molécula de ácido nucleico.

33. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, **caracterizado** pelo fato de que a sequência que codifica a TFP e a sequência que codifica o domínio constante de TCR estão contidas em moléculas de ácido nucleico diferentes.

34. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, **caracterizado** pelo fato de que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo, o domínio de antígeno ou o ligante de ligação ou fragmento do mesmo são operacionalmente ligados por uma sequência ligante.

35. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 34, **caracterizado** pelo fato de que a sequência ligante compreende $(G_4S)n$, em que n= 1 a 4.

36. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, **caracterizado** pelo fato de que o domínio transmembranar é um domínio transmembranar de TCR a partir de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, TCR alfa ou TCR beta.

37. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, **caracterizado** pelo fato de que o domínio intracelular é derivado de apenas CD3 épsilon, apenas CD3 gama, apenas CD3 delta, apenas TCR alfa ou apenas TCR beta.

38. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 1 a 37, **caracterizado** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (ii) um domínio transmembranar de TCR e (iii) um domínio intracelular de TCR, em que pelo menos dois dentre (i), (ii) e (iii) são a partir da mesma subunidade de TCR.

39. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 38, **caracterizado** pelo fato de que o domínio extracelular de TCR compreende um domínio extracelular ou porção do mesmo de uma proteína selecionada do grupo que consiste numa cadeia de TCR alfa, numa cadeia de TCR beta, numa subunidade de TCR de CD3 épsilon, numa subunidade de TCR de CD3 gama, numa subunidade de TCR de CD3 delta, em fragmentos funcionais das mesmas e em sequências de aminoácidos das mesmas que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações.

40. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, **caracterizado** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende um domínio transmembranar que compreende um domínio transmembranar de uma proteína selecionada do grupo que consiste numa cadeia de TCR alfa, numa cadeia de TCR beta, numa cadeia de TCR zeta, numa subunidade de TCR de CD3 épsilon, numa subunidade de TCR de CD3 gama, numa subunidade de TCR de CD3 delta, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, em fragmentos funcionais dos mesmos, e em sequência de aminoácidos dos mesmos que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações.

41. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 40, **caracterizado** pelo fato de

que a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular de TCR que compreende um domínio estimulatório de uma proteína selecionada dentre um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta, ou uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos uma modificação na mesma.

42. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 41, **caracterizado** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular que compreende um domínio estimulatório de uma proteína selecionada dentre um domínio de sinalização funcional de 4-1BB e/ou um domínio de sinalização funcional de CD3 zeta, ou uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos uma modificação na mesma.

43. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio coestimulatório.

44. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o domínio coestimulatório compreende um domínio de sinalização funcional de uma proteína selecionada do grupo que consiste em OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) e 4-1BB (CD137), e sequências de aminoácidos da mesma que tem pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações nas mesmas.

45. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 44, **caracterizado** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende um motivo de ativação à base de tirosina de imunorreceptor (ITAM) de uma subunidade

de TCR que compreende um ITAM ou porção do mesmo de uma proteína selecionada do grupo que consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama, subunidade de TCR de CD3 delta, cadeia de TCR zeta, cadeia de receptor de Fc épsilon 1, cadeia de receptor de Fc épsilon 2, cadeia de receptor de Fc gama 1, cadeia de receptor de Fc gama 2a, cadeia de receptor de Fc gama 2b 1, cadeia de receptor de Fc gama 2b2, cadeia de receptor de Fc gama 3a, cadeia de receptor de Fc gama 3b, cadeia de receptor de Fc beta 1, TYROBP (DAP 12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, fragmentos funcionais dos mesmos, e sequência de aminoácidos dos mesmos que têm pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações.

46. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que o ITAM substitui um ITAM de CD3 gama, CD3 delta ou CD3 épsilon.

47. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que o ITAM é selecionado do grupo consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama e subunidade de TCR de CD3 delta e substitui um ITAM diferente selecionado do grupo que consiste em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama e subunidade de TCR de CD3 delta.

48. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, **caracterizado** pelo fato de que a TFP, o domínio constante de TCR alfa, o domínio constante de TCR beta e qualquer combinação dos mesmos é

capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno.

49. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 48, **caracterizado** pelo fato de que

(a) o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa e a TFP se integra funcionalmente num complexo de TCR que compreende uma subunidade endógena de TCR beta, CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta ou uma combinação dos mesmos;

(b) o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR beta e a TFP se integra funcionalmente num complexo de TCR que compreende uma subunidade endógena de TCR alfa, CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta ou uma combinação dos mesmos; ou

(c) o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta e a TFP se integra funcionalmente num complexo de TCR que compreende uma subunidade endógena de CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta ou uma combinação dos mesmos.

50. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 49, **caracterizado** pelo fato de que a pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações no mesmo compreendem uma modificação de um aminoácido que medeia a sinalização celular ou uma modificação de um aminoácido que é fosforilado em resposta a um ligante que se liga à TFP.

51. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 34 a 50, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo humano ou humanizado é um fragmento de anticorpo.

52. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 51, **caracterizado** pelo fato de que o fragmento de anticorpo é um scFv, um domínio de anticorpo de domínio único, um domínio V_H ou um domínio V_L.

53. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 34 a 52, **caracterizado** pelo fato de que um domínio de ligação ao antígeno é selecionado de um grupo que consiste num domínio de ligação anti-CD19, num domínio de ligação antiantígeno de maturação de célula B (BCMA), domínio de ligação antimesotelina (MSLN), num domínio de ligação anti-IL13Ra2, num domínio de ligação anti-MUC16, num domínio de ligação anti-CD22, num domínio de ligação anti-PD-1, num domínio de ligação anti BAFF ou receptor BAFF e domínio de ligação anti-ROR-1.

54. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 53, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico é selecionado do grupo que consiste num DNA e num RNA.

55. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico é um mRNA.

56. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 55, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico recombinante compreende um análogo de ácido nucleico, em que o análogo de ácido nucleico não está numa sequência de codificação do ácido nucleico recombinante.

57. Ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 56, **caracterizado** pelo fato de que o análogo nucleico é selecionado a partir do grupo que consiste em 2’-

O-metila, 2’-O-metoxietila (2’-O-MOE), 2’-O-aminopropila, 2’-desóxi, T-desoxi-2’-fluoro, 2’-O-aminopropila (2’-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetila (2’-O-DMAOE), 2’-O-dimetilaminopropila (2’-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietila (2’-O-DMAEOE), 2’-O-N-metilacetamido (2’-O-NMA) modificado, um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido etileno nucleico (ENA), um ácido nucleico de peptídeo (PNA), um ácido 1’,5’-anidro-hexitol nucleico (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo tiolfosfonato e um 2’-fluoro N3-P5’-fosforamidita.

58. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 57, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente uma sequência de iniciação.

59. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente uma sequência promotora.

60. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 59, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente uma sequência que codifica uma cauda poli(A).

61. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 60, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente uma sequência 3’UTR.

62. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 61, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico é um ácido nucleico isolado ou um ácido nucleico de ocorrência não natural.

63. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 62, **caracterizada**

pelo fato de que o ácido nucleico é um ácido nucleico transcrito *in vitro*.

64. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 63, **caracterizada** pelo fato de que compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR alfa.

65. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 63, **caracterizada** pelo fato de que compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR beta.

66. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 63, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR alfa e uma sequência que codifica um domínio transmembranar de TCR beta.

67. Vetor **caracterizado** pelo fato de que compreende o ácido nucleico recombinante, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 66.

68. Vetor, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que o vetor é selecionado do grupo que consiste num DNA, num RNA, num plasmídeo, num vetor de lentivírus, vetor adenoviral, um vetor viral adenoassociado (AAV), um vetor viral de sarcoma de Rous (RSV) ou um vetor de retrovírus.

69. Vetor, de acordo com a reivindicação 67 ou 68, **caracterizado** pelo fato de que o vetor é um vetor AAV6.

70. Vetor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente um promotor.

71. Vetor, de acordo com qualquer uma das reivindicações

67 a 70, **caracterizado** pelo fato de que o vetor é um vetor transcrito *in vitro*.

72. Célula T modificada **caracterizada** pelo fato de que compreende o ácido nucleico recombinante, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 66, ou o vetor, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 67 a 71, em que a célula T modificada compreende uma ruptura funcional de um TCR endógeno.

73. Célula T modificada **caracterizada** pelo fato de que a sequência que codifica a TFP do ácido nucleico, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 66, ou uma TFP codificada pela sequência do ácido nucleico, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 66, que codifica a TFP, em que a célula T modificada compreende uma ruptura funcional de um TCR endógeno.

74. Célula T alogênica modificada **caracterizada** pelo fato de que compreende a sequência que codifica a TFP, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 66, ou uma TFP codificada pela sequência do ácido nucleico, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 66, que codifica a TFP.

75. Célula T modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 74, **caracterizada** pelo fato de que a célula T compreende adicionalmente uma sequência heteróloga que codifica um domínio constante de TCR, em que o domínio constante de TCR é um domínio constante de TCR alfa, um domínio constante de TCR beta ou um domínio constante de TCR alfa e um domínio constante de TCR beta.

76. Célula T modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 75, **caracterizada** pelo fato de que o TCR

endógeno que é funcionalmente interrompido é uma cadeia de TCR alfa endógena, uma cadeia de TCR beta endógena ou uma cadeia de TCR alfa endógena e uma cadeia de TCR beta endógena.

77. Célula T modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 76, **caracterizada** pelo fato de que o TCR endógeno que é funcionalmente interrompido tem ligação reduzida a complexo de MHC-peptídeo em comparação com aquela de uma célula T de controle não modificada.

78. Célula T modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 77, **caracterizada** pelo fato de que a ruptura funcional é uma ruptura de um gene que codifica o TCR endógeno.

79. Célula T modificada, de acordo com a reivindicação 78, **caracterizada** pelo fato de que a ruptura de um gene que codifica o TCR endógeno é uma remoção de uma sequência do gene que codifica o TCR endógeno a partir do genoma de uma célula T.

80. Célula T modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 79, **caracterizada** pelo fato de que uma célula T é uma célula T humana selecionada a partir de células CD4, células CD8, células T virgens, células-tronco T de memória, células T de memória central, células T duplo negativas, células T de memória efetoras, células T efetoras, células ThO, células TcO, células Th1, células Tc1, células Th2, células Tc2, células Th17, células Th22, células T gama/delta, células natural killer (NK), células T natural killer (NKT), células-tronco hematopoiéticas e células-tronco pluripotentes.

81. Célula T modificada, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 72 a 80, **caracterizada** pelo fato de que a célula T é uma célula T CD8+ ou CD4+.

82. Célula T modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 81, **caracterizada** pelo fato de que a célula T é uma célula T alogênica.

83. Célula T modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 82, **caracterizada** pelo fato de que compreende adicionalmente um ácido nucleico que codifica uma molécula inibitória que compreende um primeiro polipeptídeo que compreende pelo menos uma porção de uma molécula inibitória, associada a um segundo polipeptídeo que compreende um sinal positivo a partir de um domínio de sinalização intracelular.

84. Célula T modificada, de acordo com a reivindicação 83, **caracterizada** pelo fato de que a molécula inibitória compreende o primeiro polipeptídeo que compreende pelo menos uma porção de PD1 e o segundo polipeptídeo que compreende um domínio coestimulatório e domínio de sinalização primário.

85. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de que compreende:

(a) as células T modificadas, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 72 a 84; e

(b) um carreador farmaceuticamente aceitável.

86. Método para produzir a célula T modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 84, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende

(a) interromper um gene de TCR endógeno que codifica uma cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR ou uma cadeia de TCR alfa e uma cadeia de TCR beta; produzindo, assim, uma célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR

endógeno; e

(b) transduzir a célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno com o ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 63, ou um vetor, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 67 a 71.

87. Método, de acordo com a reivindicação 86, **caracterizado** pelo fato de que a ruptura compreende transduzir a célula T com uma proteína de nuclease ou uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma proteína de nuclease que alveja o gene endógeno que codifica uma cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta ou uma cadeia de TCR alfa e uma cadeia de TCR beta.

88. Método para produzir a célula T modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 84, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende transduzir uma célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno com o ácido nucleico recombinante, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 63, ou um vetor, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 67 a 71.

89. Método, de acordo com a reivindicação 88, **caracterizado** pelo fato de que a célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno é uma célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno que codifica uma cadeia de TCR alfa, uma cadeia de TCR beta ou uma cadeia de TCR alfa e uma cadeia de TCR beta.

90. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 89, **caracterizado** pelo fato de que a célula T é uma célula T humana.

91. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações

86 a 90, **caracterizado** pelo fato de que a célula T que contém uma ruptura funcional de um gene de TCR endógeno tem ligação reduzida ao complexo de MHC- peptídeo em comparação com àquela de uma célula T de controle não modificada.

92. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 91, **caracterizado** pelo fato de que a nuclease é uma meganuclease, uma nuclease de dedo de zinco (ZFN), uma nuclease efetora semelhante a ativador de transcrição (TALEN), uma CRISPR/Cas nuclease ou uma megaTAL nuclease.

93. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 92, **caracterizado** pelo fato de que a sequência compreendida pelo ácido nucleico recombinante ou pelo vetor é inserida no gene de subunidade de TCR endógeno no sítio de clivagem, e em que a inserção da sequência no gene de subunidade de TCR endógeno interrompe funcionalmente a subunidade de TCR endógeno.

94. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 93, **caracterizado** pelo fato de que a nuclease é uma meganuclease.

95. Método, de acordo com a reivindicação 94, **caracterizado** pelo fato de que a meganuclease compreende uma primeira subunidade e uma segunda subunidade, em que a primeira subunidade se liga a um primeiro meio-sítio de reconhecimento da sequência de reconhecimento, e em que a segunda subunidade se liga a um segundo meio-sítio de reconhecimento da sequência de reconhecimento.

96. Método, de acordo com a reivindicação 95, **caracterizado** pelo fato de que a meganuclease é uma meganuclease de cadeia única que compreende um ligante, em que o ligante une de modo covalente a primeira subunidade e

a segunda subunidade.

97. Método para tratar câncer num sujeito que precisa do mesmo **caracterizado** pelo fato de que o método compreende administrar ao sujeito uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 85.

98. Método para tratar câncer num sujeito que precisa do mesmo **caracterizado** pelo fato de que o método compreende administrar ao sujeito uma composição farmacêutica que compreende (a) uma célula T modificada produzida de acordo com o método, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 86 a 96; e (b) um carreador farmaceuticamente aceitável.

99. Método para tratar câncer num sujeito que precisa do mesmo **caracterizado** pelo fato de que o método compreende administrar ao sujeito uma composição farmacêutica que compreende (a) uma célula T modificada produzida de acordo com o método, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 88 a 96; e (b) um carreador farmaceuticamente aceitável.

100. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 99, **caracterizado** pelo fato de que a célula T modificada é uma célula T alogênica.

101. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 100, **caracterizado** pelo fato de que menos citocinas são liberadas no sujeito em comparação com um sujeito administrado com uma quantidade eficaz de uma célula T de controle não modificada.

102. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 101, **caracterizado** pelo fato de que menos

citocinas são liberadas no sujeito em comparação com um sujeito administrado com uma quantidade eficaz de uma célula T modificada que compreende o ácido nucleico recombinante, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 66, ou o vetor, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 67 a 71.

103. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 102, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende administrar a composição farmacêutica em combinação com um agente que aumenta a eficácia da composição farmacêutica.

104. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 103, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende administrar a composição farmacêutica em combinação com um agente que melhora um ou mais efeitos colaterais associados à composição farmacêutica.

105. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 104, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um câncer sólido, um linfoma ou uma leucemia.

106. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 105, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo que consiste em carcinoma de célula renal, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer cervical, câncer de cérebro, câncer de fígado, câncer pancreático, câncer de rim e estômago.

107. Ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 66, vetor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 71, célula T modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 84, ou

composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 85, **caracterizada** pelo fato de que é para uso como um medicamento ou na preparação de um medicamento.

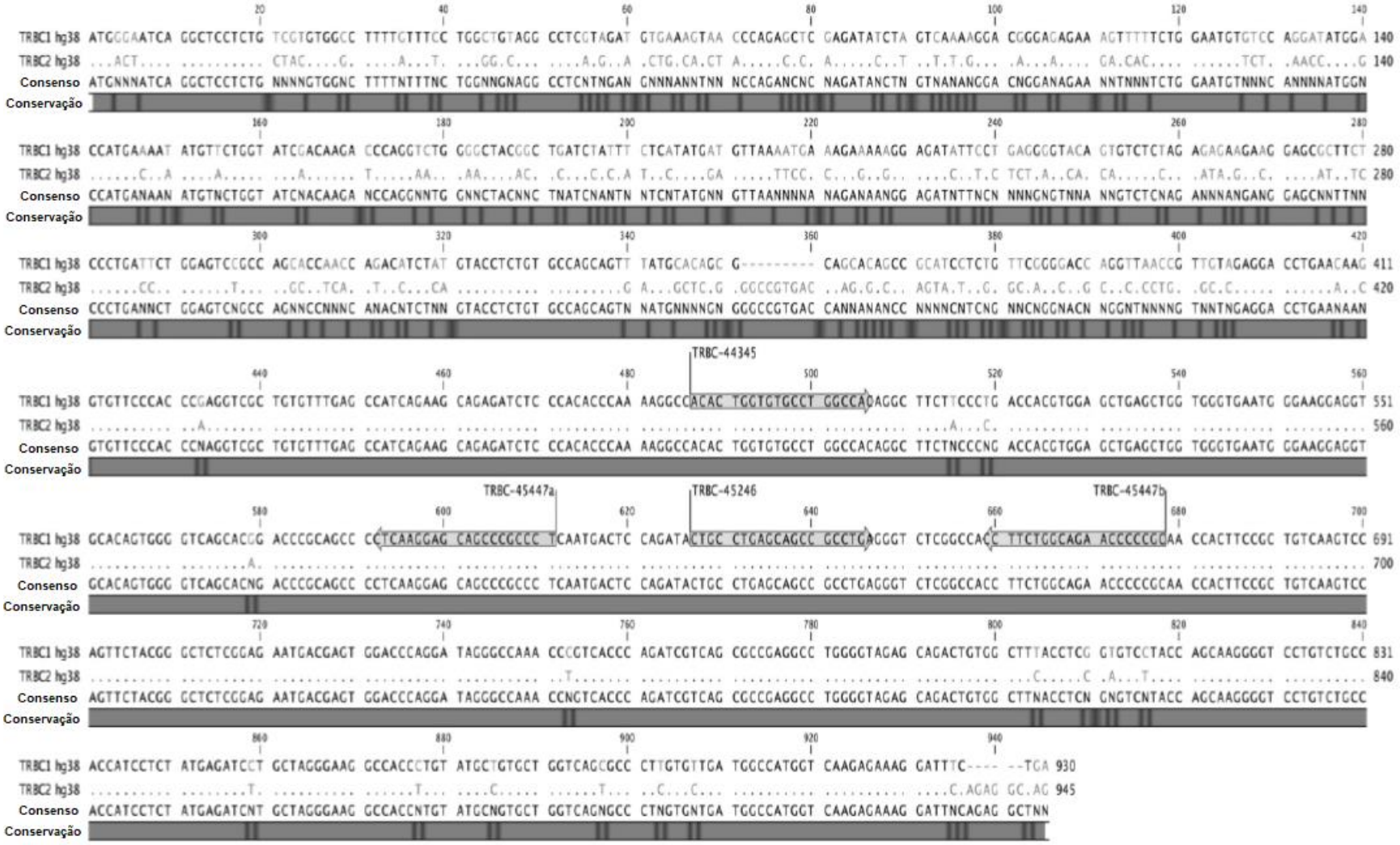

TRBC1 hg38
TRBC2 hg38
Consenso
Conservação
TRBC-44345
TRBC-45447a
TRBC-45246
TRBC-45447b

FIG. 1

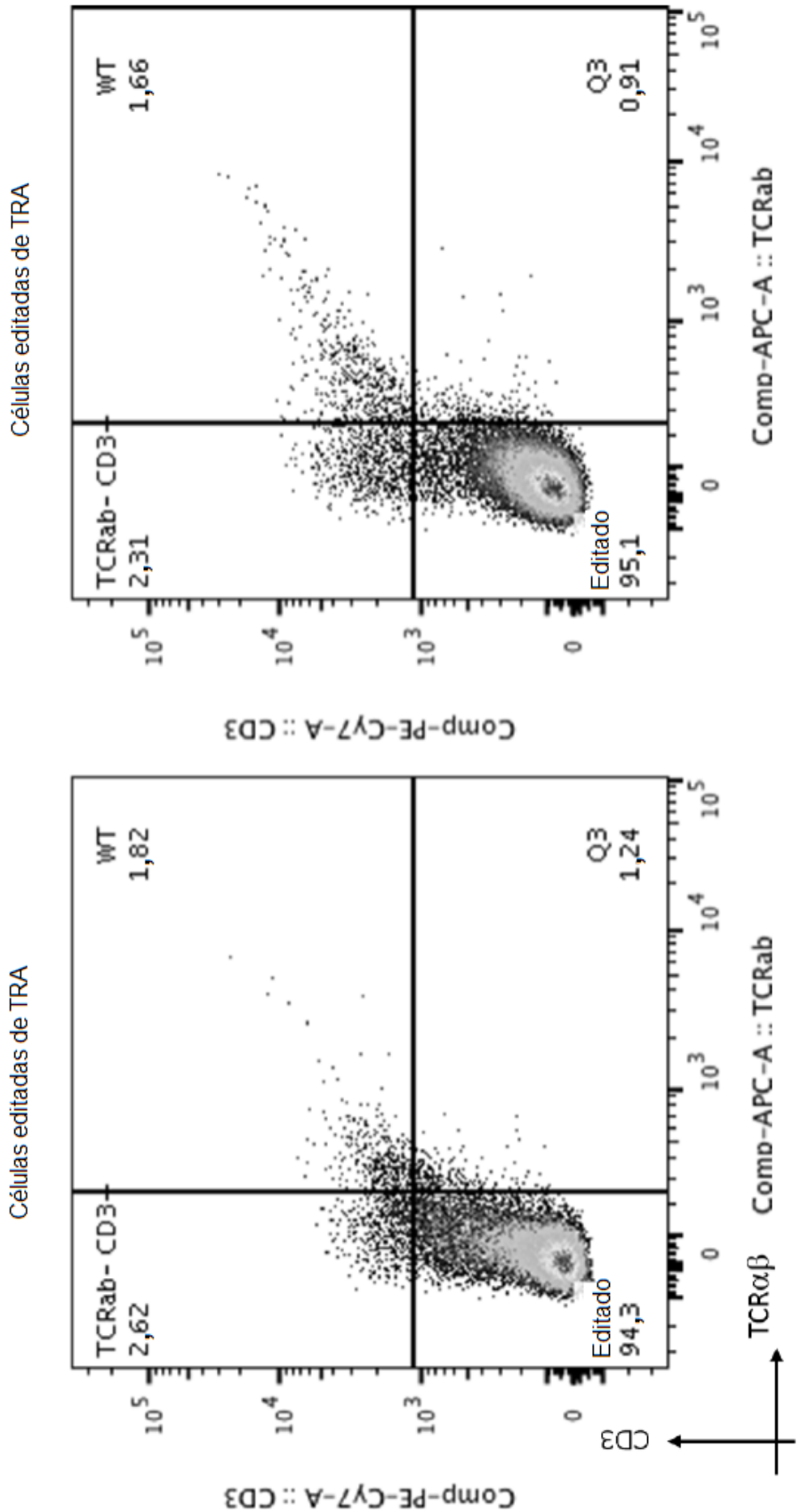

Células editadas de TRA
TCRab- CD3+
2,62
WT
1,82
Editado
94,3
Q3
1,24
Comp-PE-Cy7-A :: CD3
Comp-APC-A :: TCRab
CD3
TCRαβ
Células editadas de TRA
TCRab- CD3+
2,31
WT
1,66
Editado
95,1
Q3
0,91
Comp-PE-Cy7-A :: CD3
Comp-APC-A :: TCRab

FIG. 2A

FIG. 2B

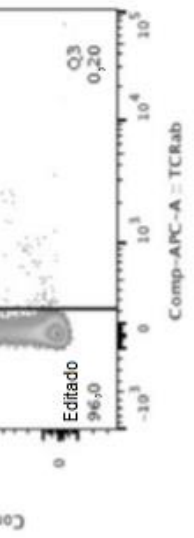


FIG. 3D

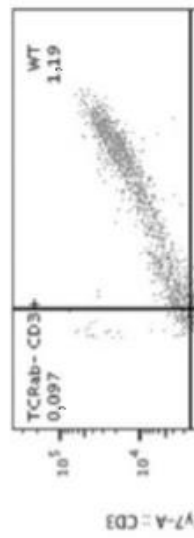


FIG. 3E

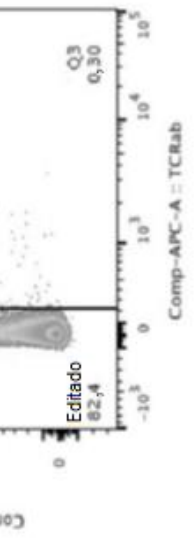


FIG. 3B

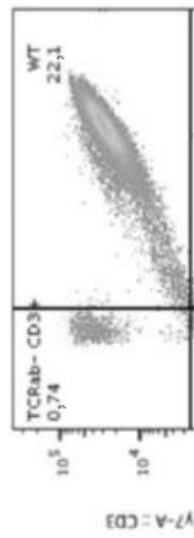


FIG. 3C

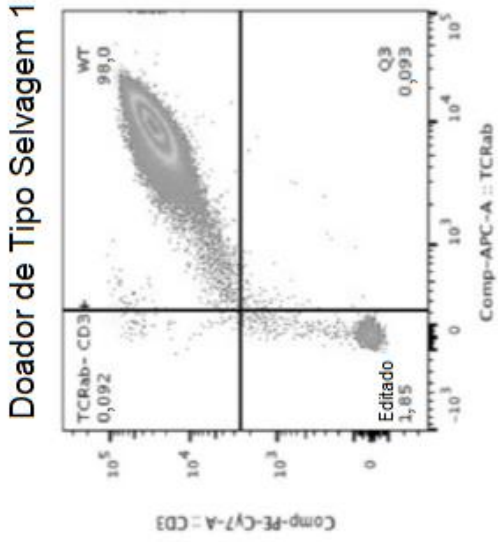


FIG. 3A

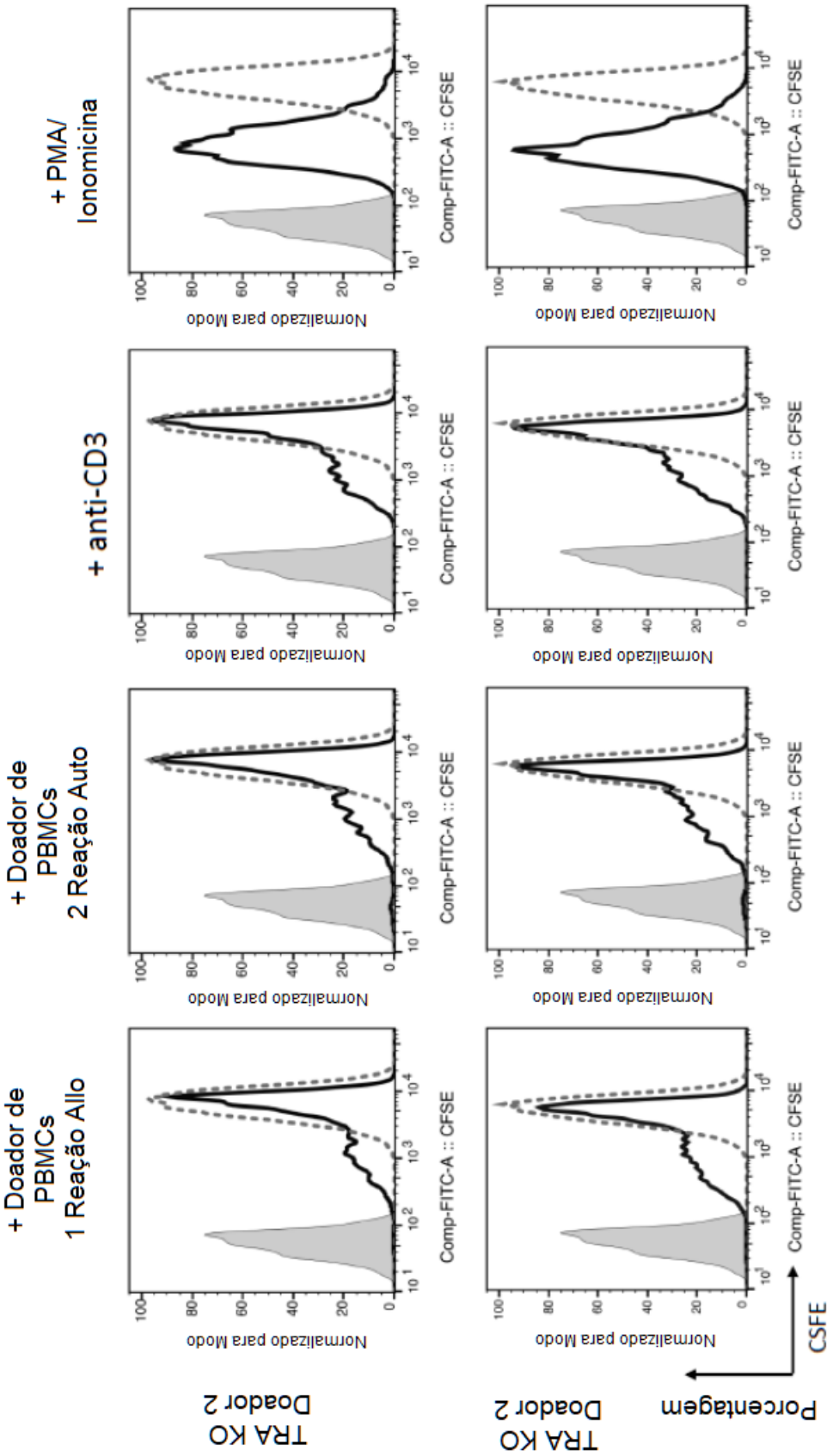

+ Doador de PBMCs 1 Reação Allo
+ Doador de PBMCs 2 Reação Auto
+ anti-CD3
+ PMA/ Ionomicina
TRA KO Doador 2
TRA KO Doador 2
Porcentagem
CSFE
Normalizado para Modo
Comp-FITC-A :: CFSE

FIG. 4

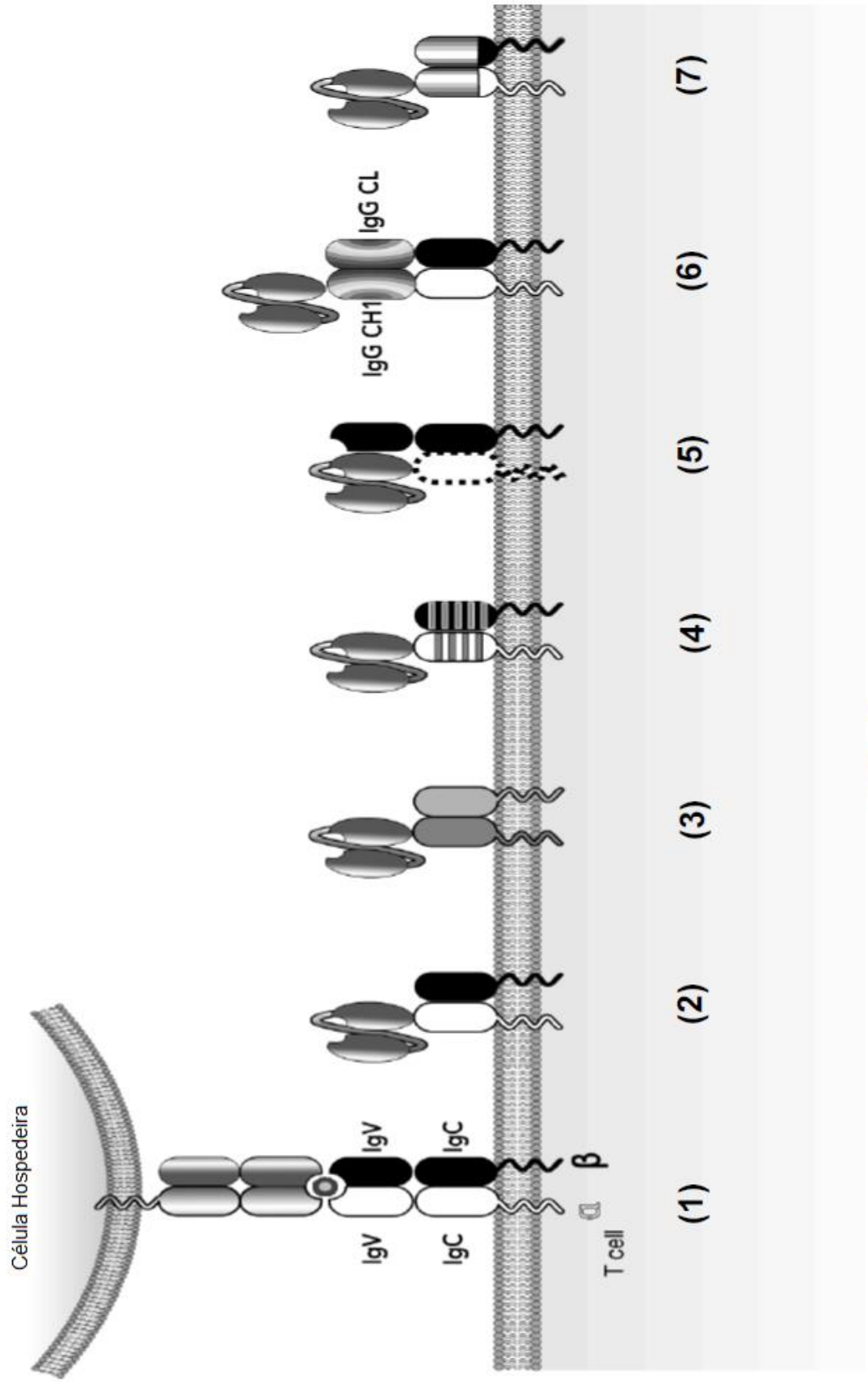

Célula Hospedeira
IgV
IgC
IgV
IgC
α
β
T cell
IgG CH1
IgG CL
(1)
(2)
(3)
(4)
(5)
(6)
(7)

FIG. 5

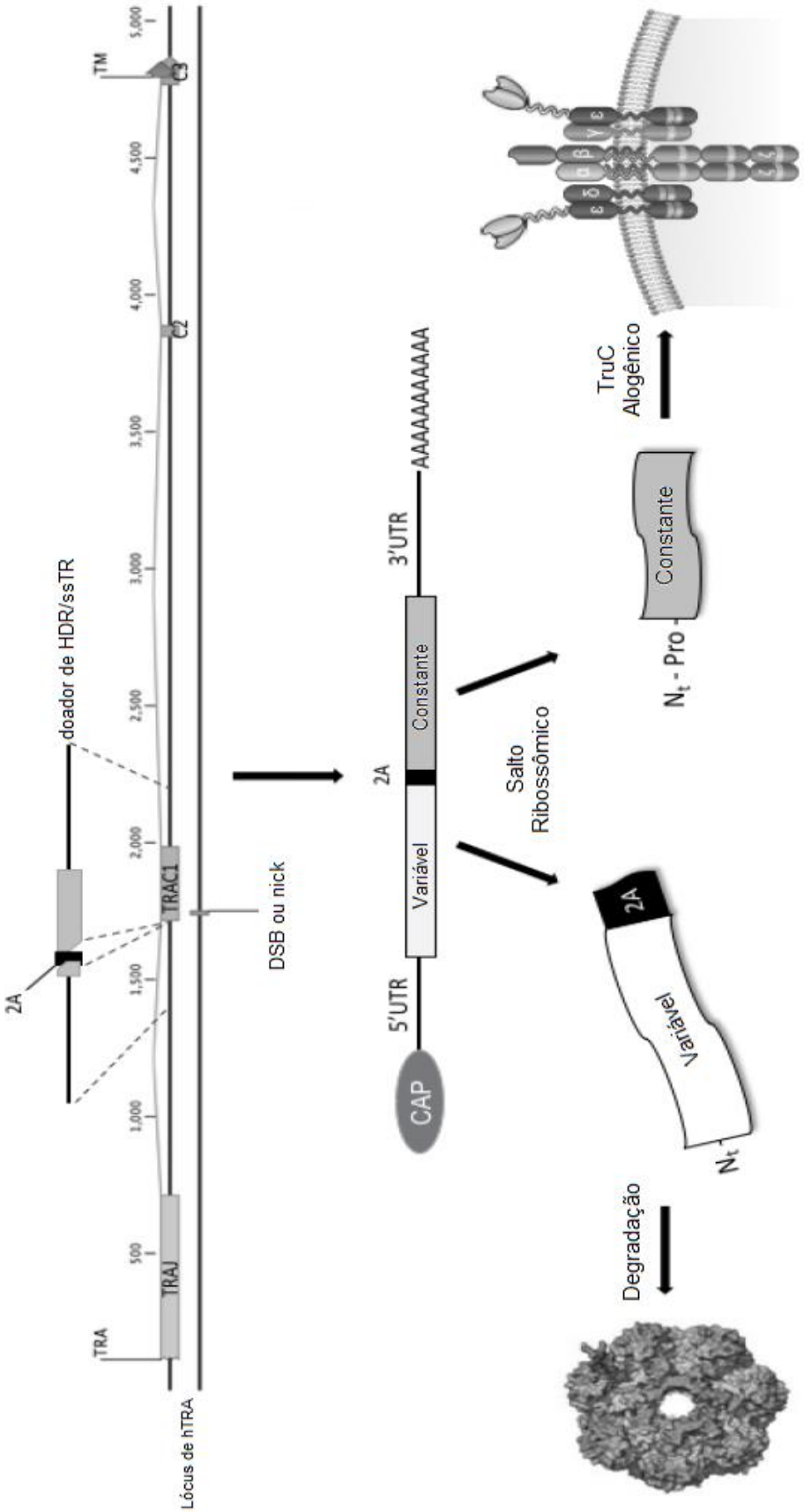

TM
C3
C2
TRAC1
TRAJ
TRA
Lócus de hTRA
doador de HDR/ssTR
2A
DSB ou nick
5'UTR
CAP
Variável
2A
Constante
3'UTR
AAAAAAAAAA
Salto Ribossômico
2A
Variável
Nt
Degradação
Nt - Pro
Constante
TruC Alogênico

FIG. 6

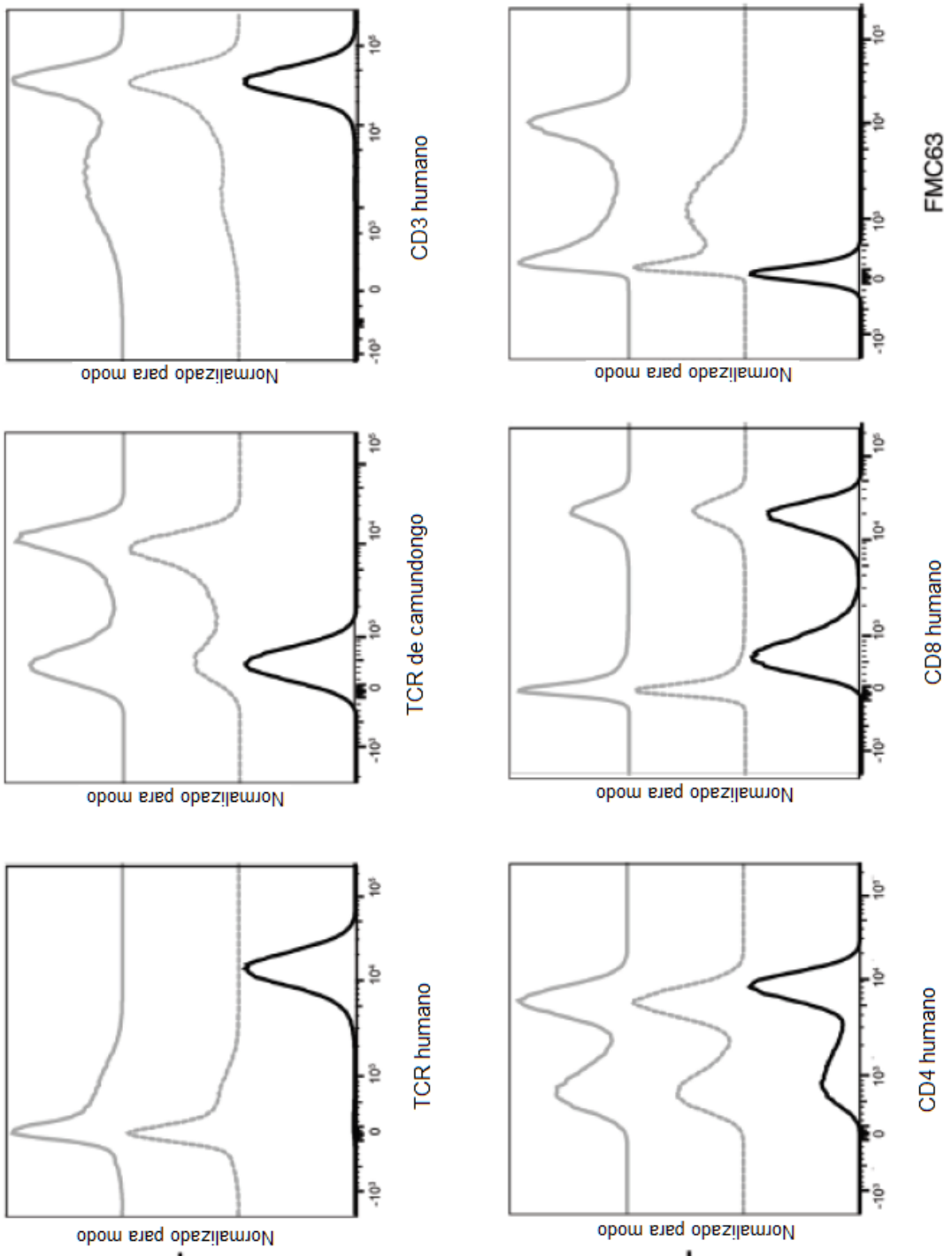

Allo E-TFP T
Allo ab-TFP T
WT
Normalizado para modo
TCR humano
TCR de camundongo
CD3 humano
CD4 humano
CD8 humano
FMC63

FIG. 7

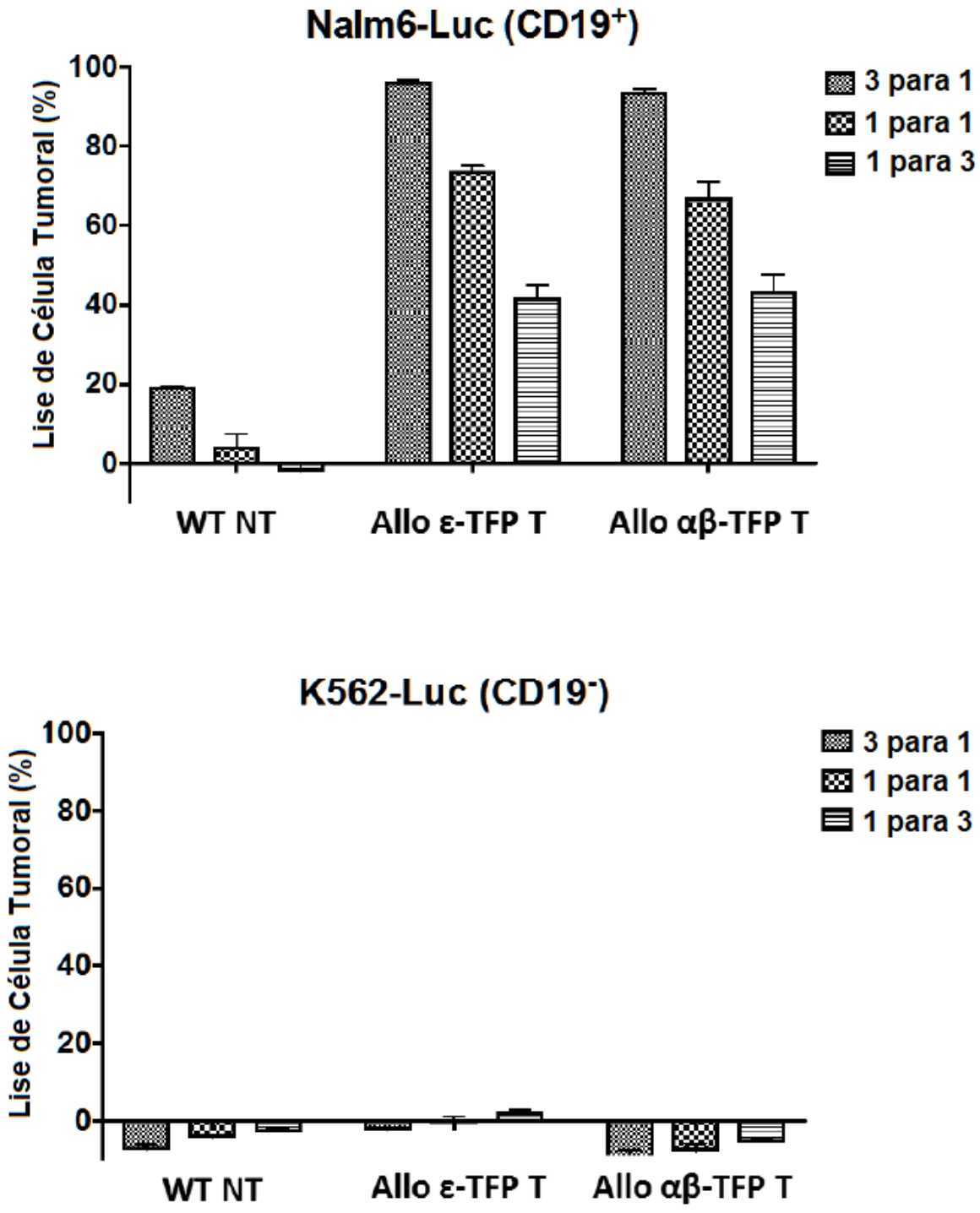

Nalm6-Luc (CD19+)
Lise de Célula Tumoral (%)
100
80
60
40
20
0
3 para 1
1 para 1
1 para 3
WT NT
Allo ε-TFP T
Allo αβ-TFP T
K562-Luc (CD19-)
Lise de Célula Tumoral (%)
100
80
60
40
20
0
3 para 1
1 para 1
1 para 3
WT NT
Allo ε-TFP T
Allo αβ-TFP T

FIG. 8

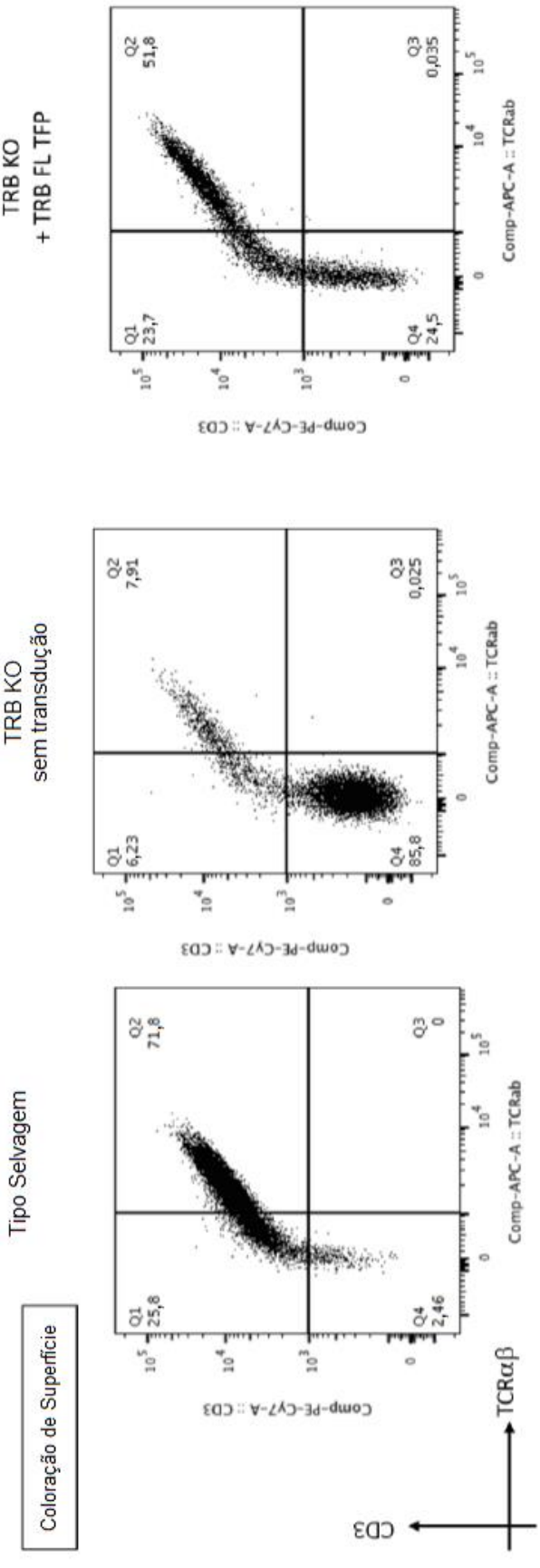


FIG. 9A

FIG. 9B

FIG. 9C

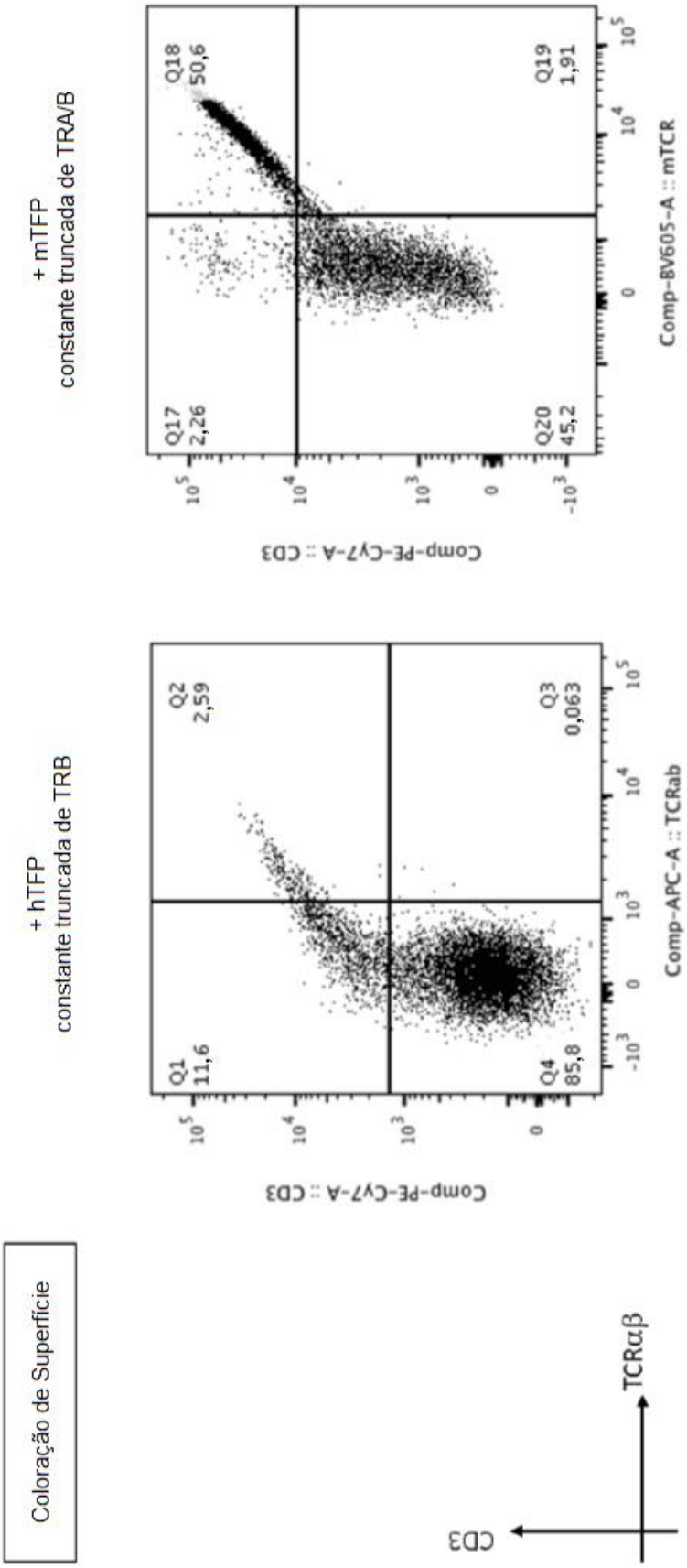


FIG. 10A

FIG. 10B

RESUMO

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REPROGRAMAÇÃO DE TCR USANDO PROTEÍNAS DE FUSÃO

São fornecidos no presente documento ácidos nucleicos recombinantes que codificam proteínas de fusão (TFPs) de receptor de célula T (TCR) e um domínio constante de TCR, células T modificadas que expressam as moléculas codificadas e métodos para uso dos mesmos para o tratamento de doenças incluindo câncer.

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

Código de Controle

Campo 1

Campo 2

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 202001155 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 05/04/2021
- Hora de Geração do Código: 15:46:17
- Código de Controle:
  - Campo 1: 44A1B8E9EEFACC78
  - Campo 2: E3F9C9BA4C7961DE