



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

(21) BR 112020020857-4 A2



(22) Data do Depósito: 10/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 19/01/2021

(54) Título: RECEPTORES QUIMÉRICOS PARA DLL3 E MÉTODOS DE SEU USO

(51) Int. Cl.: A61P 35/00; C07K 16/28; C07K 16/30.

(30) Prioridade Unionista: 10/04/2018 US 62/655,725.

(71) Depositante(es): AMGEN INC.; KITE PHARMA, INC..

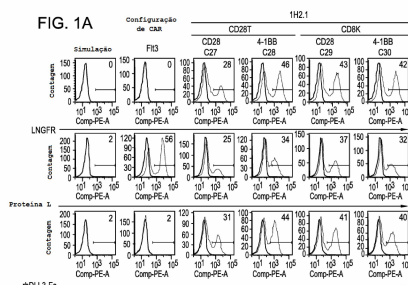
(72) Inventor(es): MICHAEL JOHN GIFFIN; MELISSA THOMAS; CHRISTOPHER MURAWSKY; RYAN BENJAMIN CASE; LAWREN WU; JED WILTZIUS; RUBEN ALVAREZ RODRIGUEZ; JUN FENG.

(86) Pedido PCT: PCT US2019026840 de 10/04/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/200007 de 17/10/2019

(85) Data da Fase Nacional: 09/10/2020

(57) Resumo: Moléculas de ligação ao antígeno, receptores quiméricos e células imunitárias manipuladas para DLL3 são divulgados de acordo com a invenção. A invenção se relaciona adicionalmente com vetores, composições e métodos de tratamento e/ou detecção usando as moléculas de ligação ao antígeno para DLL3 e células imunitárias manipuladas.



RECEPTORES QUIMÉRICOS PARA DLL3 E MÉTODOS DE SEU USO**PEDIDOS RELACIONADOS**

[0001] É reivindicada prioridade em relação ao Pedido de Patente Provisório dos E.U.A. No. 62/655,725, depositado a 10 de abril, 2018, os conteúdos inteiros do qual são incorporados aqui por referência.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi submetida eletronicamente em formato ASCII e é deste modo incorporada por referência em sua totalidade. A referida cópia ASCII, criada a 10 de abril, 2019, é intitulada A-2249-WO-PCT_SL.txt e tem 86,327 bytes em tamanho.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] O câncer de pulmão de pequenas células (SCLC) é responsável por cerca de 15% de todos os casos de câncer de pulmão diagnosticados, mas é uma forma agressiva de carcinoma de pulmão (Enstone *et al.*, (2017) *Pharmacoecon Open* doi: 10.1007/s41669-017-0045-0; Bunn *et al.* (2016) *J Thorac Oncol*; 11: 453-74; Siegel *et al.*, (2016) *CA Cancer J Clin*; 66: 7-30). Delta-like 3 (DLL3) é um membro da família Delta/Serrate/Lag-2 de ligandos para o receptor Notch e se pensa que desempenha um papel na sinalização Notch. DLL3 é um ligando inibidor da via de sinalização Notch normalmente expresso exclusivamente em membranas intracelulares (Geffers *et al.* (2007) *J Cell Biol*; 178: 465-76.). Ortólogos da proteína DLL3 representativos incluem, mas não estão limitados a, humano (Nos. de Acesso NP_058637 e NP_982353), chimpanzé (No. de Acesso XP_003316395), camundongo (No. de Acesso NP_031892) e rato (No. de Acesso NP_446118). Em

humanos, o gene DLL3 consiste em 8 éxons abrangendo 9,5 kPb localizados no cromossomo 19q13. O *splicing* alternativo dentro do último éxon dá origem a dois transcritos processados, um de 2389 bases (No. de Acesso NM_016941) e um de 2052 bases (No. de Acesso NM_203486). O primeiro transcrito codifica uma proteína de 618 aminoácidos (No. de Acesso NP 058637; SEQ ID NO:29), ao passo que o último codifica uma proteína de 587 aminoácidos (No. de Acesso NP 982353; SEQ ID NO:30). Em certos cânceres, tais como SCLC, foi descoberto que DLL3 era expresso na superfície celular, o tornando uma proteína de superfície celular altamente seletiva de tumores (Saunders *et al.* (2015) *Sci Transl Med*; 7: 302ra136.).

[0004] Foi mostrado que as células imunitárias manipuladas possuem qualidades desejadas em tratamentos terapêuticos, particularmente em oncologia. Dois tipos principais de células imunitárias manipuladas são aquelas que contêm receptores de antígenos quiméricos (denominados "CARs" ou "CAR-Ts") e receptores de células T ("TCRs"). Estas células modificadas são manipuladas para as dotar com especificidade de antígeno enquanto retêm ou intensificam sua capacidade de reconhecer e matar uma célula alvo. Os receptores de antígenos quiméricos podem compreender, por exemplo, (i) um componente específico do antígeno ("molécula de ligação ao antígeno"), (ii) um ou mais domínios coestimuladores e (iii) um ou mais domínios de ativação. Cada domínio pode ser heterogêneo, isto é, compreendido por sequências derivadas de diferentes cadeias de proteínas. Células imunitárias expressando receptores de antígenos quiméricos (tais como células T) podem ser usadas em várias

terapias, incluindo terapias contra o câncer. Será apreciado que polipeptídeos coestimuladores como definido aqui podem ser usados para intensificar a ativação de células expressando CAR contra antígenos alvo e, portanto, aumentar a potência da imunoterapia adotiva.

[0005] As células T podem ser manipuladas para possuir especificidade para um ou mais alvos desejados. Por exemplo, as células T podem ser transduzidas com DNA ou outro material genético codificando uma molécula de ligação ao antígeno, tal como um ou mais fragmentos variáveis de cadeia simples ("scFv") de um anticorpo, em conjunção com uma ou mais moléculas de sinalização e/ou um ou mais domínios de ativação, tais como CD3 zeta.

[0006] Adicionalmente à capacidade das células CAR-T de reconhecer e destruir as células visadas, a terapia com células T bem-sucedida beneficia da capacidade das células CAR-T de persistir e manter a capacidade de proliferar em resposta ao antígeno.

[0007] Existe uma necessidade de se identificarem terapias novas e melhoradas para tratamento de doenças e disfunções relacionadas com DLL3.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0008] A invenção se relaciona com células imunitárias manipuladas (tais como CARs ou TCRs), moléculas de ligação ao antígeno (incluindo, mas não se limitando a, anticorpos, scFvs, cadeias pesadas e/ou leves e CDRs destas moléculas de ligação ao antígeno) com especificidade para DLL3.

[0009] Os receptores de antígenos quiméricos da invenção compreendem tipicamente: (i) uma molécula de ligação ao antígeno específica de DLL3, (ii) um ou mais domínios

coestimuladores e (iii) um ou mais domínios de ativação. Será apreciado que cada domínio pode ser heterogêneo, logo compreendido por sequências derivadas de diferentes cadeias de proteínas.

[0010] Em algumas modalidades, a invenção se relaciona com um receptor de antígeno quimérico compreendendo uma molécula de ligação ao antígeno que se liga especificamente a DLL3, em que a molécula de ligação ao antígeno compreende pelo menos uma de: (a) uma CDR1 de cadeia pesada variável compreendendo uma sequência de aminoácidos diferindo daquela de SEQ ID NO:42 ou SEQ ID NO:52 ou SEQ ID NO:62 em não mais do que 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos; (b) uma CDR2 de cadeia pesada variável compreendendo uma sequência de aminoácidos diferindo daquela de SEQ ID NO:43 ou SEQ ID NO:53 ou SEQ ID NO:63 em não mais do que 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos; (c) uma CDR3 de cadeia pesada variável compreendendo uma sequência de aminoácidos diferindo daquela de SEQ ID NO:44 ou SEQ ID NO:54 ou SEQ ID NO:64 em não mais do que 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos; (d) uma CDR1 de cadeia leve variável compreendendo uma sequência de aminoácidos diferindo daquela de SEQ ID NO:47 ou SEQ ID NO:57 ou SEQ ID NO:67 em não mais do que 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos; (e) uma CDR2 de cadeia leve variável compreendendo uma sequência de aminoácidos diferindo daquela de SEQ ID NO:48 ou SEQ ID NO:58 ou SEQ ID NO:68 em não mais do que 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos; (f) uma CDR3 de cadeia leve variável compreendendo uma sequência de aminoácidos diferindo daquela de SEQ ID NO:49 ou SEQ ID NO:59 ou SEQ ID NO:69 em não mais do que 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos.

[0011] Em outras modalidades, o receptor de antígeno quimérico compreende adicionalmente pelo menos um domínio coestimulador. Em modalidades adicionais, o receptor de antígeno quimérico compreende adicionalmente pelo menos um domínio de ativação.

[0012] Em certas modalidades, o domínio coestimulador é uma região de sinalização de CD28, CD28T, CD8, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, Morte Programada-1 (PD-1), coestimulador indutível de células T (ICOS), antígeno-1 associado à função de linfócitos (LFA-1, CD11a/CD18), CD3 gama, CD3 delta, CD3 épsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gama, molécula de MHC classe 1, proteínas receptoras de TNF, uma Proteína de imunoglobulina, receptor de citocina, integrinas, Moléculas de Ativação Linfocítica de Sinalização (proteínas SLAM), receptores de células NK de ativação, BTLA, um receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gama, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tátil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, um ligando que se liga especificamente a CD83 ou qualquer sua combinação.

[0013] Em algumas modalidades, o domínio coestimulador é derivado de 4-1BB. Em outras modalidades, o domínio coestimulador é derivado de CD28 ou CD28T. Em outras modalidades, o domínio coestimulador é derivado de CD8. Em outras modalidades, o domínio coestimulador é derivado de OX40. Ver também Hombach *et al.*, *Oncoimmunology*. 1 jul. 2012; 1 (4): 458-466. Em ainda outras modalidades, o domínio coestimulador compreende ICOS como descrito em Guedan *et al.*, 14 de agosto, 2014; *Blood*: 124 (7) e Shen *et al.*, *Journal of Hematology & Oncology* (2013) 6: 33. Em ainda outras modalidades, o domínio coestimulador compreende CD27 como descrito em Song *et al.*, *Oncoimmunology*. 1 jul. 2012; 1 (4): 547-549.

[0014] Em certas modalidades, o domínio coestimulador CD28 compreende SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8. Em modalidades adicionais, o domínio coestimulador CD8 compreende SEQ ID NO:14. Em modalidades adicionais, o domínio coestimulador 4-1BB compreende SEQ ID NO:16. Em outras modalidades, o domínio de ativação compreende CD3, CD3 zeta ou CD3 zeta tendo a sequência apresentada em SEQ ID NO:10.

[0015] Em outras modalidades, a invenção se relaciona com um receptor de antígeno quimérico em que o domínio coestimulador compreende SEQ ID NO:2 e o domínio de ativação compreende SEQ ID NO:10.

[0016] A invenção se relaciona adicionalmente com polinucleotídeos codificando os receptores de antígenos quiméricos e vetores compreendendo os polinucleotídeos. O vetor pode ser, por exemplo, um vetor retroviral, um vetor de DNA, um plasmídeo, um vetor de RNA, um vetor adenoviral,

um vetor associado a adenovírus, um vetor lentiviral ou qualquer sua combinação. A invenção se relaciona adicionalmente com células imunitárias compreendendo os vetores. Em algumas modalidades, o vetor lentiviral é um vetor pGAR.

[0017] Células imunitárias exemplificativas incluem, mas não estão limitadas a células T, linfócitos infiltrantes de tumores (TILs), células NK, células expressando TCR, células dendríticas ou células NK-T. As células T podem ser autólogas, alogênicas ou heterólogas. Em outras modalidades, a invenção se relaciona com composições farmacêuticas compreendendo as células imunitárias descritas aqui.

[0018] Em certas modalidades, a invenção se relaciona com moléculas de ligação ao antígeno (e receptores de antígenos quiméricos compreendendo estas moléculas) compreendendo pelo menos uma de:

(a) uma região VH diferindo da sequência de aminoácidos da região VH de 1H2.1 em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos e uma região VL diferindo da sequência de aminoácidos da região VL de 1H2.1 em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos;

(b) uma região VH diferindo da sequência de aminoácidos da região VH de 8D2 em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos e uma região VL diferindo da sequência de aminoácidos da região VL de 8D2 em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos;

(c) uma região VH diferindo da sequência de aminoácidos da região VH de 6B2 em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3,

2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos e uma região VL diferindo da sequência de aminoácidos da região VL de 6B2 em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos;

e em que a região ou regiões VH e VL estão ligadas por pelo menos um ligante.

[0019] Em outras modalidades, a invenção se relaciona com moléculas de ligação ao antígeno (e receptores de antígenos quiméricos compreendendo estas moléculas) em que o ligante compreende pelo menos um do ligante G4S de scFv e o ligante Whitlow de scFv.

[0020] Em outras modalidades, a invenção se relaciona com vetores codificando os polipeptídeos da invenção e com células imunitárias compreendendo estes polipeptídeos. Células imunitárias preferenciais incluem células T, linfócitos infiltrantes de tumores (TILs), células NK, células expressando TCR, células dendríticas ou células NK-T. As células T podem ser autólogas, alogênicas ou heterólogas.

[0021] Em outras modalidades, a invenção se relaciona com polinucleotídeos isolados codificando um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de células T (TCR) compreendendo uma molécula de ligação ao antígeno que se liga especificamente a DLL3, em que a molécula de ligação ao antígeno compreende uma CDR3 de cadeia pesada variável (V_H) compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:44 ou SEQ ID NO:54 ou SEQ ID NO:64. Os polinucleotídeos podem compreender adicionalmente um domínio de ativação. Em modalidades preferenciais, o domínio de ativação é CD3, mais

preferencialmente CD3 zeta, mais preferencialmente a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO:9.

[0022] Em outras modalidades, a invenção inclui um domínio coestimulador, tal como CD28, CD28T, OX40, CD8, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (alfa, beta, delta, épsilon, gama, zeta), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD 33, CD37, CD40, CD 45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, antígeno-1 associado à função de linfócitos (LFA-1 (CD1 1a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (membro da superfamília de fatores de necrose tumoral 14; TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gama, molécula de MHC classe I, TNF, TNFr, integrina, molécula de ativação linfocítica de sinalização, BTLA, receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gama, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1 1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 1a, LFA-1, ITGAM, CD1 1b, ITGAX, CD1 1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tátil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, ligando de CD83 ou suas combinações. Domínios coestimuladores preferenciais são recitados em baixo.

[0023] Em modalidades adicionais, a invenção se relaciona com polinucleotídeos isolados codificando um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de células T (TCR), em que o referido CAR ou TCR compreende uma molécula de ligação

ao antígeno que se liga especificamente a DLL3, e em que a molécula de ligação ao antígeno compreende uma CDR3 de cadeia leve variável (V_L) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:57 e SEQ ID NO:67. O polinucleotídeo pode compreender adicionalmente um domínio de ativação. O polinucleotídeo pode compreender adicionalmente um domínio coestimulador.

[0024] Em outras modalidades, a invenção se relaciona com polinucleotídeos isolados codificando um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de células T (TCR) compreendendo uma molécula de ligação ao antígeno que se liga especificamente a DLL3, em que a cadeia pesada da molécula de ligação ao antígeno compreende CDR1 (SEQ ID NO:42), CDR2 (SEQ ID NO:43) e CDR3 (SEQ ID NO:44) e a cadeia leve da molécula de ligação ao antígeno compreende CDR1 (SEQ ID NO:47), CDR2 (SEQ ID NO:48) e CDR3 (SEQ ID NO:49).

[0025] Em outras modalidades, a invenção se relaciona com polinucleotídeos isolados codificando um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de células T (TCR) compreendendo uma molécula de ligação ao antígeno que se liga especificamente a DLL3, em que a cadeia pesada da molécula de ligação ao antígeno compreende CDR1 (SEQ ID NO:52), CDR2 (SEQ ID NO:53) e CDR3 (SEQ ID NO:54) e a cadeia leve da molécula de ligação ao antígeno compreende CDR1 (SEQ ID NO:57), CDR2 (SEQ ID NO:58) e CDR3 (SEQ ID NO:59).

[0026] Em outras modalidades, a invenção se relaciona com polinucleotídeos isolados codificando um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de células T (TCR) compreendendo uma molécula de ligação ao antígeno que se liga especificamente a DLL3, em que a cadeia pesada da

molécula de ligação ao antígeno compreende CDR1 (SEQ ID NO:62), CDR2 (SEQ ID NO:63) e CDR3 (SEQ ID NO:64) e a cadeia leve da molécula de ligação ao antígeno compreende CDR1 (SEQ ID NO:67), CDR2 (SEQ ID NO:68) e CDR3 (SEQ ID NO:69).

[0027] A invenção se relaciona adicionalmente com moléculas de ligação ao antígeno para DLL3 compreendendo pelo menos uma sequência de CDR3 de cadeia pesada variável ou CDR3 de cadeia leve variável como apresentado aqui. A invenção se relaciona adicionalmente com moléculas de ligação ao antígeno para DLL3 compreendendo pelo menos uma sequência de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada variável como apresentado aqui. A invenção se relaciona adicionalmente com moléculas de ligação ao antígeno para DLL3 compreendendo pelo menos uma sequência de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve variável como apresentado aqui. A invenção se relaciona adicionalmente com moléculas de ligação ao antígeno para DLL3 compreendendo tanto sequências de CDR1, CDR2, CDR3 de cadeia pesada variável como CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve variável como apresentado aqui.

[0028] Domínios variáveis de cadeia pesada e leve e sequências de polinucleotídeos e aminoácidos de CDR adicionais adequados para uso em moléculas de ligação a DLL3 de acordo com a presente invenção são encontrados no Pedido Provisório dos E.U.A. Número 62/199,944, depositado a 31 de julho, 2015.

[0029] A invenção se relaciona adicionalmente com métodos de tratamento de uma doença ou disfunção em um sujeito com sua necessidade compreendendo administração ao sujeito das moléculas de ligação ao antígeno, dos CARs, TCRs, polinucleotídeos, vetores, células ou composições de acordo

com a invenção. Doenças adequadas para tratamento incluem, mas não estão limitadas a, adrenal, fígado, rim, bexiga, mama, gástrico, ovário, cervical, uterino, esofágico, colorretal, próstata (p.ex., adenocarcinoma de próstata), pancreático, pulmão (tanto pequenas células como não pequenas células), tireoide, carcinomas, sarcomas, glioblastomas, tumores de cabeça e pescoço, carcinoma neuroendócrino de células grandes (LCNEC), câncer medular de tireoide, glioblastoma, câncer neuroendócrino de próstata (NEPC), câncer gastroenteropancreático de elevado grau (GEP) e melanoma maligno.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0030] FIG. 1, ilustra a expressão de CARs de DLL3 em células T de um dador saudável.

[0031] FIG. 2, ilustra a atividade citolítica de células T CAR transduzidas por lentivírus de dador saudável.

[0032] FIG. 3, ilustra a produção de citocinas por células T CAR de um dador saudável.

[0033] FIG. 4, ilustra a análise citométrica de fluxo da proliferação de células T em resposta a células alvo expressando DLL3.

[0034] FIG. 5, ilustra a atividade antitumoral *in vivo* de células T CAR de DLL3 em modelo xenogênico de camundongo de SCLC humano.

[0035] FIG. 6, ilustra a análise de sobrevivência de modelo xenogênico de SCLC de camundongo após tratamento com células T CAR de DLL3.

[0036] FIG. 7, ilustra o mapa do vetor pGAR.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0037] Será apreciado que os receptores de antígenos quiméricos (CARs ou CAR-Ts) e receptores de células T (TCRs) são receptores geneticamente modificados. Estes receptores modificados podem ser prontamente inseridos e expressos por células imunitárias, incluindo células T, de acordo com técnicas conhecidas na técnica. Com um CAR, um único receptor pode ser programado tanto para reconhecer um antígeno específico como para, quando ligado a esse antígeno, ativar a célula imunitária para atacar e destruir a célula transportando esse antígeno. Quando estes antígenos existem nas células tumorais, uma célula imunitária que expressa o CAR pode visar e matar a célula tumoral.

[0038] Os CARs podem ser manipulados para se ligarem a um antígeno (tal como um antígeno da superfície celular) por incorporação de uma molécula de ligação ao antígeno que interage com esse antígeno visado. Preferencialmente, a molécula de ligação ao antígeno é um seu fragmento de anticorpo e, mais preferencialmente, um ou mais fragmentos de anticorpo de cadeia única ("scFv"). Um scFv é um fragmento de anticorpo de cadeia única tendo as regiões variáveis das cadeias pesada e leve de um anticorpo ligadas entre si. Ver Patentes dos E.U.A. Nos. 7,741,465 e 6,319,494 bem como Eshhar *et al.*, *Cancer Immunol Immunotherapy* (1997) 45: 131-136. Um scFv retém a capacidade do anticorpo original de interagir especificamente com o antígeno alvo. Os scFvs são preferenciais para uso em receptores de antígenos quiméricos porque podem ser manipulados para serem expressos como parte de uma única cadeia em conjunto com os outros componentes de CAR. *Id.* Ver também Krause *et al.*, *J. Exp. Med.*, Volume 188,

No. 4, 1998 (619-626); Finney *et al.*, *Journal of Immunology*, 1998, 161: 2791-2797. Será apreciado que a molécula de ligação ao antígeno está tipicamente contida dentro da porção extracelular do CAR tal que seja capaz de reconhecer o e se ligar ao antígeno de interesse. CARs biespecíficos e multiespecíficos são contemplados dentro do escopo da invenção, com especificidade para mais do que um alvo de interesse.

[0039] Domínios Coestimuladores. Os receptores de antígenos quiméricos podem incorporar domínios coestimuladores (de sinalização) para aumentar sua potência. Ver Patentes dos E.U.A. Nos. 7,741,465 e 6,319,494, bem como Krause *et al.* e Finney *et al.* (*supra*), Song *et al.*, *Blood* 119: 696-706 (2012); Kalos *et al.*, *Sci Transl. Med.* 3: 95 (2011); Porter *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 365: 725-33 (2011) e Gross *et al.*, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56: 59-83 (2016). Por exemplo, CD28 é uma proteína coestimuladora encontrada naturalmente nas células T. A sequência de aminoácidos nativa completa de CD28 é descrita em NCBI Reference Sequence: NP_006130.1. A sequência de ácidos nucleicos nativa completa de CD28 é descrita em NCBI Reference Sequence: NM_006139.1.

[0040] Certos domínios CD28 foram usados em receptores de antígenos quiméricos. De acordo com a invenção foi agora descoberto que um novo domínio extracelular de CD28, denominado "CD28T", proporciona inesperadamente certos benefícios quando utilizado em um construto de CAR.

[0041] A sequência de nucleotídeos da molécula CD28T, incluindo o domínio extracelular CD28T e os domínios

transmembranar e intracelular de CD28, é apresentada em SEQ ID NO:1:

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACCGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCC
GTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTTCGTAGTGGGTGGAG
TCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTAGATCC
AAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCC
CACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGC

[0042] A sequência de aminoácidos correspondente é apresentada em SEQ ID NO:2:

LDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVWLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRS
KRSRLLHSDYM NMTPRRPGPT RKHYQPYAPP RDFAAAYS

[0043] A sequência de nucleotídeos da porção extracelular de CD28T é apresentada em SEQ ID NO:3:

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACCGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCC
GTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCA

[0044] A sequência de aminoácidos correspondente do domínio extracelular CD28T é apresentada em SEQ ID NO:4:

LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSK

[0045] A sequência de nucleotídeos do domínio transmembranar de CD28 é apresentada em SEQ ID NO:5:

TTCTGGGTGTTGGTTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGT
GGCTTTTATAATCTTCTGGGTT

[0046] A sequência de aminoácidos do domínio transmembranar CD28 é apresentada em

SEQ ID NO:6: FWVLVVVGGV LACYLLVTV AFIIFWV

[0047] A sequência de nucleotídeos do domínio de sinalização intracelular de CD28 é apresentada em SEQ ID NO:7:

AGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCC
 TGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATC
 GGAGC

[0048] A sequência de aminoácidos do domínio de sinalização intracelular de CD28 é apresentada em SEQ ID NO:8: RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

[0049] Sequências de CD28 adicionais adequadas para uso na invenção incluem a sequência de nucleotídeos de CD28 apresentada em SEQ ID NO:11:

ATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACGGTACCATCAT
 TCACGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCCTTCTCCCCTCTTCCCCGGGCCATCAAAGCCC

[0050] A sequência de aminoácidos correspondente é apresentada em SEQ ID NO:12:

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKP

[0051] Outras sequências extracelulares ou transmembranares adequadas podem ser derivadas de CD8. A sequência de nucleotídeos de um domínio extracelular e transmembranar de CD8 adequado é apresentada em SEQ ID NO:13:

GCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTACCAGTGTTCTTGCC
 GGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACCCCAGCTCCTACCATCGCTT
 CACAGCCTCTGTCCCTGCGCCAGAGGCTTGCCGACCGGCCGAGGGGGCGCTGTTCAT
 ACCAGAGGACTGGATTTTCGCTGCGATATCTATATCTGGGCACCCCTGGCCGGAACCTG
 CGGCGTACTCCTGCTGTCCCTGGTCATCACGCTCTATTGTAATCACAGGAAC

[0052] A sequência de aminoácidos correspondente é apresentada em SEQ ID NO:14:

AAALSNSIMYFSHFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH
 TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCNHRN

[0053] Outras sequências de sinalização extracelulares adequadas podem ser derivadas de 41-BB. A sequência de

nucleotídeos de um domínio de sinalização intracelular de 41-BB adequada é apresentada em SEQ ID NO:15:

```
CGCTTTTCCGTCGTTAAGCGGGGAGAAAAAGCTGCTGTACATTTTCAAACAGCCGTT
TATGAGGCCGGTCCAAACGACTCAGGAAGAGGACGGCTGCTCCTGCCGCTTTCCTGAGG
AGGAGGAGGGCGGGTGCGAACTG
```

[0054] A sequência de aminoácidos correspondente é apresentada em SEQ ID NO:16:

```
RFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
```

[0055] Domínios coestimuladores adequados dentro do escopo da invenção podem ser derivados de, entre outras fontes, CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (alfa, beta, delta, épsilon, gama, zeta), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD 33, CD37, CD40, CD 45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, antígeno-1 associado à função de linfócitos (LFA-1 (CD11a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (membro da superfamília de fatores de necrose tumoral 14; TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gama, molécula de MHC classe I, TNF, TNFr, integrina, molécula de ativação linfocítica de sinalização, BTLA, receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gama, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tátil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT,

GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, ligando de CD83 ou suas combinações.

Domínios de Ativação.

[0056] CD3 é um elemento do receptor de células T nas células T nativas e foi mostrado como sendo um importante elemento de ativação intracelular em CARs. Em uma modalidade preferencial, o CD3 é CD3 zeta, a sequência de nucleotídeos do qual é apresentada em SEQ ID NO:9:

```
AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACT
GTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAG
GACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAACCCCAGGAGGGTCTCTAT
AATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGA
GCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGG
ATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG
```

[0057] A aminoácidos correspondentes de CD3 zeta intracelular é apresentada em SEQ ID NO:10:

```
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLGGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
```

ORIENTAÇÃO DOS DOMÍNIOS

[0058] Estruturalmente será apreciado que estes domínios correspondem a localizações relativas à célula imunitária. Assim, estes domínios podem ser parte do (i) domínio de "charneira" ou extracelular (EC), (ii) domínio transmembranar (TM) e/ou (iii) domínio intracelular (citoplasmático) (IC). O componente intracelular compreende frequentemente em parte um membro da família de CD3, preferencialmente CD3 zeta, que é capaz de ativar a célula T após ligação da molécula de ligação ao antígeno ao seu alvo. Em uma modalidade, o domínio de charneira é tipicamente

compreendido por pelo menos um domínio coestimulador como definido aqui.

[0059] Será também apreciado que a região de charneira pode também conter alguns dos ou todos de um membro da família das imunoglobulinas tais como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, IgM ou seu fragmento.

[0060] Construtos de CAR exemplificativos de acordo com a invenção são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1

Nome do Construto	scFv	Domínio Coestimulador	Domínio de Ativação
1H2.1 CD28T	1H2.1	CD28T	CD3 zeta
1H2.1 4-1BB	1H2.1	4-1BB	CD3 zeta
8D2 CD28T	8D2	CD28T	CD3 zeta
8D2 4-1BB	8D2	4-1BB	CD3 zeta
6B2 CD28T	6B2	CD28T	CD3 zeta
6B2 4-1BB	6B2	4-1BB	CD3 zeta

DOMÍNIOS EM RELAÇÃO À CÉLULA

[0061] Será apreciado que, em relação à célula transportando o receptor, as células T manipuladas da invenção compreendem uma molécula de ligação ao antígeno (tal como um scFv), um domínio extracelular (que pode compreender um domínio de "charneira"), um domínio transmembrantar e um domínio intracelular. O domínio intracelular compreende pelo menos em parte um domínio de ativação, preferencialmente composto por um membro da família de CD3 tal como CD3 zeta, CD3 épsilon, CD3 gama ou suas porções. Será adicionalmente apreciado que a molécula de ligação ao antígeno (p.ex., um ou mais scFvs) é manipulada tal que esteja localizada na porção extracelular da

molécula/construto, tal que seja capaz de reconhecer o e se ligar ao seu alvo ou alvos.

[0062] Domínio Extracelular. O domínio extracelular é benéfico para sinalização e para uma resposta eficiente dos linfócitos a um antígeno. Os domínios extracelulares de uso particular em esta invenção podem ser derivados de (*i.e.*, compreender) CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, morte programada-1 (PD-1), coestimulador indutível de células T (ICOS), antígeno-1 associado à função de linfócitos (LFA-1, CD1-la/CD18), CD3 gama, CD3 delta, CD3 épsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gama, molécula de MHC classe 1, proteínas receptoras de TNF, uma Proteína de imunoglobulina, receptor de citocina, integrinas, Moléculas de Ativação Linfocítica de Sinalização (proteínas SLAM), receptores de células NK de ativação, BTLA, um receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gama, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1 ld, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 la, LFA-1, ITGAM, CD1 lb, ITGAX, CD1 lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tátil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, um ligando que se liga especificamente a CD83 ou qualquer sua combinação. O domínio extracelular pode ser derivado de uma fonte natural ou sintética.

[0063] Conforme descrito aqui, os domínios extracelulares compreendem frequentemente compreendem uma porção de charneira. Esta é uma porção do domínio extracelular, por vezes referida como uma região "espaçadora". Uma variedade de charneiras pode ser empregue de acordo com a invenção, incluindo moléculas coestimuladoras como discutido acima, bem como sequências de imunoglobulina (Ig) ou outras moléculas adequadas para se alcançar a distância especial desejada da célula alvo. Em algumas modalidades, a região extracelular inteira compreende uma região de charneira. Em algumas modalidades, a região de charneira compreende CD28T ou o domínio EC de CD28.

[0064] Domínio Transmembranar. O CAR pode ser desenhado para compreender um domínio transmembranar que é fundido ao domínio extracelular do CAR. Pode ser similarmente fundido ao domínio intracelular do CAR. Em uma modalidade é usado o domínio transmembranar que está naturalmente associado a um dos domínios em um CAR. Em alguns casos, o domínio transmembranar pode ser selecionado ou modificado por substituição de aminoácidos para evitar a ligação de tais domínios aos domínios transmembranares das mesmas proteínas de membrana da superfície ou diferentes proteínas de membrana da superfície para minimizar interações com outros membros do complexo receptor. O domínio transmembranar pode ser derivado de uma fonte natural ou sintética. Quando a fonte é natural, o domínio pode ser derivado de qualquer proteína ligada à membrana ou transmembranar. As regiões transmembranares de uso particular em esta invenção podem ser derivadas de (*i.e.*, compreender) CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, morte programada-1

(PD-1), coestimulador indutível de células T (ICOS), antígeno-1 associado à função de linfócitos (LFA-1, CD11a/CD18), CD3 gama, CD3 delta, CD3 épsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gama, molécula de MHC classe 1, proteínas receptoras de TNF, uma Proteína de imunoglobulina, receptor de citocina, integrinas, Moléculas de Ativação Linfocítica de Sinalização (proteínas SLAM), receptores de células NK de ativação, BTLA, um receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFRR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gama, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tátil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, um ligando que se liga especificamente a CD83 ou qualquer sua combinação.

[0065] Opcionalmente, ligantes curtos podem formar ligações entre qualquer um ou alguns dos domínios extracelular, transmembranar e intracelular do CAR.

[0066] Em uma modalidade, o domínio transmembranar no CAR da invenção é um domínio transmembranar de CD8. Em uma modalidade, o domínio transmembranar de CD8 compreende a porção transmembranar da sequência de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:13. Em outra modalidade, o domínio transmembranar de CD8 compreende a sequência de ácidos nucleicos que

codifica a sequência de aminoácidos transmembranar contida dentro de SEQ ID NO:14.

[0067] Em certas modalidades, o domínio transmembranar no CAR da invenção é o domínio transmembranar de CD28. Em uma modalidade, o domínio transmembranar de CD28 compreende a sequência de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:5. Em uma modalidade, o domínio transmembranar de CD28 compreende a sequência de ácidos nucleicos que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:6. Em outra modalidade, o domínio transmembranar de CD28 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:6.

[0068] **Domínio Intracelular (Citoplasmático)**. O domínio intracelular (citoplasmático) das células T manipuladas da invenção pode proporcionar ativação de pelo menos uma das funções efetoras normais da célula imunitária. A função efetora de uma célula T, por exemplo, pode ser atividade citolítica ou atividade auxiliar incluindo a secreção de citocinas.

[0069] Será apreciado que moléculas intracelulares adequadas incluem (*i.e.*, compreendem), mas não estão limitadas a, CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, morte programada-1 (PD-1), coestimulador indutível de células T (ICOS), antígeno-1 associado à função de linfócitos (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 gama, CD3 delta, CD3 épsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gama, molécula de MHC classe 1, proteínas receptoras de TNF, uma Proteína de imunoglobulina, receptor de citocina, integrinas, Moléculas de Ativação Linfocítica de Sinalização (proteínas SLAM), receptores de células NK de ativação, BTLA, um receptor de

ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gama, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1 ld, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 la, LFA-1, ITGAM, CD1 lb, ITGAX, CD1 lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tátil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, um ligando que se liga especificamente a CD83 ou qualquer sua combinação.

[0070] Em uma modalidade preferencial, o domínio citoplasmático do CAR pode ser manipulado para compreender o domínio de sinalização de CD3 zeta por si só ou combinado com qualquer(qualsquer) outro(s) domínio(s) citoplasmático(s) desejado(s) útil(eis) no contexto do CAR da invenção. Por exemplo, o domínio citoplasmático do CAR pode compreender uma porção de cadeia de CD3 zeta e uma região de sinalização coestimuladora.

[0071] As sequências de sinalização citoplasmáticas dentro da porção de sinalização citoplasmática do CAR da invenção podem estar ligadas umas às outras em uma ordem aleatória ou especificada.

[0072] Em uma modalidade preferencial, o domínio citoplasmático é desenhado para compreender o domínio de sinalização de CD3 zeta e o domínio de sinalização de CD28. Em outra modalidade, o domínio citoplasmático é desenhado para compreender o domínio de sinalização de CD3 zeta e o

domínio de sinalização de 4-1BB, em que o CD28 citoplasmático compreende a sequência de ácidos nucleicos apresentada em SEQ ID NO:15 e a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO:16 . Em outra modalidade, o domínio citoplasmático no CAR da invenção é manipulado para compreender uma porção de CD28 e CD3 zeta, em que o CD28 citoplasmático compreende a sequência de ácidos nucleicos apresentada em SEQ ID NO:7 e a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO:8. A sequência de ácidos nucleicos de CD3 zeta é apresentada em SEQ ID NO:9 e a sequência de aminoácidos é apresentada em SEQ ID NO:8.

[0073] Será apreciado que uma orientação preferencial dos CARs de acordo com a invenção compreende um domínio de ligação ao antígeno (tal como scFv) em tandem com um domínio coestimulador e um domínio de ativação. O domínio coestimulador pode compreender um ou mais de uma porção extracelular, uma porção transmembranar e uma porção intracelular. Será adicionalmente apreciado que múltiplos domínios coestimuladores podem ser utilizados em tandem.

[0074] Em algumas modalidades são proporcionados ácidos nucleicos compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um primeiro polinucleotídeo codificando uma molécula de ligação ao antígeno, pelo menos uma molécula coestimuladora e um domínio de ativação.

[0075] Em algumas modalidades, o construto de ácido nucleico está contido dentro de um vetor viral. Em algumas modalidades, o vetor viral é selecionado do grupo consistindo em vetores retrovirais, vetores do vírus da leucemia murina, vetores SFG, vetores adenovirais, vetores lentivirais, vetores de vírus adenoassociado (AAV), vetores do vírus

Herpes e vetores do vírus vaccínia. Em algumas modalidades, o ácido nucleico está contido dentro de um plasmídeo.

[0076] A invenção se relaciona adicionalmente com polinucleotídeos isolados codificando os receptores de antígenos quiméricos e vetores compreendendo os polinucleotídeos. Qualquer vetor conhecido na técnica pode ser adequado para a presente invenção. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor viral. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor retroviral (tal como pMSVGl), um vetor de DNA, um vetor de vírus da leucemia murina, um vetor SFG, um plasmídeo, um vetor de RNA, um vetor adenoviral, um vetor baculoviral, um vetor viral de Epstein Barr, um vetor papovaviral, um vetor viral de vaccínia, um vetor viral da herpes simplex, um vetor associado a adenovírus (AAV), um vetor lentiviral (tal como pGAR) ou qualquer sua combinação. O mapa do vetor pGAR é mostrado na FIGURA 7. A sequência de pGAR é como se segue:

```
CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTG
ACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCT
CGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCC
GATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAGTTGATTAGGGTGATGGTTCACGT
AGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTT
TAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTT
TTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAA
CAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTGCCATTCGCCATT
CAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGC
TGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAG
TCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGACCC
GGGGATGGCGCGCCAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGC
```

CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTG
ACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATC
ATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTAT
GCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAT
CGCTATTACCATGCTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTG
ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCAC
CAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGG
CGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGGGGTC
TCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGC
TTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGT
GACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAG
TGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAG
GACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGC
CAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATT
AAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAA
AAAATATAAATTA AACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGCAGTTA
ATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCA
TCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTA
TTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGG
AAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCCGCCGCTGATCTTCAGACCTGG
AGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAA
TTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAA
AGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTAT
GGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGC
AGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACA
GTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGA
TCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTCATTTGCACCACTGCTGTGC
CTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGG
ATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGA
ATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAA

GTTTGTGGAATTGGTTTAAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAAATTATTCATAATG
ATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAG
AGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGAC
CCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATT
CGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTTAACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGG
GGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAATAAAG
AATTACAAAACAAATTACAAAATTCAAATTTTATCGCGATCGCGGAATGAAAGACCC
CACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAATAC
ATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGAATATGG
GCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATG
GTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGG
TGCCCCAAGGACCTGAAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTT
CTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCACAACCCCTC
ACTCGGCGCGCCAGTCCTTCGAAGTAGATCTTTGTGCGATCCTACCATCCACTCGACACA
CCCGCCAGCGGCCGCTGCCAAGCTTCCGAGCTCTCGAATTAATTCACGGTACCCACCAT
GGCCTAGGGAGACTAGTCGAATCGATATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGAT
TGA CTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATG
CCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATC
CTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGT
GCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTC
CTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTG
CCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGT
CGGGGAAGCTGACGTCCTTTTCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGC
GGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGG
CCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGA
TCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCTGGTTAATTAAGTACCTTTAAGACCAATGACTT
ACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCGA
ATTC ACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGA
CCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAAT
AAAGCTTGCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC

TAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGGCATGCCAGACA
TGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGC
TTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAA
ACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGG
AGGTTTTTTGGCGGCCATCGTCGAGGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGAGCTTGG
CGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACAC
AACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACT
CACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTTCGTGCCAGC
TGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCC
GCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGC
TCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACA
TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTT
TTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGC
GCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGA
AGCGTGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGTTTCG
CTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCG
GTA ACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCC
ACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTG
GTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC
CAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGT
AGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGA
AGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAG
GGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAA
TGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATG
CTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCT
GACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCT
GCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCC
AGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA
TTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTT

GTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTTCAG
 CTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGG
 TTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTC
 ATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTC
 TGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTT
 GCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTG
 CTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAG
 ATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCA
 CCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGG
 GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTA
 TCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATAACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAA
 TAGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC (SEQ ID NO:70)

[0077] Vetores exemplificativos adicionais adequados incluem, p.ex., pBABE-puro, pBABE-neo largeTcDNA, pBABE-hygro-hTERT, pMKO.1 GFP, MSCV-IRES-GFP, pMSCV PIG (plasmídeo vazio Puro IRES GFP), pMSCV-loxp-dsRed-loxp-eGFP-Puro-WPRE, MSCV IRES Luciferase, pMIG, MDH1-PGK-GFP_2.0, TtRMPVIR, pMSCV-IRES-mCherry FP, pRetroX GFP T2A Cre, pRXTN, pLncEXP e pLXIN-Luc.

[0078] Em algumas modalidades, a célula imunitária manipulada é uma célula T, linfócito infiltrante de tumores (TIL), célula NK, célula expressando TCR, célula dendrítica ou célula NK-T. Em algumas modalidades, a célula é obtida ou preparada a partir de sangue periférico. Em algumas modalidades, a célula é obtida ou preparada a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Em algumas modalidades, a célula é obtida ou preparada a partir da medula óssea. Em algumas modalidades, a célula é obtida ou preparada a partir de sangue do cordão umbilical. Em algumas modalidades, a célula é uma célula humana. Em algumas

modalidades, a célula é transfectada ou transduzida pelo vetor de ácido nucleico usando um método selecionado do grupo consistindo em eletroporação, sonoporação, biolística (por exemplo, Pistola de Genes), transfecção de lipídeos, transfecção de polímeros, nanopartículas ou poliplexos.

[0079] Em algumas modalidades, os receptores de antígenos quiméricos são expressos nas células imunitárias manipuladas que compreendem os ácidos nucleicos do presente pedido. Estes receptores de antígenos quiméricos do presente pedido podem compreender, em algumas modalidades, (i) uma molécula de ligação ao antígeno (tal como um scFv), (ii) uma região transmembranar e (iii) uma molécula ou região de ativação de células T.

MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO

[0080] As moléculas de ligação ao antígeno estão dentro do escopo da invenção.

[0081] Uma "molécula de ligação ao antígeno" como usado aqui significa qualquer proteína que se liga a um antígeno alvo especificado. No presente pedido, o antígeno alvo especificado é a proteína DLL3 ou seu fragmento. As moléculas de ligação ao antígeno incluem, mas não estão limitadas a, anticorpos e suas partes de ligação, tais como fragmentos imunologicamente funcionais. Os peptícorpos (*i.e.*, moléculas de fusão Fc compreendendo domínios de ligação de peptídeo) são outro exemplo de moléculas de ligação ao antígeno adequadas.

[0082] Em algumas modalidades, a molécula de ligação ao antígeno se liga a um antígeno em uma célula tumoral. Em algumas modalidades, a molécula de ligação ao antígeno se liga a um antígeno em uma célula envolvida em uma doença

hiperproliferativa ou a um antígeno viral ou bacteriano. Em certas modalidades, a molécula de ligação ao antígeno se liga a DLL3. Em modalidades adicionais, a molécula de ligação ao antígeno é um anticorpo ou seu fragmento, incluindo uma ou mais das suas regiões determinantes da complementaridade (CDRs). Em modalidades adicionais, a molécula de ligação ao antígeno é um fragmento variável de cadeia única (scFv).

[0083] O termo "fragmento imunologicamente funcional" (ou "fragmento") de uma molécula de ligação ao antígeno é uma espécie de molécula de ligação ao antígeno compreendendo uma porção (independentemente de como essa porção é obtida ou sintetizada) de um anticorpo que carece de pelo menos alguns dos aminoácidos ácidos presentes em uma cadeia de comprimento total, mas que é ainda capaz de se ligar especificamente a um antígeno. Tais fragmentos são biologicamente ativos na medida em que se ligam ao antígeno alvo e podem competir com outras moléculas de ligação ao antígeno, incluindo anticorpos intactos, para ligação a um dado epítipo. Em algumas modalidades, os fragmentos são fragmentos neutralizantes. Em algumas modalidades, os fragmentos podem bloquear ou reduzir a atividade de DLL3. Em um aspecto, um tal fragmento reterá pelo menos uma CDR presente na cadeia leve ou pesada de comprimento total e, em algumas modalidades, compreenderá uma única cadeia pesada e/ou cadeia leve ou sua porção. Estes fragmentos podem ser produzidos por técnicas de DNA recombinante ou podem ser produzidos por clivagem enzimática ou química das moléculas de ligação ao antígeno, incluindo anticorpos intactos.

[0084] Os fragmentos de imunoglobulina imunologicamente funcionais incluem, mas não estão limitados a, fragmentos

scFv, fragmentos Fab (Fab', F(ab')₂ e similares), uma ou mais CDR, um diacorpo (domínio variável de cadeia pesada no mesmo polipeptídeo que um domínio variável de cadeia leve, conectado através de um curto ligante de peptídeo que é demasiado curto para permitir emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia), anticorpos de domínio e anticorpos de cadeia única. Estes fragmentos podem ser derivados de qualquer fonte de mamífero, incluindo mas não se limitando a humano, camundongo, rato, camelídeo ou coelho. Como será apreciado por um perito na técnica, uma molécula de ligação ao antígeno pode incluir componentes diferentes de proteína.

[0085] As variantes das moléculas de ligação ao antígeno estão também dentro do escopo da invenção, p.ex., cadeias leves variáveis e/ou pesadas variáveis que têm cada uma pelo menos 70-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, 97-99% ou acima de 99% de identidade com as sequências de aminoácidos das sequências descritas aqui. Em alguns casos, tais moléculas incluem pelo menos uma cadeia pesada e uma cadeia leve, ao passo que em outros casos as formas variantes contêm duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas (ou suas subpartes). Um especialista perito será capaz de determinar variantes adequadas das moléculas de ligação ao antígeno como apresentado aqui usando técnicas bem conhecidas. Em certas modalidades, um perito na técnica pode identificar áreas adequadas da molécula que possam ser mudadas sem destruir a atividade por direcionamento de regiões que não se acreditava serem importantes para a atividade.

[0086] Em certas modalidades, a estrutura de polipeptídeo das moléculas de ligação ao antígeno é baseada em anticorpos,

incluindo, mas não se limitando a, anticorpos monoclonais, anticorpos biespecíficos, minicorpos, anticorpos de domínio, anticorpos sintéticos (por vezes referidos aqui como "miméticos de anticorpos"), anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos, fusões de anticorpos (por vezes referidas aqui como "conjugados de anticorpos") e seus fragmentos, respectivamente. Em algumas modalidades, a molécula de ligação ao antígeno compreende ou consiste em avímeros.

[0087] Em algumas modalidades, uma molécula de ligação ao antígeno para DLL3 é administrada sozinha. Em outras modalidades, a molécula de ligação ao antígeno a DLL3 é administrada como parte de um CAR, TCR ou outra célula imunitária. Em tais células imunitárias, a molécula de ligação ao antígeno para DLL3 pode estar sob o controle da mesma região promotora ou um promotor separado. Em certas modalidades, os genes codificando agentes de proteína e/ou uma molécula de ligação ao antígeno para DLL3 podem estar em vetores separados.

[0088] A invenção proporciona adicionalmente composições farmacêuticas compreendendo uma molécula de ligação ao antígeno para DLL3 em conjunto com um diluente, transportador, solubilizante, emulsificante, conservante e/ou adjuvante farmacêuticamente aceitável. Em certas modalidades, as composições farmacêuticas incluirão mais do que uma molécula de ligação ao antígeno diferente para DLL3. Em certas modalidades, as composições farmacêuticas incluirão mais do que uma molécula de ligação ao antígeno para DLL3 em que as moléculas de ligação ao antígeno para DLL3 se ligam a mais do que um epítipo. Em algumas

modalidades, as várias moléculas de ligação ao antígeno não competirão entre si pela ligação a DLL3.

[0089] Em outras modalidades, a composição farmacêutica pode ser selecionada para entrega parenteral, para inalação ou para entrega através do trato digestivo, tal como oralmente. A preparação de tais composições farmacêuticamente aceitáveis está dentro da capacidade de um perito na técnica. Em certas modalidades são usados tampões para manter a composição a pH fisiológico ou a um pH ligeiramente mais baixo, tipicamente dentro de uma gama de pH de cerca de 5 a cerca de 8. Em certas modalidades, quando a administração parenteral é contemplada, uma composição terapêutica pode estar na forma de uma solução aquosa isenta de pirogênicos, parenteralmente aceitável compreendendo uma molécula de ligação ao antígeno para DLL3 desejada, com ou sem agentes terapêuticos adicionais, em um veículo farmacêuticamente aceitável. Em certas modalidades, um veículo para injeção parenteral é água destilada estéril na qual uma molécula de ligação de antígeno para DLL3, com ou sem pelo menos um agente terapêutico adicional, é formulada como uma solução estéril, isotônica, apropriadamente preservada. Em certas modalidades, a preparação pode envolver a formulação da molécula desejada com compostos poliméricos (tais como ácido poliláctico ou ácido poliglicólico), esférulas ou lipossomos que podem proporcionar a liberação controlada ou sustentada do produto que pode ser depois entregue através de uma injeção de depósito. Em certas modalidades, dispositivos de entrega de fármacos implantáveis podem ser usados para introduzir a molécula desejada.

[0090] Em algumas modalidades, a molécula de ligação ao antígeno é usada como uma ferramenta de diagnóstico ou validação. A molécula de ligação ao antígeno pode ser usada para testar a quantidade de DLL3 presente em uma amostra e/ou sujeito. Em algumas modalidades, a molécula de ligação ao antígeno de diagnóstico não é neutralizante. Em algumas modalidades, as moléculas de ligação ao antígeno divulgadas aqui são usadas ou proporcionadas em um estojo de ensaio e/ou método para a detecção de DLL3 em tecidos ou células de mamífero de modo a se rastrear/diagnosticar uma doença ou disfunção associada a mudanças nos níveis de DLL3. O estojo pode compreender uma molécula de ligação a antígeno que se liga a DLL3, em conjunto com meios para indicar a ligação da molécula de ligação ao antígeno com DLL3, se presente, e opcionalmente os níveis de proteína DLL3.

[0091] As moléculas de ligação ao antígeno serão mais bem compreendidas tendo em vista as definições e descrições em baixo.

[0092] Uma região "Fc" compreende dois fragmentos de cadeia pesada compreendendo os domínios CH1 e CH2 de um anticorpo. Os dois fragmentos de cadeia pesada são mantidos unidos por duas ou mais ligações de dissulfeto e por interações hidrofóbicas dos domínios CH3.

[0093] Um "fragmento Fab" compreende uma cadeia leve e as regiões CH1 e variáveis de uma cadeia pesada. A cadeia pesada de uma molécula Fab não pode formar uma ligação de dissulfeto com outra molécula de cadeia pesada. Um "fragmento Fab'" compreende uma cadeia leve e uma porção de uma cadeia pesada que contém o domínio VH e o domínio CH1 e também a região entre os domínios CH1 e CH2, tal que uma ligação de

dissulfeto intercadeias possa ser formada entre as duas cadeias pesadas dos dois fragmentos Fab' para formar uma molécula $F(ab')_2$. Um "fragmento $F(ab')_2$ " contém duas cadeias leves e duas cadeias pesadas contendo uma porção da região constante entre os domínios CH1 e CH2, tal que uma ligação de dissulfeto intercadeias seja formada entre as duas cadeias pesadas. Um fragmento $F(ab')_2$ é assim composto por dois fragmentos Fab' que são mantidos unidos por uma ligação de dissulfeto entre as duas cadeias pesadas.

[0094] A "região Fv" compreende as regiões variáveis tanto da cadeia pesada quanto da leve, mas carece das regiões constantes.

[0095] "Fragmento variável de cadeia única" ("scFv", também denominado "anticorpo de cadeia única") se refere a moléculas Fv nas quais as regiões variáveis de cadeia pesada e leve foram conectadas por um ligante flexível para formar uma única cadeia de polipeptídeo, que forma uma região de ligação ao antígeno. Ver pedido PCT WO88/01649 e as Patentes dos E.U.A. Nos. 4,946,778 e 5,260,203, as divulgações dos quais são incorporadas por referência em sua totalidade.

[0096] Uma "molécula de ligação ao antígeno bivalente" compreende dois locais de ligação ao antígeno. Em alguns casos, os dois locais de ligação têm as mesmas especificidades de antígeno. As moléculas de ligação ao antígeno bivalentes podem ser específicas. Uma "molécula de ligação ao antígeno multiespecífica" é uma que visa mais do que um antígeno ou epítopo. Uma molécula de ligação ao antígeno "biespecífica", "duplamente específica" ou "bifuncional" é uma molécula ou anticorpo de ligação ao antígeno híbrido, respectivamente, tendo dois locais de

ligação ao antígeno diferentes. Os dois locais de ligação de uma molécula de ligação ao antígeno biespecífica se ligarão a dois epítomos diferentes, que podem residir nos mesmos alvos de proteína ou em alvos de proteína diferentes.

[0097] Se diz que uma molécula de ligação ao antígeno "se liga especificamente" ao seu antígeno alvo quando a constante de dissociação (K_d) é $\sim 1 \times 10^{-7}$ M. A molécula de ligação ao antígeno se liga especificamente ao antígeno com "elevada afinidade" quando a K_d é $1-5 \times 10^{-9}$ M, e com "afinidade muito elevada" quando a K_d é $1-5 \times 10^{-10}$ M. Em uma modalidade, a molécula de ligação ao antígeno tem uma K_d de 10^{-9} M. Em uma modalidade, a taxa de dissociação é $< 1 \times 10^{-5}$. Em outras modalidades, as moléculas de ligação ao antígeno se ligam a DLL3 humano com uma K_d de entre cerca de 10^{-7} M e 10^{-13} M e, em ainda outra modalidade, as moléculas de ligação ao antígeno se ligam com uma K_d $1,0-5 \times 10^{-10}$.

[0098] Se diz que uma molécula de ligação ao antígeno é "seletiva" quando se liga a um alvo mais firmemente do que se liga a um segundo alvo.

[0099] O termo "anticorpo" se refere a uma imunoglobulina intacta de qualquer isotipo, ou um seu fragmento, que pode competir com o anticorpo intacto para a ligação específica ao antígeno alvo e inclui, por exemplo, anticorpos quiméricos, humanizados, totalmente humanos e biespecíficos. Um "anticorpo" é uma espécie de uma molécula de ligação a antígeno como definido aqui. Um anticorpo intacto compreenderá geralmente pelo menos duas cadeias pesadas de comprimento total e duas cadeias leves de comprimento total mas, em alguns casos, pode incluir menos cadeias tais como anticorpos ocorrendo naturalmente em camelídeos que podem

compreender somente cadeias pesadas. Os anticorpos podem ser derivados meramente de uma única fonte ou podem ser quiméricos, isto é, diferentes porções do anticorpo podem ser derivadas de dois anticorpos diferentes como descrito adicionalmente em baixo. As moléculas de ligação ao antígeno, anticorpos ou fragmentos de ligação podem ser produzidos em hibridomas, por técnicas de DNA recombinante ou por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. A não ser que de outro modo indicado, o termo "anticorpo" inclui, adicionalmente a anticorpos compreendendo duas cadeias pesadas de comprimento total e duas cadeias leves de comprimento total, seus derivados, variantes, fragmentos e muteínas, exemplos dos quais são descritos abaixo. Além do mais, a não ser que explicitamente excluído, os anticorpos incluem anticorpos monoclonais, anticorpos biespecíficos, minicorpos, anticorpos de domínio, anticorpos sintéticos (por vezes referidos aqui como "miméticos de anticorpos"), anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos, fusões de anticorpos (por vezes referidas aqui como "conjugados de anticorpos") e seus fragmentos, respectivamente.

[0100] As regiões variáveis exibem tipicamente a mesma estrutura geral de regiões estruturais (FR) relativamente conservadas unidas pelas 3 regiões hipervariáveis (*i.e.*, "CDRs"). As CDR das duas cadeias de cada par estão tipicamente alinhadas pelas regiões estruturais, que podem permitir ligação a um epítipo específico. Do terminal N ao terminal C, as regiões variáveis de cadeia leve e pesada compreendem tipicamente os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. Por convenção, as regiões CDR na cadeia

pesada são tipicamente referidas como CDR1, CDR2 e CDR3 de HC. As regiões CDR na cadeia leve são tipicamente referidas como CDR1, CDR2 e CDR3 de LC. A atribuição de aminoácidos a cada domínio está tipicamente de acordo com as definições de Kabat (*Seqs of Proteins of Immunological Interest* (NIH, Bethesda, MD (1987 e 1991)) ou Chothia (*J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); Chothia *et al.*, *Nature*, 342: 878-883 (1989)). Vários métodos de análise podem ser empregues para se identificarem ou aproximarem as regiões CDR, incluindo não só Kabat ou Chothia, mas também a definição AbM.

[0101] O termo "cadeia leve" inclui uma cadeia leve de comprimento total e seus fragmentos tendo sequência de região variável suficiente para conferir especificidade de ligação. Uma cadeia leve de comprimento total inclui um domínio de região variável, V_L , e um domínio de região constante, C_L . O domínio da região variável da cadeia leve está no terminal amino do polipeptídeo. As cadeias leves incluem cadeias kappa e cadeias lambda.

[0102] O termo "cadeia pesada" inclui uma cadeia pesada de comprimento total e seus fragmentos tendo sequência de região variável suficiente para conferir especificidade de ligação. Uma cadeia pesada de comprimento total inclui um domínio de região variável, V_H , e três domínios de região constante, CH_1 , CH_2 e CH_3 . O domínio V^H está no terminal amino do polipeptídeo e os domínios C_H estão no terminal carboxila, com o CH_3 estando mais próximo do terminal carbóxi do polipeptídeo. As cadeias pesadas podem ser de qualquer isotipo, incluindo IgG (incluindo os subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (incluindo os subtipos IgA1 e IgA2), IgM e IgE.

[0103] O termo "região variável" ou "domínio variável" se refere a uma porção das cadeias leves e/ou pesadas de um anticorpo, incluindo tipicamente aproximadamente o terminal amino 120 a 130 aminoácidos na cadeia pesada e cerca de 100 a 110 aminoácidos de terminal amino na cadeia leve. A região variável de um anticorpo determina tipicamente a especificidade de um anticorpo particular pelo seu alvo.

[0104] A variabilidade não está uniformemente distribuída ao longo dos domínios variáveis de anticorpos; está concentrada em subdomínios de cada uma dentre as regiões variáveis de cadeia pesada e leve. Estes subdomínios são chamados "regiões hipervariáveis" ou "regiões determinantes da complementaridade" (CDRs). As porções mais conservadas (*i.e.*, não hipervariáveis) dos domínios variáveis são chamadas as regiões "estruturais" (FRM ou FR) e proporcionam um molde para as seis CDRs no espaço tridimensional para formarem uma superfície de ligação ao antígeno. Os domínios variáveis de cadeias pesada e leve ocorrendo naturalmente compreendem cada um quatro regiões FRM (FR1, FR2, FR3 e FR4), adotando largamente uma configuração de folha β , conectada por três regiões hipervariáveis, que formam alças conectando a e, em alguns casos fazendo parte da, estrutura de folha β . As regiões hipervariáveis em cada cadeia são mantidas unidas em proximidade estreita pela FRM e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação ao antígeno (ver Kabat *et al.*, *loc. cit.*).

[0105] Os termos "CDR", e seu plural "CDRs", se referem à região determinante da complementaridade da qual três constituem o caráter de ligação de uma região variável de

cadeia leve (CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3) e três constituem o caráter de ligação de uma região variável de cadeia pesada (CDRH1, CDR-H2 e CDR-H3). As CDRs contêm a maioria dos resíduos responsáveis por interações específicas do anticorpo com o antígeno e conseqüentemente contribuem para a atividade funcional de uma molécula de anticorpo: são os principais determinantes da especificidade de antígeno.

[0106] As fronteiras e comprimentos de CDR definidores exatos estão sujeitos a sistemas de clarificação e numeração diferentes. As CDRs podem, portanto, ser referidas por Kabat, Chothia, contato ou quaisquer outras definições de fronteira, incluindo o sistema de numeração descrito aqui. Apesar de fronteiras diferentes, cada um destes sistemas tem algum grau de sobreposição no que constitui as assim chamadas "regiões hipervariáveis" dentro das sequências variáveis. As definições de CDR de acordo com estes sistemas podem, portanto, diferir em comprimento e áreas de fronteira no que diz respeito à região estrutural adjacente. Ver por exemplo Kabat (uma abordagem baseada em variabilidade de sequência entre espécies), Chothia (uma abordagem baseada em estudos cristalográficos de complexos antígeno-anticorpo) e/ou MacCallum (Kabat *et al.*, *loc. cit.*; Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901-917; e MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1996, 262: 732). Ainda outro padrão para caracterizar o local de ligação ao antígeno é a definição AbM usada pelo *software* de modelação de anticorpos AbM da Oxford Molecular. Ver, p.ex., *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. Em: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. e Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Na medida em que duas técnicas de identificação de resíduos

definem regiões de sobreposição, mas não regiões idênticas, as mesmas podem ser combinadas para definir uma CDR híbrida. No entanto, a numeração de acordo com o assim chamado sistema de Kabat é preferencial.

[0107] Tipicamente, as CDRs formam uma estrutura em alça que pode ser classificada como uma estrutura canônica. O termo "estrutura canônica" se refere à conformação de cadeia principal que é adotada pelas alças de ligação ao antígeno (CDR). A partir de estudos estruturais comparativos foi descoberto que cinco das seis alças de ligação ao antígeno têm somente um repertório limitado de conformações disponíveis. Cada estrutura canônica pode ser caracterizada pelos ângulos de torção do esqueleto de polipeptídeo. As alças correspondentes entre anticorpos podem, portanto, ter estruturas tridimensionais muito similares, apesar da elevada variabilidade de sequências de aminoácidos na maioria das partes das alças (Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901; Chothia et al., *Nature*, 1989, 342: 877; Martin e Thornton, *J. Mol. Biol.*, 1996, 263: 800). Além do mais existe uma relação entre a estrutura em alça adotada e as sequências de aminoácidos circundando a mesma. A conformação de uma classe canônica particular é determinada pelo comprimento da alça e pelos resíduos de aminoácido residindo em posições-chave dentro da alça, bem como dentro da estrutura conservada (*i.e.*, fora da alça). A atribuição a uma classe canônica particular pode, portanto, ser feita com base na presença destes resíduos de aminoácidos-chave.

[0108] O termo "estrutura canônica" pode também incluir considerações quanto à sequência linear do anticorpo, por exemplo, como catalogado por Kabat (Kabat et

al., loc. cit.). O esquema (sistema) de numeração de Kabat é um padrão amplamente adotado para numerar os resíduos de aminoácido de um domínio variável de anticorpo de uma maneira consistente e é o esquema preferencial aplicado na presente invenção como também mencionado em outro lugar aqui. Considerações estruturais adicionais podem ser também usadas para se determinar a estrutura canônica de um anticorpo. Por exemplo, aquelas diferenças não totalmente refletidas pela numeração de Kabat podem ser descritas pelo sistema de numeração de Chothia *et al.* e/ou reveladas por outras técnicas, por exemplo, cristalografia e modelação computacional bi- ou tridimensional. Conformemente, uma dada sequência de anticorpo pode ser colocada numa classe canônica que permite, entre outras coisas, identificar sequências de chassi apropriadas (p.ex., com base em um desejo de se incluir uma variedade de estruturas canônicas em uma biblioteca). A numeração de Kabat de sequências de aminoácidos de anticorpo e considerações estruturais como descrito por Chothia *et al., loc. cit.* e suas implicações para interpretar aspectos canônicos de estrutura de anticorpo, são descritos na literatura. As estruturas de subunidades e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas na técnica. Para uma análise da estrutura de anticorpos ver *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow *et al.*, 1988.

[0109] A CDR3 da cadeia leve e, particularmente, a CDR3 da cadeia pesada podem constituir os determinantes mais importantes na ligação ao antígeno dentro das regiões variáveis de cadeia leve e pesada. Em alguns construtos de

anticorpo, a CDR3 de cadeia pesada parece constituir a principal área de contato entre o antígeno e o anticorpo. Esquemas de seleção *in vitro* nos quais a CDR3 sozinha é variada podem ser usados para variar as propriedades de ligação de um anticorpo ou determinar que resíduos contribuem para a ligação de um antígeno. Conseqüentemente, a CDR3 é tipicamente a maior fonte de diversidade molecular dentro do local de ligação de anticorpo. H3, por exemplo, pode ser tão curto quanto dois resíduos de aminoácido ou maior do que 26 aminoácidos.

[0110] O termo "neutralizante" se refere a uma molécula de ligação ao antígeno, scFv ou anticorpo, respectivamente, que se liga a um ligando e evita ou reduz o efeito biológico desse ligando. Isto pode ser feito, por exemplo, por bloqueio direto de um local de ligação no ligando ou por ligação ao ligando e alteração da capacidade do ligando de se ligar através de meios indiretos (tais como alterações estruturais ou energéticas no ligando). Em algumas modalidades, o termo pode também denotar uma molécula de ligação ao antígeno que evita que a proteína à qual está ligada desempenhe uma função biológica.

[0111] O termo "alvo" ou "antígeno" se refere a uma molécula ou uma porção de uma molécula capaz de ser ligada por uma molécula de ligação ao antígeno. Em certas modalidades, um alvo pode ter um ou mais epítopos.

[0112] O termo "competir" quando usado no contexto de moléculas de ligação ao antígeno que competem pelo mesmo epítipo significa competição entre moléculas de ligação ao antígeno como determinado por um ensaio no qual a molécula de ligação ao antígeno (p.ex., anticorpo ou seu fragmento

imunologicamente funcional) sendo testada evita ou inibe (p.ex., reduz) a ligação específica de uma molécula de ligação ao antígeno de referência a um antígeno. Numerosos tipos de ensaios de ligação competitiva podem ser usados para se determinar se uma molécula de ligação ao antígeno compete com outra, por exemplo: radioimunoensaio (RIA) direto ou indireto em fase sólida, imunoensaio enzimático (EIA) direto ou indireto em fase sólida, ensaio de competição em sanduíche (Stahli *et al.*, 1983, *Methods in Enzymology* 9: 242-253); EIA de biotina-avidina direto em fase sólida (Kirkland *et al.*, 1986, *J. Immunol.* 137: 3614-3619), ensaio marcador direto em fase sólida, ensaio em sanduíche marcado direto em fase sólida (Harlow e Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA marcador direto em fase sólida usando marcador 1-125 (Morel *et al.*, 1988, *Molec. Immunol.* 25: 7-15); EIA de biotina-avidina direto em fase sólida (Cheung, *et al.*, 1990, *Virology* 176: 546-552); e RIA marcador direto (Moldenhauer *et al.*, 1990, *Scand. J. Immunol.* 32: 77-82). O termo "epítopo" inclui qualquer determinante capaz de ser ligado por uma molécula de ligação ao antígeno, tal como um scFv, anticorpo ou célula imunitária da invenção. Um epítopo é uma região de um antígeno que é ligada por uma molécula de ligação ao antígeno que visa esse antígeno e, quando o antígeno é uma proteína, inclui aminoácidos específicos que contatam diretamente a molécula de ligação ao antígeno.

[0113] Como usado aqui, os termos "marcador" ou "marcado" se referem à incorporação de um marcador detectável, p.ex., por incorporação de um aminoácido radiomarcado ou anexação a um polipeptídeo de frações de biotina que podem ser

detectadas por avidina marcada (p.ex., estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou atividade enzimática que pode ser detectada por métodos ópticos ou colorimétricos). Em certas modalidades, o marcador ou etiqueta pode ser também terapêutico. Vários métodos de marcação de polipeptídeos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados.

[0114] De acordo com a invenção, ligar-desligar ou outros tipos de técnicas de interruptor de controle podem ser incorporadas aqui. Estas técnicas podem empregar o uso de domínios de dimerização e ativadores opcionais de tal dimerização de domínios. Estas técnicas incluem, p.ex., aquelas descritas por Wu *et al.*, *Science* 2014 350 (6258) utilizando sistemas de dimerização FKBP/Rapalog em certas células, os conteúdos do qual são incorporados por referência aqui em sua totalidade. Tecnologia de dimerização adicional é descrita em, p.ex., Fegan *et al.* *Chem. Rev.* 2010, 110, 3315-3336 bem como Patentes dos E.U.A. Nos. 5,830,462; 5,834,266; 5,869,337; e 6,165,787, os conteúdos dos quais são também incorporados por referência aqui em sua totalidade. Pares de dimerização adicionais podem incluir ciclosporina-A/ciclofilina, receptor, estrogênio/receptor de estrogênio (opcionalmente usando tamoxifeno), glucocorticoides/receptor de glucocorticoides, tetraciclina/receptor de tetraciclina, vitamina D/receptor de vitamina D. Exemplos adicionais de tecnologia de dimerização podem ser encontrados em, p.ex., WO 2014/127261, WO 2015/090229, US 2014/0286987, US 2015/0266973, US 2016/0046700, Patentes dos E.U.A. No. 8,486,693, US 2014/0171649 e US 2012/0130076, os conteúdo dos quais são

adicionalmente incorporados por referência aqui em sua totalidade.

MÉTODOS DE TRATAMENTO

[0115] Usando imunoterapia adotiva, as células T nativas podem ser (i) removidas de um paciente, (ii) geneticamente modificadas para expressar um receptor de antígeno quimérico (CAR) que se liga a pelo menos um antígeno tumoral, (iii) expandidas *ex vivo* até uma população maior de células T modificadas e (iv) reintroduzidas no paciente. Ver, p.ex., Patentes dos E.U.A. Nos. 7,741,465 e 6,319,494, Eshhar *et al.* (*Cancer Immunol, supra*); Krause *et al.* (*supra*); Finney *et al.* (*supra*). Após as células T modificadas serem reintroduzidas no paciente, elas medeiam uma resposta imunitária contra células expressando o antígeno tumoral. Ver, p.ex., Krause *et al.*, *J. Exp. Med.*, Volume 188, No. 4, 1998 (619-626). Esta resposta imunitária inclui secreção de IL-2 e outras citocinas por células T, a expansão clonal de células T reconhecendo o antígeno tumoral e morte específica mediada por células T de células positivas quanto ao alvo. Ver Hombach *et al.*, *Journal of Immun.* 167: 6123-6131 (2001).

[0116] Em alguns aspectos, a invenção compreende, portanto, um método para tratamento ou prevenção de uma condição associada a níveis indesejados e/ou elevados de DLL3 em um paciente, compreendendo administração a um paciente com sua necessidade de uma quantidade eficaz de pelo menos uma molécula de ligação ao antígeno isolada, CAR ou TCR divulgado aqui.

[0117] São proporcionados métodos para tratamento de doenças ou disfunções, incluindo câncer. Em algumas modalidades, a invenção se relaciona com a criação de uma

resposta imunitária mediada por células T em um sujeito, compreendendo administração de uma quantidade eficaz das células imunitárias manipuladas do presente pedido ao sujeito. Em algumas modalidades, a resposta imunitária mediada por células T é dirigida contra uma célula ou células alvo. Em algumas modalidades, a célula imunitária manipulada compreende um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou um receptor de células T (TCR). Em algumas modalidades, a célula alvo é uma célula tumoral. Em alguns aspectos, a invenção compreende um método para tratamento ou prevenção de uma malignidade, compreendendo o referido método administração a um sujeito com sua necessidade de uma quantidade eficaz de pelo menos uma molécula de ligação ao antígeno isolada descrita aqui. Em alguns aspectos, a invenção compreende um método para tratamento ou prevenção de uma malignidade, compreendendo o referido método administração a um sujeito com sua necessidade de uma quantidade eficaz de pelo menos uma célula imunitária, em que a célula imunitária compreende pelo menos um receptor de antígeno quimérico, receptor de células T e/ou molécula de ligação ao antígeno isolada como descrito aqui.

[0118] Em alguns aspectos, a invenção compreende uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos uma molécula de ligação ao antígeno como descrito aqui e um excipiente farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende adicionalmente um agente ativo adicional.

[0119] As moléculas de ligação ao antígeno, CARs, TCRs, células imunitárias e similares da invenção podem ser usados para tratar doenças mieloides incluindo mas não se limitando

a adrenal, fígado, rim, bexiga, mama, gástrico, ovário, cervical, uterino, esofágico, colorretal, próstata (p.ex., adenocarcinoma de próstata), pancreático, pulmão (tanto pequenas células como não pequenas células), tireoide, carcinomas, sarcomas, glioblastomas, tumores de cabeça e pescoço, carcinoma neuroendócrino de células grandes (LCNEC), câncer medular de tireoide, glioblastoma, câncer neuroendócrino de próstata (NEPC), câncer gastroenteropancreático de elevado grau (GEP) e melanoma maligno.

[0120] Será apreciado que doses alvo para células CAR⁺/CAR-T⁺/TCR⁺ podem variar de 1×10^6 - 2×10^{10} células/kg, preferencialmente 2×10^6 células/kg, mais preferencialmente. Será apreciado que doses acima e abaixo desta gama podem ser apropriadas para certos sujeitos, e os níveis de dose apropriados podem ser determinados pelo provedor de cuidados de saúde como necessário. Adicionalmente, múltiplas doses de células podem ser proporcionadas de acordo com a invenção.

[0121] São também proporcionados métodos para redução do tamanho de um tumor em um sujeito, compreendendo administração ao sujeito de uma célula manipulada da presente invenção ao sujeito, em que a célula compreende um receptor de antígeno quimérico, um receptor de células T ou um receptor de antígeno químico baseado em receptor de células T compreendendo uma molécula de ligação ao antígeno se liga a um antígeno no tumor. Em algumas modalidades, o sujeito tem um tumor sólido ou uma malignidade do sangue tal como linfoma ou leucemia. Em algumas modalidades, a célula manipulada é entre a um leito tumoral. Em algumas

modalidades, o câncer está presente na medula óssea do sujeito.

[0122] Em algumas modalidades, as células manipuladas são células T autólogas. Em algumas modalidades, as células manipuladas são células T alogênicas. Em algumas modalidades, as células manipuladas são células T heterólogas. Em algumas modalidades, as células manipuladas do presente pedido são transfectadas ou transduzidas *in vivo*. Em outras modalidades, as células manipuladas são transfectadas ou transduzidas *ex vivo*.

[0123] Os métodos podem compreender adicionalmente administração de um ou mais agentes quimioterapêuticos. Em certas modalidades, o agente quimioterapêutico é um quimioterapêutico de linfodepleção (pré-condicionamento). Regimes de tratamento de pré-condicionamento benéficos, em conjunto com biomarcadores benéficos correlativos, são descritos nos Pedidos de Patente Provisória dos E.U.A. 62/262,143 e 62/167,750 que são deste modo incorporados por referência em sua totalidade aqui. Estes descrevem, p.ex., métodos de condicionamento de um paciente com necessidade de uma terapia com células T compreendendo administração ao paciente de doses benéficas especificadas de ciclofosfamida (entre 200 mg/m²/dia e 2000 mg/m²/dia) e doses específicas de fludarabina (entre 20 mg/m²/dia e 900 mg/m²/dia). Um regime de dosagem preferencial envolve tratamento de um paciente compreendendo administração diária ao paciente de cerca de 500 mg/m²/dia de ciclofosfamida e cerca de 60 mg/m²/dia de fludarabina durante três dias antes da administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de células T manipuladas ao paciente.

[0124] Em outras modalidades, a molécula de ligação ao antígeno, células transduzidas (ou de outro modo manipuladas) (tais como CARs ou TCRs) e o agente quimioterapêutico são administrados cada um em uma quantidade eficaz para tratar a doença ou condição no sujeito.

[0125] Em certas modalidades, as composições compreendendo células efectoras imunitárias expressando CAR divulgadas aqui podem ser administradas em conjunção com qualquer número de agentes quimioterapêuticos. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes alquilantes tais como tiotepa e ciclofosfamida (CYTOXANTM™); sulfonatos de alquila tais como bussulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; mostardas de nitrogênio tais como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalano, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosureias tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tais como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azasserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina, epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas,

peplomomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptoazocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tais como metotrexato e 5-fluorouracila (5-FU); análogos do ácido fólico tais como denopterinina, metotrexato, pteropterinina, trimetrexato; análogos de purina tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenais tais como aminoglutetimidina, mitotano, trilostano; agente de reposição do ácido fólico tal como ácido folínico; aceglatonina; aldofosfamida glicosídeo; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptínio; etoglucídeo; nitrato de gálio; hidroxureia; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamete; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etil-hidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2''-triclortrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazona; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosídeo ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, p.ex., paclitaxel (TAXOL™, Bristol-Myers Squibb) e doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos da platina tais como cisplatina e carboplatina;

vinblastina; platina; etoposídeo (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposídeo; daunomicina; aminopterinina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibidor de topoisomerase RFS2000; difluorometilomitina (DMFO); derivados do ácido retinoico tais como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileucina diftitox); esperamicinas; capecitabina; e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer um dos acima. Também incluídos em esta definição estão agentes anti-hormonais que atuam para regular ou inibir a ação de hormônios em tumores tais como antiestrogênios incluindo por exemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazóis inibidores de aromatase, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona e toremifeno (Farestona); e antiandrógenos tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida e goserelina; e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer um dos acima. Combinações de agentes quimioterapêuticos são também administradas onde apropriado, incluindo, mas não se limitando a, CHOP, *i.e.*, Ciclofosfamida (Cytoxan®), Doxorubicina (hidroxidoxorrubicina), Vincristina (Oncovin®) e Prednisona.

[0126] Em algumas modalidades, o agente quimioterapêutico é administrado ao mesmo tempo ou no espaço de uma semana após a administração da célula manipulada ou ácido nucleico. Em outras modalidades, o agente quimioterapêutico é administrado de 1 a 4 semanas ou de 1 semana a 1 mês, 1 semana a 2 meses, 1 semana a 3 meses, 1 semana a 6 meses, 1 semana a 9 meses ou 1 semana a 12 meses após a administração

da célula manipulada ou ácido nucleico. Em outras modalidades, o agente quimioterapêutico é administrado pelo menos 1 mês antes da administração da célula ou ácido nucleico. Em algumas modalidades, os métodos compreendem adicionalmente administração de dois ou mais agentes quimioterapêuticos.

[0127] Uma variedade de agentes terapêuticos adicionais pode ser usada em conjunção com as composições descritas aqui. Por exemplo, agentes terapêuticos adicionais potencialmente úteis incluem inibidores de PD-1 tais como nivolumab (Opdivo®), pembrolizumab (Keytruda®), pembrolizumab, pidilizumab e atezolizumab.

[0128] Agentes terapêuticos adicionais adequados para uso em combinação com a invenção incluem, mas não estão limitados a, ibrutinib (Imbruvica®), ofatumumab (Arzerra®), rituximab (Rituxan®), bevacizumab (Avastin®), trastuzumab (Herceptin®), emtansina de rastuzumab (KADCYLA®), imatinib (Gleevec®), cetuximab (Erbix®), panitumumab (Vectibix®), catumaxomab, ibritumomab, ofatumumab, tositumomab, brentuximab, alemtuzumab, gemtuzumab, erlotinib, gefitinib, vandetanib, afatinib, lapatinib, neratinib, axitinib, masitinib, pazopanib, sunitinib, sorafenib, toceranib, lestaurtinib, axitinib, cediranib, lenvatinib, nintedanib, pazopanib, regorafenib, semaxanib, sorafenib, sunitinib, tivozanib, toceranib, vandetanib, entrectinib, cabozantinib, imatinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib, radotinib, bosutinib, lestaurtinib, ruxolitinib, pacritinib, cobimetinib, selumetinib, trametinib, binimetinib, alectinib, ceritinib, crizotinib, aflibercept, adipotida, denileucina diftitox, inibidores de mTOR tais como Everolimus e Temsirolimus,

inibidores de *hedgehog* tais como sonidegib e vismodegib, inibidores de CDK tais como inibidor de CDK (palbociclib).

[0129] Em modalidades adicionais, a composição compreendendo imunitário contendo CAR pode ser administrada com um agente anti-inflamatório. Os agentes ou fármacos anti-inflamatórios incluem, mas não estão limitados a, esteroides e glucocorticoides (incluindo betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triancinolona), fármacos anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs) incluindo aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfassalazina, leflunomida, medicações anti-TNF, ciclofosfamida e micofenolato. NSAIDs exemplificativos incluem ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, inibidores de Cox-2 e sialilatos. Analgésicos exemplificativos incluem acetaminofeno, oxicodona, tramadol de hidrocloreto de proporexifeno. Glucocorticoides exemplificativos incluem cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona ou prednisona. Modificadores da resposta biológica exemplificativos incluem moléculas dirigidas contra marcadores da superfície celular (p.ex., CD4, CD5, etc.), inibidores de citocinas, tais como os antagonistas de TNF (p.ex., etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®) e infliximab (REMICADE®), inibidores de quimiocinas e inibidores de moléculas de adesão. Os modificadores da resposta biológica incluem anticorpos monoclonais bem como formas recombinantes de moléculas. DMARDs exemplificativos incluem azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalazina,

hidroxicloroquina, Ouro (oral (auranofina) e intramuscular) e minociclina.

[0130] Em certas modalidades, as composições descritas aqui são administradas em conjunção com uma citocina. "Citocina" como usado aqui se destina a se referir a proteínas liberadas por uma população de células que atuam em outra célula como mediadores intercelulares. Exemplos de citocinas são linfocinas, monocinas e hormônios de polipeptídeos tradicionais. Incluídos entre as citocinas estão os hormônios do crescimento tais como hormônio do crescimento humano, hormônio do crescimento humano de N-metionila e hormônio do crescimento bovino; hormônio da paratireoide; tiroxina; insulina; pró-insulina; relaxina; pró-relaxina; hormônios de glicoproteínas tais como hormônio estimulador do folículo (FSH), hormônio estimulador da tireoide (TSH) e hormônio luteínizante (LH); fator de crescimento hepático (HGF); fator de crescimento de fibroblastos (FGF); prolactina; lactogênio placentário; substância inibidora de Müller; peptídeo associado à gonadotropina de camundongo; inibina; activina; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento de nervos (NGFs) tais como NGF-beta; fator de crescimento de plaquetas; fatores de crescimento de transformação (TGFs) tais como TGF-alfa e TGF-beta; fator de crescimento tipo insulina-I e -II; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferons tais como interferon-alfa, beta e -gama; fatores estimuladores de colônias (CSFs) tais como macrófago-CSF (M-CSF); granulócito-macrófago-CSF (GM-CSF); e granulócito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1alfa, IL-

2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, um fator de necrose tumoral tal como TNF-alfa ou TNF-beta; e outros fatores de polipeptídeos incluindo LIF e ligando kit (KL). Como usado aqui, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura de células recombinantes e equivalentes biologicamente ativos das citocinas de sequência nativa.

[0131] Em alguns aspectos, a invenção compreende uma molécula de ligação ao antígeno que se liga a DLL3 com uma K_d que é menor do que 100 pM. Em algumas modalidades, a molécula de ligação ao antígeno se liga com uma K_d que é menor do que 10 pM. Em outras modalidades, a molécula de ligação ao antígeno se liga com uma K_d que é menor do que 5 pM.

MÉTODOS DE PREPARAÇÃO

[0132] Uma variedade de técnicas conhecidas pode ser utilizada na preparação de polinucleotídeos, polipeptídeos, vetores, moléculas de ligação ao antígeno, células imunitárias, composições e similares de acordo com a invenção.

[0133] Antes da manipulação ou modificação genética *in vitro* das células imunitárias descritas aqui, as células podem ser obtidas de um sujeito. Em algumas modalidades, as células imunitárias compreendem células T. As células T podem ser obtidas de um número de fontes, incluindo células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), medula óssea, tecido de linfonodos, sangue do cordão umbilical, tecido do timo, tecido de um local de infecção, ascite, derrame pleural, tecido do baço e tumores. Em certas modalidades, as células T podem ser obtidas de uma unidade de sangue coletada

do sujeito usando qualquer número de técnicas conhecidas do perito, tais como separação FICOLL™. As células podem ser preferencialmente obtidas do sangue circulante de um indivíduo por aferese. O produto de aferese contém tipicamente linfócitos, incluindo células T, monócitos, granulócitos, células B, outros glóbulos brancos nucleados, glóbulos vermelhos e plaquetas. Em certas modalidades, as células coletadas por aferese podem ser lavadas para se remover a fração de plasma e colocadas em um tampão ou meio apropriado para processamento subsequente. As células podem ser lavadas com PBS. Como será apreciado, um passo de lavagem pode ser usado, tal como por uso de uma centrífuga de fluxo direto semiautomatizada -- por exemplo, o processador de células Cobe™ 2991, o Baxter CytoMate™ ou similares. Após lavagem, as células podem ser ressuspensas em uma variedade de tampões biocompatíveis ou outra solução salina com ou sem tampão. Em certas modalidades, os componentes indesejados da amostra de aferese podem ser removidos.

[0134] Em certas modalidades, as células T são isoladas de PBMCs por lise dos glóbulos vermelhos e esgotamento dos monócitos, por exemplo, usando centrifugação através de um gradiente PERCOLL™. Uma subpopulação específica de células T, tais como células T CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ e CD45RO⁺, pode ser adicionalmente isolada por técnicas de seleção positiva ou negativa conhecidas na técnica. Por exemplo, o enriquecimento de uma população de células T por seleção negativa pode ser alcançado com uma combinação de anticorpos dirigidos a marcadores da superfície únicos para as células negativamente selecionadas. Um método para uso aqui é separação e/ou seleção de células através de imunoaderência

magnética negativa ou citometria de fluxo que usa um *cocktail* de anticorpos monoclonais dirigidos a marcadores da superfície celular presentes nas células negativamente selecionadas. Por exemplo, para enriquecer quanto a células CD4⁺ por seleção negativa, um *cocktail* de anticorpos monoclonais inclui tipicamente anticorpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR e CD8. A citometria de fluxo e a separação de células podem ser também usadas para isolar populações de células de interesse para uso na presente invenção.

[0135] As PBMCs podem ser usadas diretamente para modificação genética com as células imunitárias (tais como CARs ou TCRs) usando métodos como descrito aqui. Em certas modalidades, após isolamento das PBMCs, os linfócitos T podem ser adicionalmente isolados e ambos os linfócitos T citotóxicos e ajudantes podem ser separados em subpopulações de células T ingênuas, de memória e efetoras antes da ou após modificação genética e/ou expansão.

[0136] Em algumas modalidades, as células CD8⁺ são adicionalmente separadas em células ingênuas, de memória central e efetoras por identificação de antígenos da superfície celular que estão associados a cada um destes tipos de células CD8⁺. Em algumas modalidades, a expressão de marcadores fenotípicos de células T de memória central incluem CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 e CD127 e são negativos quanto à granzima B. Em algumas modalidades, as células T de memória central são células T CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺. Em algumas modalidades, as células T efetoras são negativas quanto a CD62L, CCR7, CD28 e CD127 e positivas quanto à granzima B e perforina. Em certas modalidades, as

células T CD4⁺ são adicionalmente separadas em subpopulações. Por exemplo, as células ajudantes T CD4⁺ podem ser separadas em células ingênuas, de memória central e efetoras por identificação de populações de células que têm antígenos da superfície celular.

[0137] As células imunitárias, tais como células T, podem ser geneticamente modificadas após isolamento usando métodos conhecidos, ou as células imunitárias podem ser ativadas e expandidas (ou diferenciadas no caso de progenitores) *in vitro* antes de serem geneticamente modificadas. Em outra modalidade, as células imunitárias, tais como células T, são geneticamente modificadas com os receptores de antígenos quiméricos descritos aqui (p.ex., transduzidas com um vetor viral compreendendo uma ou mais sequências de nucleotídeos codificando um CAR) e depois são ativadas e/ou expandidas *in vitro*. Métodos para ativação e expansão de células T são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, na Patente dos E.U.A. No. 6,905,874; Patente dos E.U.A. No. 6,867,041; Patente dos E.U.A. No. 6,797,514; e PCT WO2012/079000, os conteúdos das quais são deste modo incorporados por referência em sua totalidade. Geralmente, tais métodos incluem contato de PBMC ou células T isoladas com um agente estimulador e agente coestimulador, tal como anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, geralmente anexados a uma esférula ou outra superfície, em um meio de cultura com citocinas apropriadas, tais como IL -2. Os anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 anexados à mesma esférula servem como uma célula de apresentação de antígenos (APC) "substituta". Um exemplo é o sistema Dynabeads®, um sistema

ativador/estimulador de CD3/CD28 para ativação fisiológica de células T humanas.

[0138] Em outras modalidades, as células T podem ser ativadas e estimuladas para proliferar com células alimentadoras e anticorpos e citocinas apropriados usando métodos tais como aqueles descritos na Patente dos E.U.A. No. 6,040,177; Patente dos E.U.A. No. 5,827,642; e WO2012129514, os conteúdos das quais são deste modo incorporados por referência em sua totalidade.

[0139] Certos métodos para preparação dos construtos e células imunitárias manipuladas da invenção são descritos no pedido PCT PCT/US15/14520, os conteúdos do qual são deste modo incorporados por referência em sua totalidade. Métodos adicionais de preparação dos construtos e células podem ser encontrados no pedido de patente provisória dos E.U.A. no. 62/244036, os conteúdos do qual são deste modo incorporados por referência em sua totalidade.

[0140] Será apreciado que as PBMCs podem incluir adicionalmente outros linfócitos citotóxicos tais como células NK ou células NKT. Um vetor de expressão transportando a sequência codificante de um receptor quimérico como divulgado aqui pode ser introduzido em uma população de células T de doadores humanos, células NK ou células NKT. As células T transduzidas com sucesso que transportam o vetor de expressão podem ser separadas usando citometria de fluxo para isolar células T positivas quanto a CD3 e depois adicionalmente propagadas para aumentar o número destas células T expressando CAR adicionalmente à ativação de células usando anticorpos anti-CD3 e IL-2 ou outros métodos conhecidos na técnica como descrito em outro

lugar aqui. Procedimentos padrão são usados para criopreservação de células T expressando o CAR para armazenamento e/ou preparação para uso em um sujeito humano. Em uma modalidade, a transdução, cultura e/ou expansão *in vitro* de células T são realizadas na ausência de produtos derivados de animais não humanos tais como soro fetal de bezerro e soro fetal de bovino.

[0141] Para clonagem de polinucleotídeos, o vetor pode ser introduzido em uma célula hospedeira (uma célula hospedeira isolada) para permitir replicação do próprio vetor e deste modo amplificar as cópias do polinucleotídeo contidas aí. Os vetores de clonagem podem conter componentes de sequência incluem geralmente, sem limitação, uma origem de replicação, sequências promotoras, sequências de iniciação da transcrição, sequências intensificadoras e marcadores selecionáveis. Estes elementos podem ser selecionados como apropriado por um perito na técnica. Por exemplo, a origem de replicação pode ser selecionada para promover a replicação autônoma do vetor na célula hospedeira.

[0142] Em certas modalidades, a presente divulgação proporciona células hospedeiras isoladas contendo o vetor proporcionado aqui. As células hospedeiras contendo o vetor podem ser úteis na expressão ou clonagem do polinucleotídeo contido no vetor. Células hospedeiras adequadas podem incluir, sem limitação, células procarióticas, células fúngicas, células de levedura ou células eucarióticas superiores tais como células de mamíferos. Células procarióticas adequadas para este propósito incluem, sem limitação, eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, *Enterobacteriaceae* tais como

Escherichia, p.ex., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, p.ex., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, p.ex., *Serratia marcescans*, e *Shigella*, bem como *Bacilli* tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis*, *Pseudomonas* tais como *P. aeruginosa* e *Streptomyces*.

[0143] O vetor pode ser introduzido na célula hospedeira usando quaisquer métodos adequados conhecidos na técnica, incluindo, sem limitação, entrega mediada por DEAE-dextrano, método de precipitação com fosfato de cálcio, entrega mediada por lipídeos catiônicos, transfecção mediada por lipossomas, eletroporação, bombardeamento de microprojéteis, entrega de genes mediada por receptor, entrega mediada por polilisina, histona, quitosano e peptídeos. Métodos padrão para transfecção e transformação de células para expressão de um vetor de interesse são bem conhecidos na técnica. Em uma modalidade adicional, uma mistura de diferentes vetores de expressão pode ser usada na modificação genética de uma população dadora de células efetoras imunitárias em que cada vetor codifica um CAR diferente como divulgado aqui. As células efetoras imunitárias transduzidas resultantes formam uma população mista de células manipuladas, com uma proporção das células manipuladas expressando mais do que um CAR diferente.

[0144] Em uma modalidade, a invenção proporciona um método de armazenamento de células geneticamente manipuladas expressando CARs ou TCRs que visam uma proteína DLL3. Isto envolve a criopreservação das células imunitárias tal que as células permaneçam viáveis após descongelamento. Uma fração das células imunitárias expressando os CARs pode ser

criopreservada por métodos conhecidos na técnica para proporcionar uma fonte permanente de tais células para o tratamento futuro de pacientes afligidos por uma malignidade. Quando necessário, as células imunitárias transformadas criopreservadas podem ser descongeladas, cultivadas e expandidas para mais tais células.

[0145] Como usado aqui, "criopreservação" se refere à preservação de células por resfriamento até temperaturas sub-zero, tais como (tipicamente) 77 Kelvin ou -196 °C (o ponto de ebulição do nitrogênio líquido). Agentes crioprotetores são frequentemente usados a temperaturas sub-zero para evitar que as células sejam preservadas de danos devido ao congelamento a baixas temperaturas ou aquecimento até à temperatura ambiente. Os agentes criopreservantes e as taxas de resfriamento ótimas podem proteger contra a lesão celular. Os agentes crioprotetores que podem ser usados de acordo com a invenção incluem, mas não estão limitados a: sulfóxido de dimetila (DMSO) (Lovelock & Bishop, *Nature* (1959); 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, *Nature* (1961); 190: 1204-1205), glicerol, polivinilpirrolidina (Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1960); 85: 576) e polietileno glicol (Sloviter & Ravdin, *Nature* (1962); 196: 48). A taxa de resfriamento preferencial é 1° - 3 °C/minuto.

[0146] O termo "substancialmente puro" é usado para indicar que um dado componente está presente a um elevado nível. O componente é desejavelmente o componente predominante presente em uma composição. Preferencialmente está presente a um nível de mais do que 30%, de mais do que 50%, de mais do que 75%, de mais do que 90% ou mesmo de mais do que 95%, sendo o referido nível determinado em uma base

de peso seco/peso seco no que diz respeito à composição total sob consideração. A níveis muito altos (p.ex., a níveis de mais do que 90%, de mais do que 95% ou de mais do que 99%), o componente pode ser considerado como estando na "forma pura". As substâncias biologicamente ativas da presente invenção (incluindo polipeptídeos, moléculas de ácido nucleico, moléculas de ligação ao antígeno, frações) podem ser proporcionadas em uma forma que está substancialmente isenta de um ou mais contaminantes aos quais a substância poderia de outro modo estar associada. Quando uma composição está substancialmente isenta de um dado contaminante, o contaminante estará a um nível baixo (p.ex., a um nível de menos do que 10%, menos do que 5% ou menos do que 1% na base de peso seco/peso seco apresentada acima).

[0147] Em algumas modalidades, as células são formuladas por coleta em primeiro lugar de seu meio de cultura e, depois, lavagem e concentração das células em um meio e sistema recipiente adequados para administração (um transportador "farmaceuticamente aceitável") em uma quantidade eficaz para o tratamento. Meios de infusão adequados podem ser qualquer formulação de meio isotônico, tipicamente solução salina normal, Normosol™ R (Abbott) ou Plasma-Lyte™ A (Baxter), mas pode ser também utilizada dextrose a 5% em água ou lactato de Ringer. O meio de infusão pode ser suplementado com albumina de soro humano.

[0148] As quantidades de tratamento desejadas de células na composição são geralmente pelo menos 2 células (por exemplo, pelo menos 1 célula T de memória central CD8⁺ e pelo menos 1 subconjunto de células T ajudantes CD4⁺) ou são mais tipicamente maiores do que 10² células e até 10⁶, até e

incluindo 10^8 ou 10^9 células e podem ser mais do que 10^{10} células. O número de células dependerá do uso desejado para o qual a composição se destina e do tipo de células incluídos aí. A densidade das células desejadas é tipicamente maior do que 10^6 células/mL e é geralmente maior do que 10^7 células/mL, geralmente 10^8 células/mL ou mais. O número clinicamente relevante de células imunitárias pode ser distribuído em múltiplas infusões que cumulativamente igualam ou excedem 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} ou 10^{12} células. Em alguns aspectos da presente invenção, particularmente uma vez que todas as células infundidas serão redirigidas para um antígeno alvo particular (DLL3), podem ser administrados números mais baixos de células, na gama de 10^6 /quilograma (10^6 - 10^{11} por paciente). Os tratamentos com CAR podem ser administrados múltiplas vezes a dosagens dentro destas gamas. As células podem ser autólogas, alogênicas ou heterólogas para o paciente sendo submetido a terapia.

[0149] As populações de células expressando CAR da presente invenção podem ser administradas sozinhas ou como uma composição farmacêutica em combinação com diluentes e/ou com outros componentes tais como IL-2 ou outras citocinas ou populações de células. As composições farmacêuticas da presente invenção podem compreender uma população de células expressando CAR ou TCR, tais como células T, como descrito aqui, em combinação com um ou mais transportadores, diluentes ou excipientes farmacêuticamente ou fisiologicamente aceitáveis. Tais composições podem compreender tampões tais como solução salina tamponada neutra, solução salina tamponada com fosfato e similares; carboidratos tais como glucose, manose, sacarose ou dextranos, manitol; proteínas;

polipeptídeos ou aminoácidos tais como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tais como EDTA ou glutatona; adjuvantes (p.ex., hidróxido de alumínio); e conservantes. As composições da presente invenção são preferencialmente formuladas para administração intravenosa.

[0150] As composições farmacêuticas (soluções, suspensões ou similares) podem incluir um ou mais dos seguintes: diluentes estéreis tais como água para injeção, solução salina, preferencialmente solução salina fisiológica, solução de Ringer, cloreto de sódio isotônico, óleos fixos tais como mono- ou diglicerídeos sintéticos que podem servir como o solvente ou meio de suspensão, polietilenoglicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes; agentes antibacterianos tais como álcool de benzila ou parabeno de metila; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tais como ácido etilenodiaminotetra-acético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste da tonicidade tais como cloreto de sódio ou dextrose. A preparação parenteral pode ser encerrada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de dose múltipla feitos de vidro ou plástico. Uma composição farmacêutica injetável é preferencialmente estéril.

[0151] Será apreciado que os eventos adversos podem ser minimizados por transdução das células imunitárias (contendo um ou mais CARs ou TCRs) com um gene suicida. Pode ser também desejado incorporar um interruptor "ligado" ou "acelerador" induzível nas células imunitárias. Técnicas adequadas incluem o uso de caspase-9 induzível (Ped. dos E.U.A. 2011/0286980) ou uma timidina cinase, antes de, após ou ao

mesmo tempo que as células são transduzidas com o construto de CAR da presente invenção. Métodos adicionais para introdução de genes suicidas e/ou interruptores "ligados" incluem TALENS, dedos de zinco, RNAi, siRNA, shRNA, tecnologia antissenso e outras técnicas conhecidas na técnica.

[0152] Será entendido que as descrições aqui são somente exemplificativas e explicativas e não são restritivas da invenção como reivindicada. No presente pedido, o uso do singular inclui o plural a não ser que especificamente afirmado de outro modo.

[0153] Os cabeçalhos de seção usados aqui são somente para propósitos organizacionais e não são para serem interpretados como limitando o assunto descrito. Todos os documentos, ou porções de documentos, citados em este pedido, incluindo mas não se limitando a patentes, pedidos de patentes, artigos, livros e tratados, são deste modo expressamente incorporados por referência em sua totalidade para qualquer propósito. Como utilizado em conformidade com a presente divulgação, os seguintes termos, a não ser que de outro modo indicados, deverão ser entendidos como tendo os seguintes significados:

[0154] Em este pedido, o uso de "ou" significa "e/ou" a não ser que afirmado de outro modo. Além do mais, o uso do termo "incluindo", bem como outras formas, tais como "inclui" e "incluído", não é limitante. Igualmente, termos tais como "elemento" ou "componente" englobam tanto elementos e componentes compreendendo uma unidade como elementos e componentes que compreendem mais do que uma subunidade a não ser que especificamente afirmado de outro modo.

[0155] O termo "atividade de DLL3" inclui qualquer efeito biológico de DLL3. Em certas modalidades, a atividade de DLL3 inclui a capacidade de DLL3 de interagir com ou se ligar a um substrato ou receptor.

[0156] O termo "polinucleotídeo", "nucleotídeo" ou "ácido nucleico" inclui polímeros de nucleotídeos tanto de fita simples como de fita dupla. Os nucleotídeos compreendendo o polinucleotídeo podem ser ribonucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleotídeo. As referidas modificações incluem modificações de bases tais como derivados de bromouridina e inosina, modificações de ribose tais como 2',3'-didesoxirribose e modificações de ligações internucleotídeos tais como fosforotioato, fosforoditioato, fosforosselenoato, fosforo-disselenoato, fosforo-anilotioato, fosforaniladato e fosforoamidato.

[0157] O termo "oligonucleotídeo" se refere a um polinucleotídeo compreendendo 200 ou menos nucleotídeos. Os oligonucleotídeos podem ter fita simples ou fita dupla, p.ex., para uso na construção de um gene mutante. Os oligonucleotídeos podem ser oligonucleotídeos senso ou antissenso. Um oligonucleotídeo pode incluir um marcador, incluindo um radiomarcador, um marcador fluorescente, um hapteno ou um marcador antigênico, para ensaios de detecção. Os oligonucleotídeos podem ser usados, por exemplo, como iniciadores de PCR, iniciadores de clonagem ou sondas de hibridação.

[0158] O termo "sequência de controle" se refere a uma sequência de polinucleotídeos que pode afetar a expressão e processamento das sequências codificantes às quais ela está

ligada. A natureza de tais sequências de controle pode depender do organismo hospedeiro. Em modalidades particulares, as sequências de controle para procariotas podem incluir um promotor, um local de ligação ribossomal e uma sequência de terminação da transcrição. Por exemplo, as sequências de controle para eucariotas podem incluir promotores compreendendo um ou uma pluralidade de locais de reconhecimento para fatores de transcrição, sequências intensificadoras da transcrição e sequência de terminação da transcrição. "Sequências de controle" podem incluir sequências líderes (peptídeos sinal) e/ou sequências de parceiros de fusão.

[0159] Como usado aqui, "operacionalmente ligado" significa que os componentes aos quais o termo é aplicado estão em uma relação que lhes permite levar a cabo suas funções inerentes sob condições adequadas.

[0160] O termo "vetor" significa qualquer molécula ou entidade (p.ex., ácido nucleico, plasmídeo, bacteriófago ou vírus) usada para transferir informação de codificação de proteínas para uma célula hospedeira. O termo "vetor de expressão" ou "construto de expressão" se refere a um vetor que é adequado para a transformação de uma célula hospedeira e contém sequências de ácidos nucleicos que dirigem e/ou controlam (em conjunção com a célula hospedeira) a expressão de uma ou mais regiões codificantes heterólogas operativamente ligadas às mesmas. Um construto de expressão pode incluir, mas não está limitado a, sequências que afetam ou controlam a transcrição, tradução e, se íntrons estiverem presentes, afetam o *splicing* de RNA de uma região codificante operacionalmente ligada ao mesmo.

[0161] O termo "célula hospedeira" se refere a uma célula que foi transformada, ou é capaz de ser transformada, com uma sequência de ácidos nucleicos e deste modo expressa um gene de interesse. O termo inclui a descendência da célula paterna, quer a descendência seja ou não idêntica na morfologia ou na composição genética à célula paterna original, desde que o gene de interesse esteja presente.

[0162] O termo "transformação" se refere a uma mudança nas características genéticas de uma célula, e uma célula foi transformada quando foi modificada para conter novo DNA ou RNA. Por exemplo, uma célula é transformada onde é geneticamente modificada de seu estado nativo por introdução de novo material genético através de transfecção, transdução ou outras técnicas. Após transfecção ou transdução, o DNA transformador pode se recombinar com aquela da célula por integração física em um cromossomo da célula ou pode ser mantido transientemente como um elemento episossomal sem ser replicado ou pode se replicar independentemente como um plasmídeo. Uma célula é considerada como tendo sido "estavelmente transformada" quando o DNA transformador é replicado com a divisão da célula.

[0163] O termo "transfecção" se refere à captação de DNA estranho ou exógeno por uma célula. Um número de técnicas de transfecção é bem conhecido na técnica e é divulgado aqui. Ver, p.ex., Graham *et al.*, 1973, *Virology* 52:456; Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, *supra*; Davis *et al.*, 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13: 197.

[0164] O termo "transdução" se refere ao processo por meio do qual DNA estranho é introduzido em uma célula através

de vetor viral. Ver Jones *et al.*, (1998). *Genetics: principles and analysis*. Boston: Jones & Bartlett Publ.

[0165] Os termos "polipeptídeo" ou "proteína" se referem a uma macromolécula tendo a sequência de aminoácidos de uma proteína, incluindo deleções de, adições a e/ou substituições de um ou mais aminoácidos da sequência nativa. Os termos "polipeptídeo" e "proteína" englobam especificamente moléculas de ligação ao antígeno DLL3, anticorpos ou sequências que têm deleções de, adições a e/ou substituições de um ou mais aminoácidos de proteína de ligação ao antígeno. O termo "fragmento de polipeptídeo" se refere a um polipeptídeo que tem uma deleção no terminal amino, uma deleção no terminal carboxila e/ou uma deleção interna em comparação com a proteína nativa de comprimento total. Tais fragmentos podem também conter aminoácidos modificados em comparação com a proteína nativa. Fragmentos de polipeptídeos úteis incluem fragmentos imunologicamente funcionais de moléculas de ligação ao antígeno. Fragmentos úteis incluem mas não estão limitados a uma ou mais regiões CDR, domínios variáveis de uma cadeia pesada e/ou leve, uma porção de outras porções de uma cadeia de anticorpo e similares.

[0166] O termo "isolado" (i) isento de pelo menos algumas outras proteínas com as quais seria normalmente encontrado, (ii) está essencialmente isento de outras proteínas da mesma fonte, p.ex., da mesma espécie, (iii) foi separada de pelo menos cerca de 50 por cento de polinucleotídeos, lipídeos, carboidratos ou outros materiais com os quais está associado na natureza, (iv) está operacionalmente associado (por interação covalente ou não covalente) a um polipeptídeo ao

qual não está associado na natureza ou (v) não ocorre na natureza.

[0167] Uma "variante" de um polipeptídeo (p.ex., uma molécula de ligação ao antígeno ou um anticorpo) compreende uma sequência de aminoácidos em que um ou mais resíduos de aminoácidos são inseridos na, deletados da e/ou substituídos na sequência de aminoácidos em relação a outra sequência de polipeptídeos. As variantes incluem proteínas de fusão.

[0168] O termo "identidade" se refere a uma relação entre as sequências de duas ou mais moléculas de polipeptídeo ou duas ou mais moléculas de ácido nucleico, como determinada por alinhamento e comparação das sequências. "Percentagem de identidade" significa a percentagem de resíduos idênticos entre os aminoácidos ou nucleotídeos nas moléculas comparadas e é calculada com base no tamanho da mais pequena das moléculas sendo comparadas. Para estes cálculos, as lacunas em alinhamentos (se algumas) são preferencialmente abordadas por um modelo matemático ou programa de computador particular (*i.e.*, um "algoritmo").

[0169] Para se calcular a percentagem de identidade, as sequências sendo comparadas são tipicamente alinhadas de um modo que dê a maior correspondência entre as sequências. Um exemplo de um programa de computador que pode ser usado para se determinar a percentagem de identidade é o pacote de programas GCG, que inclui GAP (Devereux *et al.*, 1984, *Nucl. Acid Res.* 12: 387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.). O algoritmo de computador GAP é usado para alinhar os dois polipeptídeos ou polinucleotídeos para os quais a percentagem de identidade de sequências é para ser determinada. As sequências são alinhadas para

correspondência ótima dos seus respectivos aminoácidos ou nucleotídeos (o "intervalo correspondido", como determinado pelo algoritmo). Em certas modalidades, uma matriz de comparação padrão (ver Dayhoff *et al.*, 1978, *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5: 345-352 para a matriz de comparação PAM 250; Henikoff *et al.*, 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 10915-10919 para a matriz de comparação BLOSUM 62) é também usada pelo algoritmo.

[0170] Como usado aqui, os vinte aminoácidos convencionais (p.ex., ocorrendo naturalmente) e suas abreviaturas seguem o uso convencional. Ver *Immunology - A Synthesis* (2ª Edição, Golub and Gren, Eds., Sinauer Assoc., Sunderland, Mass. (1991)), que é incorporado aqui por referência para qualquer propósito. Estereoisômeros (p.ex., D-aminoácidos) dos vinte aminoácidos convencionais, aminoácidos não naturais tais como aminoácidos alfa-, alfa-dissubstituídos, N-alkil aminoácidos, ácido láctico e outros aminoácidos não convencionais podem ser também componentes adequados para polipeptídeos da presente invenção. Exemplos de aminoácidos não convencionais incluem: 4-hidroxi prolina, γ -carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfo serina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metil-histidina, 5-hidroxi lisina, σ -N-metilarginina e outros aminoácidos e iminoácidos similares (p.ex., 4-hidroxi prolina). Na notação de polipeptídeos usada aqui, a direção do lado esquerdo é a direção do terminal amino e a direção do lado direito é a direção do terminal carbóxi, de acordo com o uso e convenção padrão.

[0171] As substituições de aminoácidos conservativas podem englobar resíduos de aminoácidos não ocorrendo naturalmente, que são tipicamente incorporados por síntese química de peptídeos em vez de por síntese em sistemas biológicos. Estes incluem peptidomiméticos e outras formas revertidas ou invertidas de frações de aminoácidos. Os resíduos ocorrendo naturalmente podem ser divididos em classes com base nas propriedades comuns da cadeia lateral:

- a) hidrofóbicos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- b) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- c) ácidos: Asp, Glu;
- d) básicos: His, Lys, Arg;
- e) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro; e
- f) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

[0172] Por exemplo, as substituições não conservativas podem envolver a troca de um membro de uma destas classes por um membro de outra classe. Tais resíduos substituídos podem ser introduzidos, por exemplo, em regiões de um anticorpo humano que são homólogas com anticorpos não humanos ou nas regiões não homólogas da molécula.

[0173] Ao se fazerem mudanças na molécula de ligação ao antígeno, nos domínios coestimuladores ou de ativação da célula T manipulada, de acordo com certas modalidades, o índice hidropático de aminoácidos pode ser considerado. A cada aminoácido foi atribuído um índice hidropático com base nas suas características de hidrofobicidade e carga. Eles são: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7);

serina (-0,8); triptofano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); e arginina (-4,5). Ver Kyte et al., *J. Mol. Biol.*, 157: 105-131 (1982). É conhecido que certos aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos tendo um índice ou pontuação hidropática similar e ainda reter uma atividade biológica similar. É também entendido na técnica que a substituição de aminoácidos similares pode ser feita eficazmente com base na hidrofiliabilidade, particularmente onde a proteína ou peptídeo biologicamente funcional deste modo criado se destina para uso em modalidades imunológicas, como no presente caso. Substituições de aminoácidos exemplificativas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2

<u>Resíduos</u>	<u>Substituições</u>	<u>Substituições</u>
<u>Originais</u>	<u>Exemplificativas</u>	<u>Preferenciais</u>
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu

Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Ácido	Arg
	1,4-diamino-butírico, Gln, Asn	
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala,	Leu
	Tyr	
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe,	Leu
	Ala, Norleucina	

[0174] O termo "derivado" se refere a uma molécula que inclui uma modificação química sem ser uma inserção, deleção ou substituição de aminoácidos (ou ácidos nucleicos). Em certas modalidades, os derivados compreendem modificações covalentes, incluindo, mas não se limitando a, ligação química com polímeros, lipídeos ou outras frações orgânicas ou inorgânicas. Em certas modalidades, uma molécula de ligação ao antígeno quimicamente modificada pode ter uma maior meia-vida de circulação do que uma molécula de ligação ao antígeno que não é quimicamente modificada. Em algumas modalidades, uma molécula de ligação ao antígeno derivada é covalentemente modificada para incluir uma ou mais anexações de polímero solúvel em água, incluindo, mas não se limitando

a, polietilenoglicol, polioxietilenoglicol ou polipropilenoglicol.

[0175] Os análogos de peptídeos são comumente usados na indústria farmacêutica como fármacos diferentes de peptídeos com propriedades análogas àquelas do peptídeo molde. Estes tipos de compostos diferentes de peptídeos são denominados "miméticos de peptídeos" ou "peptidomiméticos". Fauchere, J., *Adv. Drug Res.*, 15: 29 (1986); Veber & Freidinger, *TINS*, p. 392 (1985); e Evans *et al.*, *J. Med. Chem.*, 30: 1229 (1987), que são incorporados aqui por referência para qualquer propósito.

[0176] O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere à quantidade de uma molécula de ligação ao antígeno DLL3 determinada para produzir uma resposta terapêutica em um mamífero. Tais quantidades terapeuticamente eficazes de uma composição são prontamente determinadas por um perito na técnica.

[0177] Os termos "paciente" e "sujeito" são usados indistintamente e incluem sujeitos animais humanos e não humanos bem como aqueles com disfunções formalmente diagnosticadas, aqueles sem disfunções formalmente reconhecidas, aqueles recebendo atenção médica, aqueles em risco de desenvolver as disfunções, *etc.*

[0178] O termo "tratar" e "tratamento" inclui tratamentos terapêuticos, tratamentos profiláticos e aplicações nas quais se reduz o risco de um sujeito vir a desenvolver uma disfunção ou outro fator de risco. O tratamento não requer a cura completa de uma disfunção e engloba modalidades em que se reduzem os sintomas ou fatores de risco subjacentes. O termo "evitar" não requer a eliminação a 100% da

possibilidade de um evento. Em vez disso indica que a probabilidade da ocorrência do evento foi reduzida na presença do composto ou método.

[0179] Técnicas padrão podem ser usadas para DNA recombinante, síntese de oligonucleotídeos e cultura e transformação de tecidos (p.ex., eletroporação, lipofecção). Reações enzimáticas e técnicas de purificação podem ser realizadas de acordo com as especificações do fabricante ou como comumente alcançado na técnica ou como descrito aqui. Os procedimentos e técnicas anteriores podem ser geralmente realizados de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na técnica e como descrito em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas ao longo do presente relatório descritivo. Ver, p.ex., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que é incorporado aqui por referência para qualquer propósito.

[0180] As seguintes sequências exemplificarão a invenção.

DNA de CD28T Extracelular, transmembranar, intracelular

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCC

GTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAG

TCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTAGATCC

AAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCC

CACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGC

(SEQ ID NO:1)

AA Extracelulares, transmembranares, intracelulares de

CD28T:

LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP FWVLVVVGGV LACYSLLVTV
AFIIFWVRSK RSRLHSDYM NMTPRRPGPT RKHYQPYAPP RDFAAAYRS (SEQ ID
NO:2)

DNA de CD28T - Extracelular

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCC
GTCACCCTTGTTCCTGGTCCATCCAAGCCA (SEQ ID NO:3)

AA de CD28T - Extracelular

LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP (SEQ ID NO:4)

DNA de CD28 Domínio Transmembranar

TTCTGGGTGTTGGTTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTACTCTCTGCTCGTCACCGT
GGCTTTTATAATCTTCTGGGTT (SEQ ID NO:5)

AA de CD28 Domínio Transmembranar:

FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWV (SEQ ID NO:6)

DNA de CD28 Domínio Intracelular:

AGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCC
TGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATC
GGAGC (SEQ ID NO:7)

AA de CD28 Domínio Intracelular

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAAYRS (SEQ ID NO:8)

DNA de CD3 zeta

AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACT
GTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAG
GACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAACCCCAGGAGGGTCTCTAT
AATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGA
GCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGG
ATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEQ ID NO:9)

AA de CD3 zeta

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ
ID NO:10)

DNA de CD28

ATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACGGTACCATCAT
 TCACGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCCTTCTCCCCTCTTCCCCGGGCCATCAAAGCCC
 (SEQ ID NO:11)

AA de CD28

IEVMYPPPYL DNEKSNGTII HVKKGKHLCP S PLFPGPSKP (SEQ ID NO:12)

DNA de CD8 domínio extracelular & transmembranar

GCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTACCAGTGTTCTTGCC
 GGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACCCCAGCTCCTACCATCGCTT
 CACAGCCTCTGTCCCTGCGCCAGAGGCTTGCCGACCGGCCGAGGGGGCGCTGTTTAT
 ACCAGAGGACTGGATTTTCGCTGCGATATCTATATCTGGGCACCCCTGGCCGGAACCTG
 CGGCGTACTCCTGCTGTCCCTGGTCATCACGCTCTATTGTAATCACAGGAAC (SEQ
 ID NO:13)

AA de CD8 Domínio extracelular & transmembranar

AAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH
 TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:14)

DNA de 4-1BB domínio intracelular

CGCTTTTCCGTCGTTAAGCGGGGGAGAAAAAGCTGCTGTACATTTTCAAACAGCCGTT
 TATGAGGCCGGTCCAAACGACTCAGGAAGAGGACGGCTGCTCCTGCCGCTTTTCTGAGG
 AGGAGGAGGGCGGGTGC GAACTG (SEQ ID NO:15)

AA de 4-1BB Domínio intracelular

RFSVVKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID
 NO:16)

DNA de HC do Clone 1H2.1

CAGGTGCAACTGCAGGAAAGCGGGCCCGGTCTGGTGAAGCCCTCAGAAACGCTCTCCCT
 CACCTGTACAGTCTCTGGCGATTCAATCTCTTCATATTACTGGACGTGGATCAGGCAGC
 CTCCCGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGATATATCTACTATAGTGGCACCCTAACTAT
 AATCCTTCCCTGAAAAGCCGGGTGACAATCTCTGTTGACACCTCCAAGAGCCAGTTTCA
 CCTGAAACTCTCCAGTGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTATTACTGTGCCTCTATCG

CTGTGCGCGGGTTCTTTTTTGGATTATTGGGGCCAGGGGACACTGGTGACCGTTAGCAGC
(SEQ ID NO:40)

AA de HC do Clone 1H2.1 - CDRs Sublinhadas

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDISISSYYWTWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGTTNY
 NPSLKSRVTISVDTSKSKQFSLKLSSVTAADTAVYYCASIAVRGFFFDYWGQGLTVTVSS
(SEQ ID NO:41)

AA de CDR1 de HC do Clone 1H2.1: SYJWT (SEQ ID NO:42)

AA de CDR2 de HC do Clone 1H2.1: YIYYSGTTNYNPSLKS (SEQ
ID NO:43)

AA de CDR3 de HC do Clone 1H2.1: IAVRGFFFDY (SEQ ID
NO:44)

DNA de LC do Clone 1H2.1

GAAATTGTACTGACCCAGTCCCCCGGCACGCTCTCTCTCTCCCCAGGGGAAAGGGCAAC
 CCTTAGCTGCCGGGCGAGCCAGAGCGTGAGTTCCTCCTACCTCGCGTGGTATCAGCAGA
 AGCCTGGACAGGCTCCCAGACTGCTGATTTACGGGGCTTCTACGAGAGCCACCGGCATA
 CCTGATAGGTTCTCTGGCTCCGGGTCTGGGACCGACTTTACTCTTACAATCAGCAGACT
 TGAGCCTGAAGACTTCGCTGTGTATTATTGTCAACAATACGGAACGTCCCCCTTACCT
 TTGGTGGCGGGACAAAAGTGAAATTAAGAGG (SEQ ID NO:45)

AA de LC do Clone 1H2.1 (CDRs Sublinhadas)

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI
 PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPLETFGGGTKVEIKR (SEQ ID
NO:46)

AA de CDR1 de LC do Clone 1H2.1: RASQSVSSSYLA (SEQ ID
NO:47)

AA de CDR2 de LC do Clone 1H2.1: GASTRAT (SEQ ID NO:48)

AA de CDR3 de LC do Clone 1H2.1: QQYGTSPLETF (SEQ ID NO:49)

DNA de HC do Clone 8D2

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAACGGCCGGGTGCAAGCGTGAAGGT
 GTCCTGCAAAGCCTCTGGCTATACTTTACTGGGTACTATATGCACTGGGTTTCGGCAGG
 CGCCAGGACAGGGTCTTGAGTGGATGGGTTGGATTGATCCAACTCTGGCGATACAAAT

TACGCACAGAAATTCCAGGGCCGCGTGACGATGACTCGAGACACTTCCATATCCACCGC
 CTATATGGAAGTGAATAGACTCCGGTCTGACGACACTGCTGTCTATTACTGTGCAAGGG
 ATCCCAACCGGCGGAGTTGGTATTACGGAATGGATGTCTGGGCCAGGGTACTACCGTC
 ACGGTGTCTTCT (SEQ ID NO:50)

AA de HC do Clone 8D2 (CDRs sublinhadas)

QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPNSGDTN
YAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEVNRLRSDDTAVYYCARDPNRRSWYYGMDVWAQGTTV
 TVSS (SEQ ID NO:51)

AA de CDR1 de HC do Clone 8D2: GYMH (SEQ ID NO:52)

AA de CDR2 de HC do Clone 8D2: WIDPNSGDTNYAQKFQ (SEQ
 ID NO:53)

AA de CDR3 de HC do Clone 8D2: DPNRRSWYYGMDV (SEQ ID
 NO:54)

DNA de LC do Clone 8D2

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAACGGCCGGGTGCAAGCGTGAAGGT
 GTCCTGCAAAGCCTCTGGCTATACCTTTACTGGGTACTATATGCACTGGGTTTCGGCAGG
 CGCCAGGACAGGGTCTTGAGTGGATGGGTTGGATTGATCCAACTCTGGCGATACAAAT
 TACGCACAGAAATTCCAGGGCCGCGTGACGATGACTCGAGACACTTCCATATCCACCGC
 CTATATGGAAGTGAATAGACTCCGGTCTGACGACACTGCTGTCTATTACTGTGCAAGGG
 ATCCCAACCGGCGGAGTTGGTATTACGGAATGGATGTCTGGGCCAGGGTACTACCGTC
 ACGGTGTCTTCTGGCGGGGGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGCGGTGGAGGAGGCAGCGA
 TATTCAGATGACACAAAGCCCTTCTAGTCTCTCCGCAAGCGTTGGCGACCGCGTGACCA
 TTACGTGTCAGGCTTCACAAGATATTCGAAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCC
 GGCAAAGCACCTAAGCTGCTGATTTATGACGCTAGCAACCTTGAGACTGGCGTCCCCTC
 CAGATTTTCCGGCAGCGGCTCAGGCACCGACTTTACTTTTACCATCTCCACACTCCAGC
 CAGAAGATATTGCAACGTATTACTGCCAACATTATGATAACCTGCCTTTGACCTTCGGA
 GGTGGCACCAAGGTAGAGATCAGAAGA (SEQ ID NO:55)

AA de LC do Clone 8D2 (CDRs sublinhadas)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVP
 SRFSGSGSGTDFTFTISTLQPEDIAITYYCQHYDNLPLPLTFGGGTKVEIRR (SEQ ID
 NO:56)

AA de CDR1 de LC do Clone 8D2: QASQDIRNYLN (SEQ ID
 NO:57)

AA de CDR2 de LC do Clone 8D2: DASNLET (SEQ ID NO:58)

AA de CDR3 de LHC do Clone 8D2: QHYDNLPLPLTF (SEQ ID
 NO:59)

DNA de HC do Clone 6B2

CAAGTGCAGTTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCAGGCGCTAGCGTCAAAGT
 GAGCTGTAAGGCCTCAGGTTACACGTTTACTGGTACTATATGCATTGGGTGAGGCAAG
 CCCCTGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCTGGATTAATCCTAACAGCGGGGACACAAGC
 TATGCCCAACGCTTCTCGGGCAGAGTAACAATGACACGGGATAACAAGTATTAACACCGT
 CCATATGGAACCTCTCTCGGCTCGGCTCAGATGATACCGCGGTTTATTACTGTGCTAGGG
 AGGACGACTCCTCTTGGTATGGCAGCTTCGATTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACA
 GTCTCATCT (SEQ ID NO:60)

AA de HC do Clone 6B2 (CDRs sublinhadas)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTS
YAQRFLGRVTMTRDTSINTVHMELSRLGSDDTAVYYCAREDDSSWYGSFDYWGQGLT
 VSS (SEQ ID NO:61)

AA de CDR1 de HC do Clone 6B2: GYYMH (SEQ ID NO:62)

AA de CDR2 de HC do Clone 6B2: WINPNSGDTSYAQRFLG (SEQ
 ID NO:63)

AA de CDR3 de HC do Clone 6B2: EDDSSWYGSFDY (SEQ ID
 NO:64)

DNA de LC do Clone 6B2

GATATACAGATGACTCAGAGTCCCTCAAGCTTGAGTGCCAGTGTAGGCGACCGGGTGAC
 GATAACCTGTAGGGCTTCACAGGGAATCAGAAATTATCTGGGTTGGTACCAGCAGAAGC
 CAGGAAAGGCACCTAAAAGACTTATTTACGCCGCATCCTCCTTGCAGTCCGGCGTGCCA
 TCAAAATTTTCTGGGAGCGGCTCTGGAACCGAGTTCACCCTCACGATCTCCAGCCTCCA

GCCCGAGGACTTTGCCACCTACTATTGCCTGCAGCACGATAGTGATCTGCGAACTTTTG
 GGCAAGGCACTAAAGTGGAAATTAAGAGA (SEQ ID NO:65)

AA de LC do Clone 6B2 (CDRs sublinhadas)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIRNYLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVP
 SKFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHDSDLRRTFGQGTKVEIKR (SEQ ID
 NO:66)

AA de CDR1 de LC do Clone 6B2: RASQGIRNYLG (SEQ ID
 NO:67)

AA de CDR2 de LC do Clone 6B2: AASSLQS (SEQ ID NO:68)

AA de CDR3 de LC do Clone 6B2: LQHDSDLRRTF (SEQ ID
 NO:69)

DNA de construto 1H2.1 4-1BB (sequência sinal a negrito)

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGCACG
CCCCGCAGGTGCAACTGCAGGAAAGCGGGCCCGGTCTGGTGAAGCCCTCAGAAACGCTCT
 CCCTCACCTGTACAGTCTCTGGCGATTCAATCTCTTCATATTACTGGACGTGGATCAGG
 CAGCCTCCCGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGATATATCTACTATAGTGGCACCCTAA
 CTATAATCCTTCCCTGAAAAGCCGGGTGACAATCTCTGTTGACACCTCCAAGAGCCAGT
 TCAGCCTGAAACTCTCCAGTGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTATTACTGTGCCTCT
 ATCGCTGTGCGCGGGTCTTTTTTTGATTATTGGGGCCAGGGGACACTGGTGACCGTTAG
 CAGCGGGGGAGGAGGGTCCGGTGGCGGCGGCAGCGGAGGCGGGGTTTCAGAAATTGTAC
 TGACCCAGTCCCCCGGCACGCTCTCTCTCCCCAGGGGAAAGGGCAACCCTTAGCTGC
 CGGGCGAGCCAGAGCGTGAGTTCCTCCTACCTCGCGTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACA
 GGCTCCCAGACTGCTGATTTACGGGGCTTCTACGAGAGCCACCGGCATACCTGATAGGT
 TCTCTGGCTCCGGGTCTGGGACCGACTTTACTCTTACAATCAGCAGACTTGAGCCTGAA
 GACTTCGCTGTGTATTATTGTCAACAATACGGAACGTCCCCCTTACCTTTGGTGGCGG
 GACAAAAGTGGAAATTAAGAGGGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAA
 TCATTCACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAG
 CCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCAC
 CGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTCGCTTTTCCGTCGTTAAGCGGGGGAGAAAAAAGC
 TGCTGTACATTTTCAAACAGCCGTTTATGAGGCCGGTCCAAACGACTCAGGAAGAAGAC

GGCTGCTCCTGCCGCTTTCCTGAGGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAAGTCTGAGGGTGAAGTT
 TTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGC
 TCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCT
 GAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCA
 GAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGG
 GAAAAGGGCACGACGGTTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGAC
 GCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO:17)

AA de construto 1H2.1 4-1BB (sequência sinal a negrito; CDRs
 sublinhadas)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSYYWTWIR
 QPPGKGLEWIGYIYYSGTTNYPNPSLKSRTISVDTSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCAS
 IAVRGFFFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLVSLSPGERATLSC
 RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE
 DFAVYYCQQYGTSPITFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFLPGPSK
 PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRFVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
 GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDP
 EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYD
 ALHMQALPPR (SEQ ID NO:18)

DNA de construto 1H2.1 CD28T (sequência sinal a negrito)

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTCTGCTGCTGCGGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGCACG
CCCCCAGGTGCAACTGCAGGAAAGCGGGCCCGGTCTGGTGAAGCCCTCAGAAACGCTCT
 CCCTCACCTGTACAGTCTCTGGCGATTCAATCTCTTCATATTACTGGACGTGGATCAGG
 CAGCCTCCCGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGATATATCTACTATAGTGGCACCCTAA
 CTATAATCCTTCCCTGAAAAGCCGGGTGACAATCTCTGTTGACACCTCCAAGAGCCAGT
 TCAGCCTGAAACTCTCCAGTGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTATTACTGTGCCTCT
 ATCGCTGTGCGCGGGTCTTTTTTTGATTATTGGGGCCAGGGGACACTGGTGACCGTTAG
 CAGCGGGGGAGGAGGGTCCGGTGGCGGCGGCAGCGGAGGCGGGGTTTCAGAAATTGTAC
 TGACCCAGTCCCCCGGCACGCTCTCTCTCTCCCCAGGGGAAAGGGCAACCCTTAGCTGC
 CGGGCGAGCCAGAGCGTGAGTTCCTCCTACCTCGCGTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACA
 GGCTCCAGACTGCTGATTTACGGGGCTTCTACGAGAGCCACCGGCATACCTGATAGGT

TCTCTGGCTCCGGGTCTGGGACCGACTTTACTCTTACAATCAGCAGACTTGAGCCTGAA
 GACTTCGCTGTGTATTATTGTCAACAATACGGAACGTCCCCCTTACCTTTGGTGGCGG
 GACAAAAGTGAAATTAAGAGGGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAA
 TCATTCACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAG
 CCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCAC
 CGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATT
 ACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCA
 CCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGC
 TCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTGCGCAGAG
 AAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCG
 AGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCGTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGA
 GCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCT
 TGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCA
 CTGCCCCCACGCTAG (SEQ ID NO:19)

AA de construto 1H2.1 CD28T (sequência sinal a negrito; CDRs
 sublinhadas)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSYYWTWIR
 QPPGKLEWIGYIYYSGTTNYPNPSLKSRTVTSVDTSKSQFSLKLSVTAADTAVYYCAS
 IAVRGFFFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSC
 RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE
 DFAVYYCQQYGTSPFTFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPSK
 PFWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMPRRPGPTRKHYPYA
 PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREYDVLDRRGRDPEMGGKP
 RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
 LPPR (SEQ ID NO:20)

DNA de construto 8D2 4-1BB (sequência sinal a negrito)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGCACG
CCCCGCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAACGGCCGGGTGCAAGCGTGA
 AGGTGTCCTGCAAAGCCTCTGGCTATACCTTTACTGGGTACTATATGCACTGGGTTCGG
 CAGGCGCCAGGACAGGGTCTTGAGTGGATGGGTTGGATTGATCCAACTCTGGCGATAC

AAATTACGCACAGAAATTCCAGGGCCGCGTGACGATGACTCGAGACACTTCCATATCCA
 CCGCCTATATGGAAGTGAATAGACTCCGGTCTGACGACACTGCTGTCTATTACTGTGCA
 AGGGATCCCAACCGGCGGAGTTGGTATTACGGAATGGATGTCTGGGCCAGGGTACTAC
 CGTCACGGTGTCTTCTGGCGGCGGGGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGCGGTGGAGGAGGCA
 GCGATATTCAGATGACACAAAGCCCTTCTAGTCTCTCCGCAAGCGTTGGCGACCGCGTG
 ACCATTACGTGTCAGGCTTCAAGATATTCGAAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAA
 GCCCGGCAAAGCACCTAAGCTGCTGATTTATGACGCTAGCAACCTTGAGACTGGCGTCC
 CCTCCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCAGGCACCGACTTTACTTTTACCATCTCCACACTC
 CAGCCAGAAGATATTGCAACGTATTACTGCCAACATTATGATAACCTGCCTTTGACCTT
 CGGAGGTGGCACCAAGGTAGAGATCAGAAGAGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTCAA
 ACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGT
 CCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCT
 GCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTCGCTTTTCCGTCGTTAAGCGGGGA
 GAAAAAAGCTGCTGTACATTTTCAAACAGCCGTTTATGAGGCCGGTCCAAACGACTCAG
 GAAGAAGACGGCTGCTCCTGCCGCTTTCCTGAGGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAACCTGAG
 GGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGT
 ATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTTGACAAGCGCAGAGGA
 CGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAGGAGGGTCTCTATAA
 TGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGC
 GGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGAT
 ACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO:21)

AA de construto 8D2 4-1BB (sequência sinal a negrito)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFTGYMHWVR
 QAPGQGLEWMGWIDPNSGDTNYAQKFQGRVTMTRDTSISSTAYMEVNRLRSDDTAVYYCA
 RDPNRRSWYYGMDVWAQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRA
 TITCQASQDIRNYLNWYQQKPKAPKLLIYDASNLETGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISTL
 QPEDIATYYCQHYDNLPLTFGGGTKVEIRRAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPG
 PSKPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRFVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQ
 EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG

RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLQGLSTATKD
TYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:22)

DNA de construto 8D2 CD28T (sequência sinal a negrito)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGCACG
CCCCGCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAACGGCCGGGTGCAAGCGTGA
AGGTGTCCTGCAAAGCCTCTGGCTATACCTTTACTGGGTACTATATGCACTGGGTTCCG
CAGGCGCCAGGACAGGGTCTTGAGTGGATGGGTTGGATTGATCCAACTCTGGCGATAC
AAATTACGCACAGAAATTCCAGGGCCGCGTGACGATGACTCGAGACACTTCCATATCCA
CCGCCTATATGGAAGTGAATAGACTCCGGTCTGACGACACTGCTGTCTATTACTGTGCA
AGGGATCCCAACCGGCGGAGTTGGTATTACGGAATGGATGTCTGGGCCAGGGTACTAC
CGTCACGGTGTCTTCTGGCGGCGGGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGCGGTGGAGGAGGCA
GCGATATTCAGATGACACAAAGCCCTTCTAGTCTCTCCGCAAGCGTTGGCGACCGCGTG
ACCATTACGTGTCAGGCTTCACAAGATATTCGAAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAA
GCCCCGCAAAGCACCTAAGCTGCTGATTTATGACGCTAGCAACCTTGAGACTGGCGTCC
CCTCCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCAGGCACCGACTTTACTTTTACCATCTCCCACTC
CAGCCAGAAGATATTGCAACGTATTACTGCCAACATTATGATAACCTGCCTTTGACCTT
CGGAGGTGGCACCAAGGTAGAGATCAGAAGAGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTCAA
ACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTACCCTTGTTCCCTGGT
CCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCT
GCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCC
ATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAG
CCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATC
AGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGG
GTCGCAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGG
GGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAA
AATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTC
ACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCAC
ATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO:23)

AA de construto 8D2 CD28T (sequência sinal a negrito)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFTGYMHWVR
 QAPGQGLEWMGWIDPNSGDTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEVNRLRSDDTAVYYCA
 RDPNRRSWYYGMDVWAQGTFTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV
 TITCQASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFFTTISTL
 QPEDIATYYCQHYDNLPLTFGGGTKVEIRRAALDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFLFPG
 PSKPFWLVVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYYQ
 PYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPENG
 GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
 MQALPPR (SEQ ID NO:24)

DNA de construto 6B2 CD28T (sequência sinal a negrito)

ATGGCACTCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGCACG
CCCGCAAGTGCAGTTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCAGGCGCTAGCGTCA
 AAGTGAGCTGTAAGGCCTCAGGTTACACGTTTACTGGGTACTATATGCATTGGGTCAGG
 CAAGCCCCTGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCTGGATTAATCCTAACAGCGGGGACAC
 AAGCTATGCCCAACGCTTCTTGGGCAGAGTAACAATGACACGGGATAACAAGTATTAACA
 CCGTCCATATGGAAGTCTCTCGGCTCGGCTCAGATGATACCGCGGTTTATTACTGTGCT
 AGGGAGGACGACTCCTCTTGGTATGGCAGCTTCGATTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGT
 GACAGTCTCATCTGGTGGAGGGGGCTCCGGGGGTGGGGGCAGCGGAGGGGGAGGTTCTG
 ATATACAGATGACTCAGAGTCCCTCAAGCTTGAGTGCCAGTGTAGGCGACCGGGTGACG
 ATAACCTGTAGGGCTTCACAGGGAATCAGAAATTATCTGGGTTGGTACCAGCAGAAGCC
 AGGAAAGGCACCTAAAAGACTTATTTACGCCGCATCCTCCTTGCAGTCCGGCGTGCCAT
 CAAAATTTTCTGGGAGCGGCTCTGGAACCGAGTTCACCCTCACGATCTCCAGCCTCCAG
 CCCGAGGACTTTGCCACCTACTATTGCCTGCAGCACGATAGTGATCTGCGAACTTTTGG
 GCAAGGCACTAAAGTGGAAATTAAGAGAGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTCAAACG
 GAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCA
 TCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCT
 CGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATA
 GCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCT
 TACGCACCACCTAGAGATTTCTGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGC
 TGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTC

GCAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGG
 AAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAAT
 GGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACG
 ATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATG
 CAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO:25)

AA de construto 6B2 CD28T (sequência sinal a negrito)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHWVR
 QAPGQGLEWMGWINPNSGDTSYAQRFLGRVTMTRDTSINTVHMELSRLGSDDTAVYYCA
 REDDSSWYGSFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVIT
 ITCRASQGIRNYLGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPSKFSGSGSGTEFTLTISLQ
 PEDFATYYCLQHDSDLRFTFGQGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP
 SKPFWVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWVRSKRRLHSDYMNMPRRPGPTRKHYQP
 YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
 QALPPR (SEQ ID NO:26)

DNA de construto 6B2 4-1BB (sequência sinal a negrito)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGCACG
CCCCCAAGTGCAGTTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCAGGCGCTAGCGTCA
 AAGTGAGCTGTAAGGCCTCAGGTTACACGTTTACTGGGTACTATATGCATTGGGTCAGG
 CAAGCCCCTGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCTGGATTAATCCTAACAGCGGGGACAC
 AAGCTATGCCCAACGCTTCTGGGCAGAGTAACAATGACACGGGATACAAGTATTAACA
 CCGTCCATATGGAACCTCTCTCGGCTCGGCTCAGATGATACCGCGGTTTATTACTGTGCT
 AGGGAGGACGACTCCTCTTGGTATGGCAGCTTCGATTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGT
 GACAGTCTCATCTGGTGGAGGGGGCTCCGGGGGTGGGGGCAGCGGAGGGGGAGGTTCTG
 ATATACAGATGACTCAGAGTCCCTCAAGCTTGAGTGCCAGTGTAGGCGACCGGGTGACG
 ATAACCTGTAGGGCTTCACAGGGAATCAGAAATTATCTGGGTTGGTACCAGCAGAAGCC
 AGGAAAGGCACCTAAAAGACTTATTTACGCCGCATCCTCCTTGCAGTCCGGCGTGCCAT
 CAAAATTTTCTGGGAGCGGCTCTGGAACCGAGTTCACCCTCACGATCTCCAGCCTCCAG
 CCCGAGGACTTTGCCACCTACTATTGCCTGCAGCACGATAGTGATCTGCGAACTTTTGG
 GCAAGGCACTAAAGTGAAATTAAGAGAGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTCAAACG

GAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCTGGTCCA
 TCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTACTCTCTGCT
 CGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTCGCTTTTCCGTCGTTAAGCGGGGAGAA
 AAAAGCTGCTGTACATTTTCAAACAGCCGTTTATGAGGCCGGTCCAAACGACTCAGGAA
 GAAGACGGCTGCTCCTGCCGCTTTCCTGAGGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAACCTGAGGGT
 GAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATA
 ACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGG
 GACCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGA
 GCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGA
 GAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACT
 TATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO:27)

AA de construto 6B2 4-1BB (sequência sinal a negrito)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKASGYTFTGYMHWVR
 QAPGQGLEWMMWINPNSGDTSYAQRFLGRVTMTRDTSINTVHMELSRLGSDDTAVYYCA
 REDDSSWYGSFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVT
 ITCRASQGI RNYLGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPSKFSGSGSGTEFTLTISLQ
 PEDFATYYCLQHDSDLRTFGQGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP
 SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRFVSVVVRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQE
 EDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGR
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLGLSTATKDT
 YDALHMQUALPPR (SEQ ID NO:28)

AA de isoforma 1 de DLL3 humano NM_016941 (618 aminoácidos)

MVSPRMSGLLSQTIVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGGAPRSPCSARLPCLRF
 FRVCLKPGLS EEAESPALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPG
 TFSFIIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRAR
 CEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRGPGRLPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGE
 CRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRS
 FECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRV
 DRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAH
 RCSCALGFGGDRERADPCAARPCAHHGRCYAHFSGLVCACAPGYMGARCEFPVHPDG

ASALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRGHSQDAGSRLLAG
 TPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSVVDWNRPEDVDPQGIYVISAPSIYAREVATP
 LFPPLHTGRAGQRQHLLFPYPSSILSVK (SEQ ID NO:29)

AA de isoforma 2 de DLL3 humano NM_203486 (587 aminoácidos)
 MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGGAPRSPCSARLPCRLF
 FRVCLKPGLSEEAAESPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPG
 TFSFIIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRAR
 CEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRCPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGE
 CRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRS
 FECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRV
 DRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAH
 RCSCALGFGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDG
 ASALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRGHSQDAGSRLLAG
 TPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSVVDWNRPEDVDPQGIYVISAPSIYAREA (S
 EQ ID NO:30)

DNA de Peptídeo Sinal de CAR

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGCACG
 CCGG (SEQ ID NO:31)

Peptídeo Sinal de CAR: MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID
 NO:32)

DNA de ligante G4S de scFv

GGCGGTGGAGGCTCCGGAGGGGGGGGCTCTGGCGGAGGGGGCTCC (SEQ ID
 NO:33)

Ligante G4s de scFv: GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:34)

DNA de ligante Whitlow de scFv

GGGTCTACATCCGGCTCCGGGAAGCCCGGAAGTGGCGAAGGTAGTACAAAGGGG (SEQ
 ID NO:35)

Ligante Whitlow de scFv: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:36)

Sequência de Ácidos Nucleicos de 4-1BB (domínio
 intracelular)

AAGCGGGGGAGAAAAAGCTGCTGTACATTTTCAAACAGCCGTTTATGAGGCCGGTCCAAACGACTC
AGGAAGAAGACGGCTGCTCCTGCCGCTTTCTGAGGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAACTG (SEQ ID
NO:37)

AA de 4-1BB (domínio intracelular)

KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO:38)

AA de OX40

RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO:39)

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[0181] Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes mencionados em este relatório descritivo são aqui incorporados por referência como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado como estando incorporado por referência. No entanto, a citação de uma referência aqui não deve ser considerada como um reconhecimento de que tal referência é técnica prévia à presente invenção. Na medida em que qualquer das definições ou termos proporcionados nas referências incorporadas por referência difiram dos termos e discussão proporcionados aqui, os presentes termos e definições prevalecerão.

EQUIVALENTES

[0182] O relatório descritivo escrito anterior é considerado como sendo suficiente para permitir ao perito na técnica praticar a invenção. A descrição anterior e os exemplos detalham certas modalidades preferenciais da invenção e descrevem o melhor modo contemplado pelos inventores. Será apreciado, no entanto, que independentemente de quão detalhado o anterior possa aparecer no texto, a invenção pode ser praticada de muitos

modos e a invenção deve ser interpretada de acordo com as reivindicações anexas e quaisquer seus equivalentes.

[0183] Os seguintes exemplos, incluindo as experiências conduzidas e os resultados alcançados, são proporcionados somente para propósitos ilustrativos e não são para ser considerados como limitando a presente invenção.

EXEMPLO 1

[0184] Um vetor de transferência lentiviral de terceira geração contendo os diferentes construtos de CAR foi usado em conjunto com o ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Life Technologies) para gerar os sobrenadantes lentivirais. Brevemente, uma mistura de transfecção foi gerada por mistura de 15 µg de DNA e 22,5 µL de polietilenoimina (Polysciences, 1 mg/mL) em 600 µL de meio OptiMEM. A mistura foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Simultaneamente, células 293T (ATCC) foram tripsinizadas, contadas e um total de 10×10^6 células totais foi plaqueado em um frasco T75 ao lado da mistura de transfecção. Três dias após transfecção, os sobrenadantes foram coletados e filtrados através de um filtro de 0,45 µm e armazenados a -80 °C até serem usados. As PBMCs foram isoladas de *leucopaks* de doadores saudáveis (Hemacare) usando centrifugação de densidade ficoll-paque conforme as instruções do fabricante. As PBMCs foram estimuladas usando OKT3 (50 ng/mL, Miltenyi Biotec) em meio R10 + IL-2 (300 IU/mL, Proleukin®, Prometheus® Therapeutics and Diagnostics). Quarenta e oito horas pós-estimulação, as células foram transduzidas usando lentivírus a um MOI = 10. As células foram mantidas a $0,5-2,0 \times 10^6$ células/mL antes do uso em ensaios de atividade. Para se examinar a expressão de CAR, as células T foram coradas com reagente de detecção

DLL3-Fc (Amgen, Inc.) ou Proteína L biotinizada (Thermo Scientific) em tampão de coloração (BD Pharmingen) durante 30 minutos a 4 °C. As células foram depois lavadas e coradas com anti-Fc-PE (Miltenyi Biotec) ou PE estreptavidina (BD Pharmingen) em tampão de coloração durante 30 minutos a 4 °C. As células foram depois lavadas e ressuspensas em tampão de coloração com iodeto de propídio (BD Pharmingen) antes da aquisição de dados. A expressão de CARs de DLL3 em células T de um dador saudável é mostrada na FIGURA 1. Os números em cada caixa indicam a percentagem da população positiva.

EXEMPLO 2

[0185] Para se examinar a atividade citolítica em células T CAR de DLL3 transduzidas com lentivírus, as células efetoras foram cultivadas com células alvo a uma razão E:T de 1:1 em meio R10. Dezesesseis e quarenta horas pós-cocultura, os sobrenadantes foram analisados por Luminex (EMD Millipore) e a viabilidade das células alvo foi avaliada por análise citométrica de fluxo da captação de iodeto de propídio (PI) por células negativas quanto a CD3. A atividade citolítica média de células T CAR transduzidas com lentivírus de dadores saudáveis é mostrada na FIGURA 2 (as células EoL1 são controle, H82 e EoL1-DLL3 expressam DLL3 na superfície) e a produção de citocinas por células T CAR de um dador saudável é mostrada na FIGURA 3.

EXEMPLO 3

[0186] Para se avaliar a proliferação de células T CAR em resposta às células alvo expressando DLL3, as células T foram marcadas com CFSE antes da cocultura com células alvo a uma razão E:T de 1:1 em meio R10. Cinco dias mais tarde, a proliferação de células T foi avaliada por análise

citométrica de fluxo de diluição com CFSE (FIGURA 4). A proliferação de células T CAR de DLL3 é mostrada na FIGURA 5.

EXEMPLO 4

[0187] Para se examinar a atividade antitumoral *in vivo*, células T CAR de DLL3 foram geradas para uso em um modelo xenogênico de SCLC humano. Células SHP-77 marcadas com luciferase (2×10^6 /animal) foram injetadas intravenosamente em camundongos NSG fêmeas de 5 a 6 semanas de idade. Após 6 dias, 6×10^6 células T (~ 50% CAR⁺) em 200 μ L de PBS foram injetadas intravenosamente e a carga tumoral dos animais foi medida semanalmente usando visualização de bioluminescência. Como mostrado na FIGURA 6, a injeção de células T CAR de DLL3 reduziu significativamente a carga tumoral em todos os pontos temporais examinados (nt = controle não transfectado; CAR1 = 1H2.1-C28T-CD28-CD3 ζ ; CAR2 = 1H2.1-C28T-4-1BB-CD3 ζ ; CAR3 = 1H2.1-C8k-CD28-CD3 ζ ; CAR4 = 1H2.1-C8k-4-1BB-CD3 ζ). Como mostrado na FIGURA 6, isto foi adicionalmente confirmado com análise de sobrevivência onde a injeção de células T CAR expressando 1H2-CD28T ou 1H2-4-1BB conferiu uma vantagem de sobrevivência significativa em relação aos animais que receberam células transduzidas simuladas.

Reivindicações

1. Receptor de antígeno quimérico caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de ligação ao antígeno que se liga especificamente a DLL3, em que a molécula de ligação ao antígeno compreende:

a) uma CDR1 de cadeia pesada variável compreendendo uma sequência de aminoácidos diferindo em não mais do que 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos daquela de SEQ ID NO:42 ou SEQ ID NO:52 ou SEQ ID NO:62; ou

b) uma CDR2 de cadeia pesada variável compreendendo uma sequência de aminoácidos diferindo em não mais do que 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos daquela de SEQ ID NO:43 ou SEQ ID NO:53 ou SEQ ID NO:63; ou

c) uma CDR3 de cadeia pesada variável compreendendo uma sequência de aminoácidos diferindo em não mais do que 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos daquela de SEQ ID NO:44 ou SEQ ID NO:54 ou SEQ ID NO:64; ou

d) uma CDR1 de cadeia leve variável compreendendo uma sequência de aminoácidos diferindo em não mais do que 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos daquela de SEQ ID NO:47 ou SEQ ID NO:57 ou SEQ ID NO:67; ou

e) uma CDR2 de cadeia leve variável compreendendo uma sequência de aminoácidos diferindo em não mais do que 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos daquela de SEQ ID NO:48 ou SEQ ID NO:58 ou SEQ ID NO:68; ou

f) uma CDR3 de cadeia leve variável compreendendo uma sequência de aminoácidos diferindo em não mais do que 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos daquela de SEQ ID:49 ou SEQ ID NO:59 ou SEQ ID NO:69; ou

- g) uma CDR1 de cadeia pesada variável compreendendo uma sequência de aminoácidos de uma sequência de CDR1 de cadeia pesada variável do clone 1H2.1, clone 8D2 ou clone 6B2; ou
- h) uma CDR2 de cadeia pesada variável compreendendo uma sequência de aminoácidos de uma sequência de CDR2 de cadeia pesada variável do clone 1H2.1, clone 8D2 ou clone 6B2; ou
- i) uma CDR3 de cadeia pesada variável compreendendo uma sequência de aminoácidos de uma sequência de CDR3 de cadeia pesada variável do clone 1H2.1, clone 8D2 ou clone 6B2; ou
- j) uma CDR1 de cadeia leve variável compreendendo uma sequência de aminoácidos de uma sequência de CDR1 de cadeia leve variável do clone 1H2.1, clone 8D2 ou clone 6B2; ou
- k) uma CDR2 de cadeia leve variável compreendendo uma sequência de aminoácidos de uma sequência de CDR2 de cadeia leve variável do clone 1H2.1, clone 8D2 ou clone 6B2; ou
- l) uma CDR3 de cadeia leve variável compreendendo uma sequência de aminoácidos de uma sequência de CDR3 de cadeia leve variável do clone 1H2.1, clone 8D2 ou clone 6B2; ou
- m) uma sequência de cadeia pesada variável diferindo em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos da sequência de cadeia pesada variável do clone 1H2.1, clone 8D2 ou clone 6B2; ou
- n) uma sequência de cadeia leve variável diferindo em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos da sequência de cadeia leve variável do clone 1H2.1, clone 8D2 ou clone 6B2.

2. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente pelo menos um domínio coestimulador.

3. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente pelo menos um domínio de ativação.

4. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador é uma região de sinalização de CD28, CD8, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, morte programada-1 (PD-1), coestimulador indutível de células T (ICOS), antígeno-1 associado à função de linfócitos (LFA-1 (CD11a/CD18), CD3 gama, CD3 delta, CD3 épsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gama, molécula de MHC classe I, proteínas receptoras de TNF, uma Proteína de imunoglobulina, receptor de citocina, integrinas, Moléculas de Ativação Linfocítica de Sinalização (proteínas SLAM), receptores de células NK de ativação, BTLA, um receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gama, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tátil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, um ligando que se liga especificamente a CD83 ou qualquer sua combinação.

5. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador compreende CD28.

6. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador de CD28 compreende uma sequência que difere em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos da sequência de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8.

7. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador compreende CD8.

8. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador de CD8 compreende uma sequência que difere em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos da sequência de SEQ ID NO:14.

9. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador compreende 4-1BB.

10. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador de CD8 compreende uma sequência que difere em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos da sequência de SEQ ID NO:16.

11. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o domínio de ativação compreende CD3.

12. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o CD3 compreende CD3 zeta.

13. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o CD3 zeta compreende uma sequência que difere em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos da sequência de SEQ ID NO:10.

14. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador compreende uma sequência que difere em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos da sequência de SEQ ID NO:2 e o domínio de ativação compreende uma sequência que difere em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos de aminoácidos da sequência de SEQ ID NO:10.

15. Polinucleotídeo caracterizado pelo fato de que codifica o receptor de antígeno quimérico, conforme definido na reivindicação 1.

16. Vetor caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo, conforme definido na reivindicação 15.

17. Vetor, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que é um vetor retroviral, um vetor de DNA, um plasmídeo, um vetor de RNA, um vetor adenoviral, um vetor associado a adenovírus, um vetor lentiviral ou qualquer sua combinação.

18. Célula imunitária caracterizada pelo fato de que compreende o vetor, conforme definido na reivindicação 16.

19. Célula imunitária, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que a célula imunitária é uma

célula T, linfócito infiltrante de tumores (TIL), célula NK, célula expressando TCR, célula dendrítica ou célula NK-T.

20. Célula imunitária, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a célula é uma célula T autóloga.

21. Célula imunitária, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a célula é uma célula T alogênica.

22. Célula imunitária, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que o vetor é introduzido em uma célula que é isolada do corpo de um paciente ou que é cultivada a partir de uma amostra retirada do corpo de um paciente.

23. Célula imunitária, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que o vetor é introduzido em uma célula que é isolada do corpo de um dador ou que é cultivada a partir de uma amostra retirada do corpo de um paciente.

24. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende uma célula imunitária, conforme definida na reivindicação 18.

25. Receptor de antígeno quimérico caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) uma região VH do clone 1H2.1 e uma região VL do clone 1H2.1;

(b) uma região VH do clone 8D2 e uma região VL do clone 8D2;
ou

(c) uma região VH do clone 6B2 e uma região VL do clone 6B2;
em que a região VH e VL está ligada por pelo menos um ligante.

26. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o ligante

compreende o ligante G4S de scFv ou o ligante Whitlow de scFv.

27. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente um domínio coestimulador.

28. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente um domínio de ativação.

29. Receptor de antígeno quimérico, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador é uma região de sinalização de CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, morte programada-1 (PD-1), coestimulador indutível de células T (ICOS), antígeno-1 associado à função de linfócitos (LFA-1 (CD11a/CD18), CD3 gama, CD3 delta, CD3 épsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gama, molécula de MHC classe I, proteínas receptoras de TNF, uma Proteína de imunoglobulina, receptor de citocina, integrinas, Moléculas de Ativação Linfocítica de Sinalização (proteínas SLAM), receptores de células NK de ativação, BTLA, um receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gama, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tátil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08),

SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, um ligando que se liga especificamente a CD83 ou qualquer sua combinação.

30. Célula imunitária caracterizada pelo fato de que compreende o receptor de antígeno quimérico, conforme definido na reivindicação 25.

31. Célula imunitária, de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que a célula imunitária é uma célula T, linfócito infiltrante de tumores (TIL), célula NK, célula expressando TCR, célula dendrítica ou célula NK-T.

32. Célula T, de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de que é uma célula T autóloga.

33. Célula T, de acordo com a reivindicação 32, caracterizada pelo fato de que é uma célula T alogênica.

34. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende a célula, conforme definida na reivindicação 30.

35. Polinucleotídeo isolado caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência codificando o receptor de antígeno quimérico, conforme definido na reivindicação 25.

36. Vetor caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo, conforme definido na reivindicação 35.

37. Célula imunitária caracterizada pelo fato de que compreende o vetor, conforme definido na reivindicação 36.

38. Célula imunitária, de acordo com a reivindicação 37, caracterizada pelo fato de que a célula imunitária é uma célula T, linfócito infiltrante de tumores (TIL), célula NK, célula expressando TCR, célula dendrítica ou célula NK-T.

39. Célula T, de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de que é uma célula T autóloga.

40. Célula T, de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de que é uma célula T alogênica.

41. Polipeptídeo isolado caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de aminoácidos do construto 1H2.1 CD28T, construto 1H2.1 4-1BB, construto 8D2 CD28T, construto 8D2 4-1BB, construto 6B2 CD28T ou construto 6B2 4-1BB.

42. Vetor caracterizado pelo fato de que codifica o polipeptídeo, conforme definido na reivindicação 41.

43. Célula imunitária, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo, conforme definido na reivindicação 41.

44. Célula imunitária, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de que a célula imunitária é uma célula T, linfócito infiltrante de tumores (TIL), célula NK, célula expressando TCR, célula dendrítica ou célula NK-T.

45. Célula T, de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que é uma célula T autóloga.

46. Célula T, de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que é uma célula T alogênica.

47. Polinucleotídeo isolado caracterizado pelo fato de que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de células T (TCR) compreendendo uma molécula de ligação ao antígeno que se liga especificamente a DLL3, em que a molécula de ligação ao antígeno compreende uma CDR3 de cadeia pesada variável compreendendo a sequência de aminoácidos de uma CDR3 de cadeia pesada variável do clone 1H2.1, clone 8D2 ou clone 6B2.

48. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente um domínio de ativação.

49. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que o domínio de ativação é CD3.

50. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o CD3 é CD3 zeta.

51. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o CD3 zeta compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO:9.

52. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente um domínio coestimulador.

53. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador é uma região de sinalização de CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, morte programada-1 (PD-1), coestimulador indutível de células T (ICOS), antígeno-1 associado à função de linfócitos (LFA-1 (CD11a/CD18), CD3 gama, CD3 delta, CD3 epsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gama, molécula de MHC classe I, proteínas receptoras de TNF, uma Proteína de imunoglobulina, receptor de citocina, integrinas, Moléculas de Ativação Linfocítica de Sinalização (proteínas SLAM), receptores de células NK de ativação, BTLA, um receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFRR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gama, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tátil), CEACAM1,

CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, um ligando que se liga especificamente a CD83 ou qualquer sua combinação.

54. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador de CD28 codifica a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO 2.

55. Vetor caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo, conforme definido na reivindicação 47.

56. Célula imunitária caracterizada pelo fato de que compreende o vetor, conforme definido na reivindicação 55.

57. Célula imunitária, de acordo com a reivindicação 56, caracterizada pelo fato de que a célula imunitária é uma célula T, linfócito infiltrante de tumores (TIL), célula NK, célula expressando TCR, célula dendrítica ou célula NK-T.

58. Célula T, de acordo com a reivindicação 57, caracterizada pelo fato de que é uma célula T autóloga.

59. Célula T, de acordo com a reivindicação 57, caracterizada pelo fato de que é uma célula T alogênica.

60. Polinucleotídeo isolado caracterizado pelo fato de que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de células T (TCR), compreendendo o referido CAR ou TCR uma molécula de ligação ao antígeno que se liga especificamente a DLL3, em que a molécula de ligação ao antígeno compreende:
a. uma sequência de cadeia pesada variável diferindo em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos da sequência de cadeia pesada variável do clone 1H2.1, clone 8D2 ou clone 6B2; e/ou

b. uma sequência de cadeia leve variável diferindo em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 resíduos da sequência de cadeia leve variável do clone 1H2.1, clone 8D2 ou clone 6B2.

61. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente um domínio de ativação.

62. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que o domínio de ativação é CD3.

63. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o CD3 é CD3 zeta.

64. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que o CD3 zeta compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO:9.

65. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente um domínio coestimulador.

66. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador é uma região de sinalização de CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, morte programada-1 (PD-1), coestimulador indutível de células T (ICOS), antígeno-1 associado à função de linfócitos (LFA-1 (CD11a/CD18), CD3 gama, CD3 delta, CD3 epsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gama, molécula de MHC classe I, proteínas receptoras de TNF, uma Proteína de imunoglobulina, receptor de citocina, integrinas, Moléculas de Ativação Linfocítica de Sinalização (proteínas SLAM), receptores de células NK de ativação, BTLA, um receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFRR, LIGHT,

HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gama, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1 ld, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 la, LFA-1, ITGAM, CD1 lb, ITGAX, CD1 lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tátil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, um ligando que se liga especificamente a CD83 ou qualquer sua combinação.

67. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador de CD28 compreende a sequência de nucleotídeos apresentada em SEQ ID NO 3.

68. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que o domínio coestimulador de CD28 zeta compreende a sequência de nucleotídeos apresentada em SEQ ID NO 1.

69. Polinucleotídeo isolado caracterizado pelo fato de que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de células T (TCR) compreendendo uma molécula de ligação ao antígeno que se liga especificamente a DLL3, em que a cadeia pesada da molécula de ligação ao antígeno compreende CDR1 (SEQ ID NO:42), CDR2 (SEQ ID NO:43) e CDR3 (SEQ ID NO:44) e a cadeia leve da molécula de ligação ao antígeno compreende CDR1 (SEQ ID NO:47), CDR2 (SEQ ID NO:48) e CDR3 (SEQ ID NO:49).

70. Polinucleotídeo isolado caracterizado pelo fato de que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de células T (TCR) compreendendo uma molécula de ligação ao antígeno que se liga especificamente a DLL3, em que a cadeia pesada da molécula de ligação ao antígeno compreende CDR1 (SEQ ID NO:52), CDR2 (SEQ ID NO:53) e CDR3 (SEQ ID NO:54) e a cadeia leve da molécula de ligação ao antígeno compreende CDR1 (SEQ ID NO:57), CDR2 (SEQ ID NO:58) e CDR3 (SEQ ID NO:59).

71. Polinucleotídeo isolado caracterizado pelo fato de que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) ou receptor de células T (TCR) compreendendo uma molécula de ligação ao antígeno que se liga especificamente a DLL3, em que a cadeia pesada da molécula de ligação ao antígeno compreende CDR1 (SEQ ID NO:62), CDR2 (SEQ ID NO:63) e CDR3 (SEQ ID NO:64) e a cadeia leve da molécula de ligação ao antígeno compreende CDR1 (SEQ ID NO:67), CDR2 (SEQ ID NO:68) e CDR3 (SEQ ID NO:69).

72. Método de tratamento de uma doença ou disfunção em um sujeito com sua necessidade caracterizado pelo fato de que compreende administração ao sujeito do polinucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 15, 47, 60, 69, 70 ou 71.

73. Método de tratamento de uma doença ou disfunção em um sujeito com sua necessidade caracterizado pelo fato de que compreende administração ao sujeito do polipeptídeo, conforme definido na reivindicação 41.

74. Método de tratamento de uma doença ou disfunção em um sujeito com sua necessidade caracterizado pelo fato de que compreende administração ao sujeito do receptor de antígeno

quimérico, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 ou 25.

75. Método de tratamento de uma doença ou disfunção em um sujeito com sua necessidade caracterizado pelo fato de que compreende administração ao sujeito da célula, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 18, 30, 37, 43 ou 56.

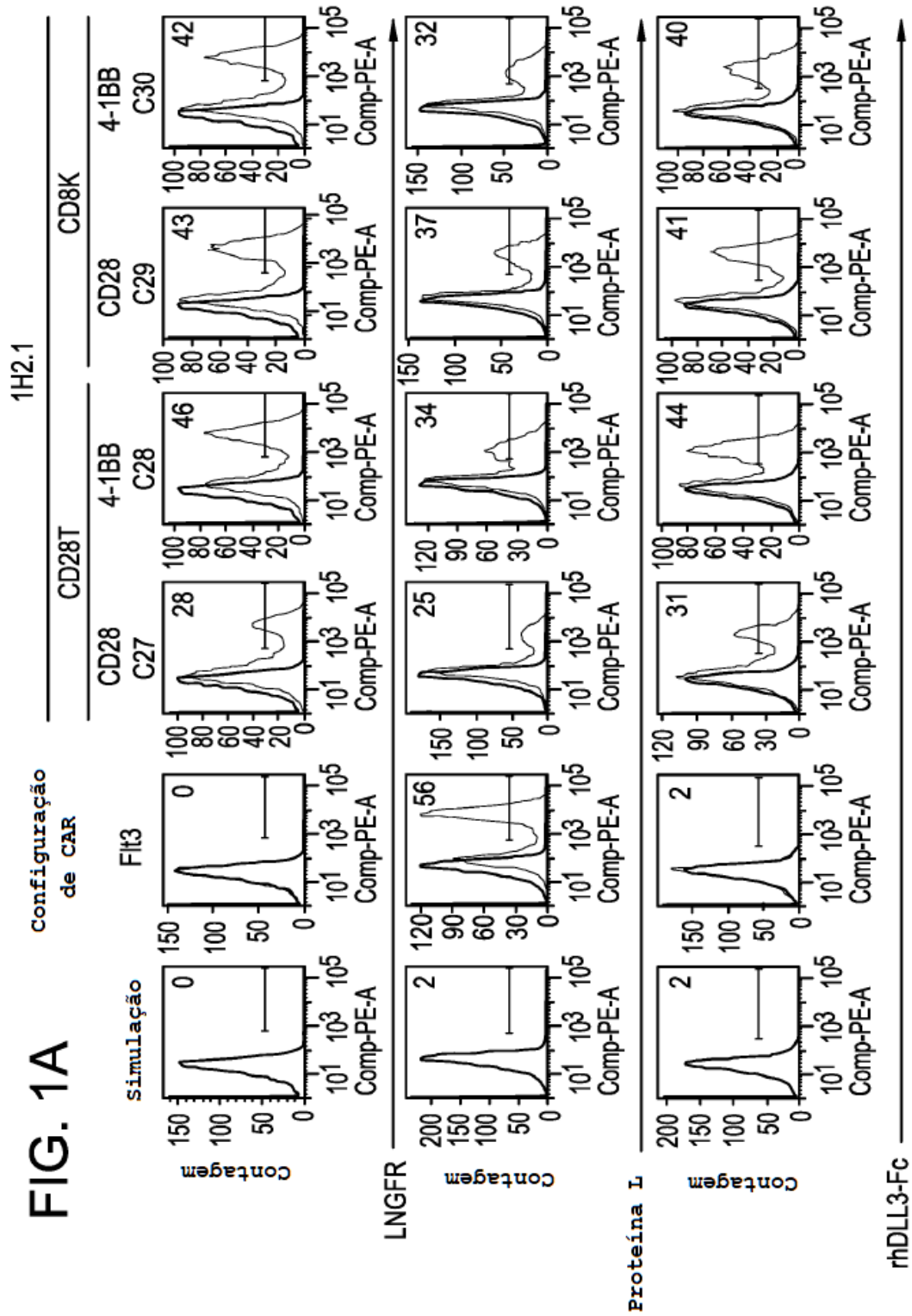
76. Método de tratamento de uma doença ou disfunção em um sujeito com sua necessidade caracterizado pelo fato de que compreende administração ao sujeito da composição farmacêutica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 24 ou 34.

77. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72, 73, 74, 75 ou 76 caracterizado pelo fato de que a doença ou disfunção é câncer.

78. Método, de acordo com a reivindicação 77, caracterizado pelo fato de que o câncer é adrenal, de fígado, rim, bexiga, mama, gástrico, de ovário, cervical, uterino, esofágico, colorretal, de próstata (p.ex., adenocarcinoma de próstata), pancreático, de pulmão (tanto pequenas células como não pequenas células), tireoide, carcinomas, sarcomas, glioblastomas, tumores de cabeça e pescoço, carcinoma neuroendócrino de células grandes (LCNEC), câncer medular de tireoide, glioblastoma, câncer neuroendócrino de próstata (NEPC), câncer gastroenteropancreático de elevado grau (GEP) e melanoma maligno.

79. Método, de acordo com a reivindicação 77, caracterizado pelo fato de que o câncer é câncer de pulmão de pequenas células.

80. Vetor lentiviral, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o vetor lentiviral é um vetor pGAR.



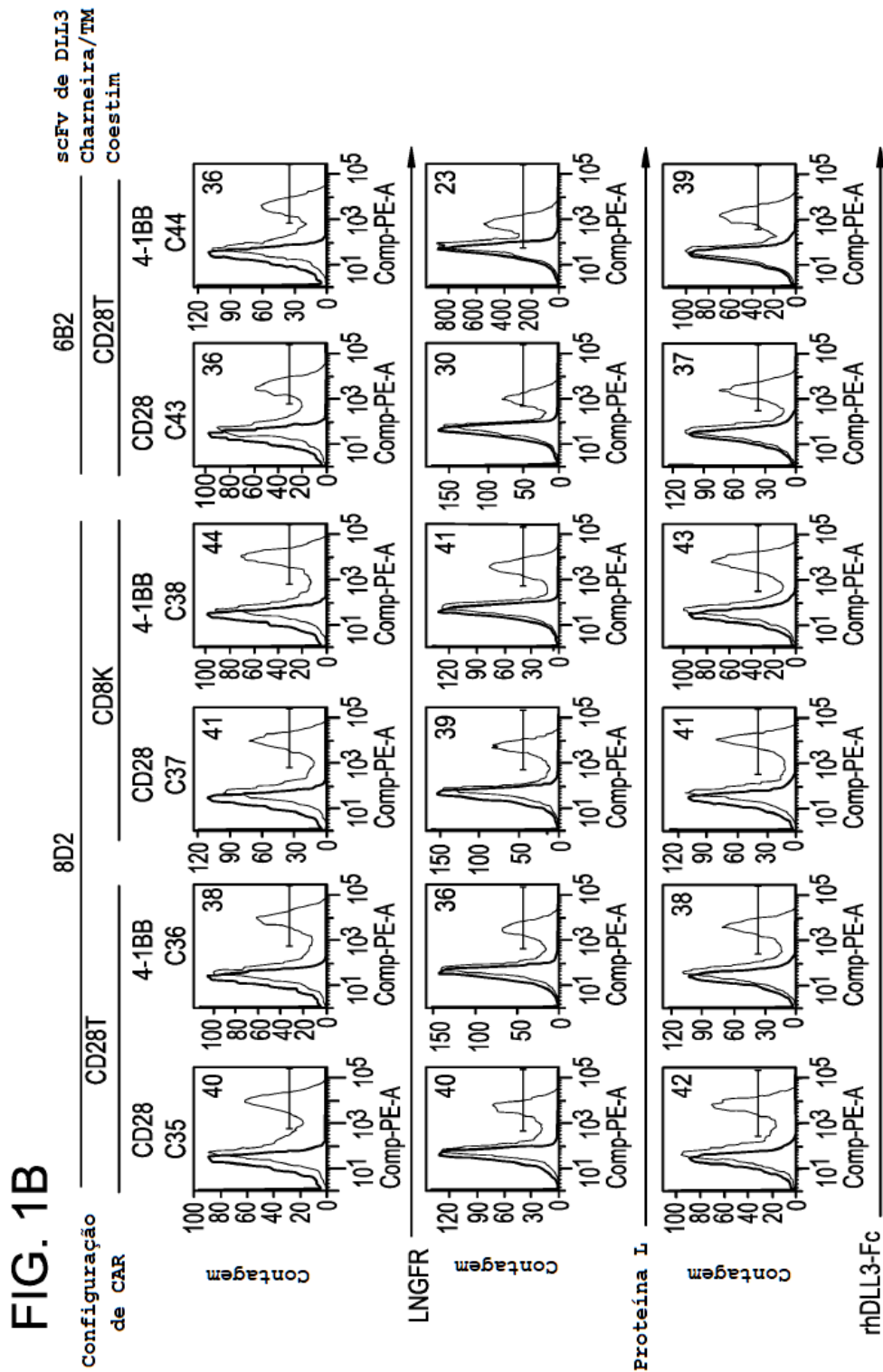


FIG. 2A

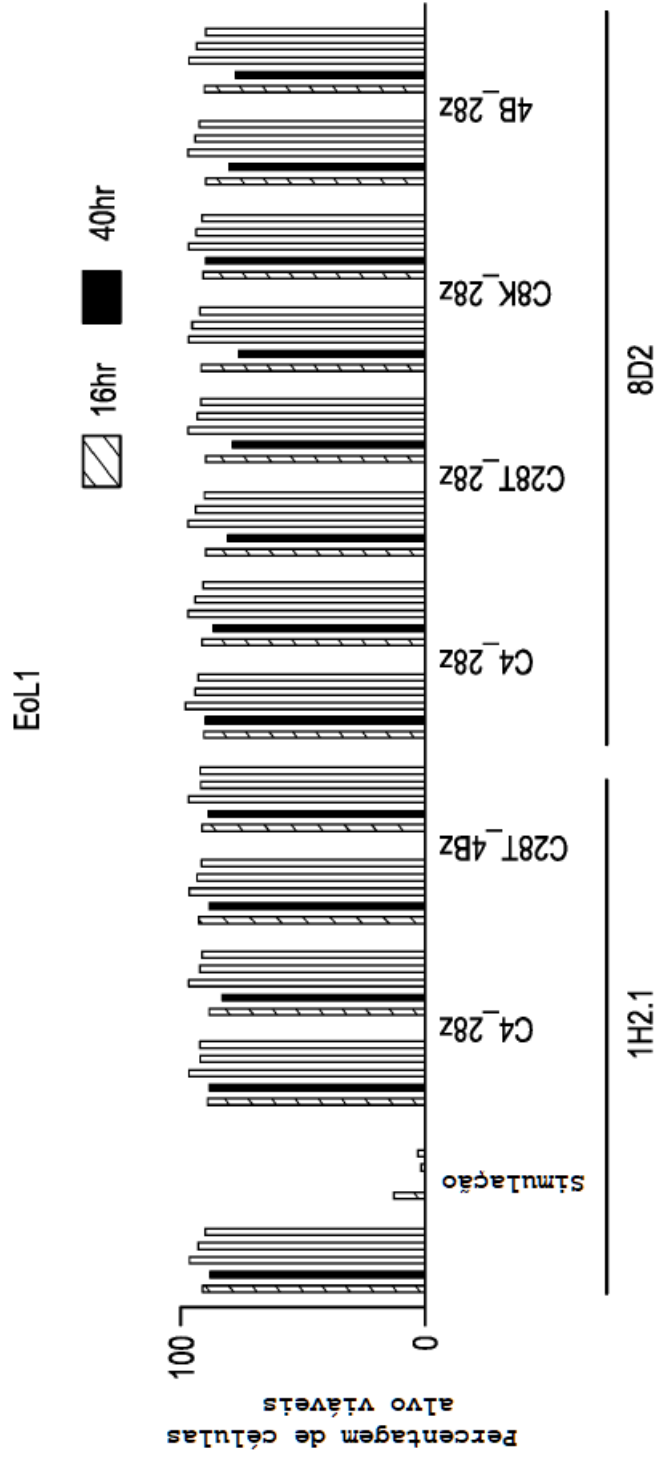


FIG. 2B

EoL1-DLL3

16hr 40hr

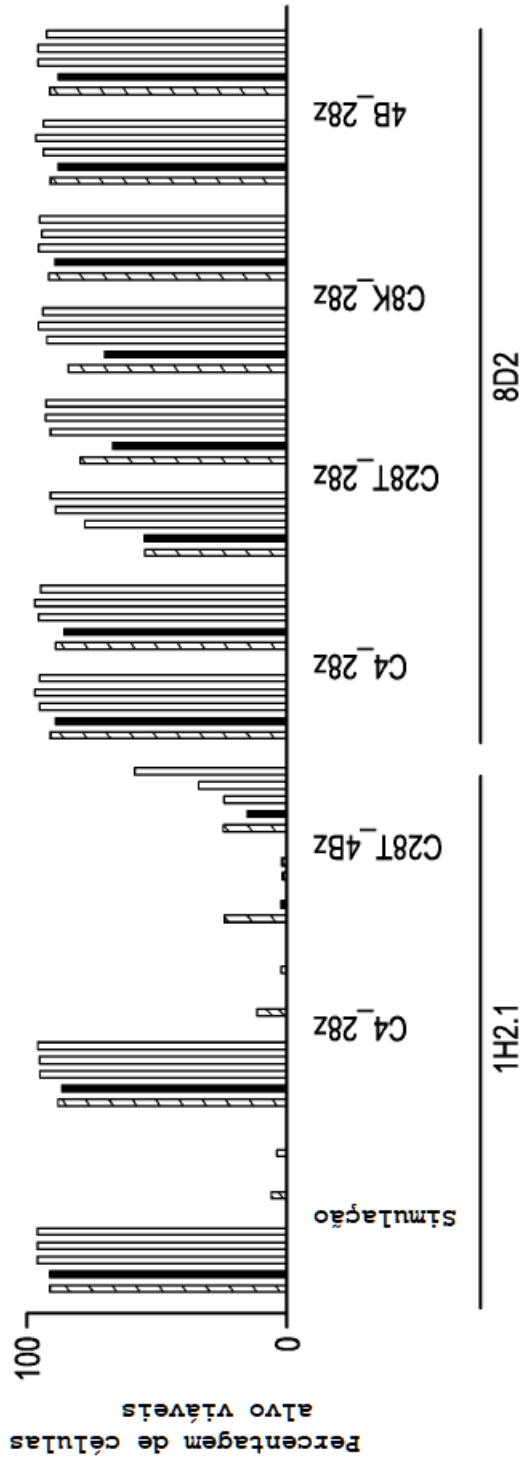


FIG. 2C

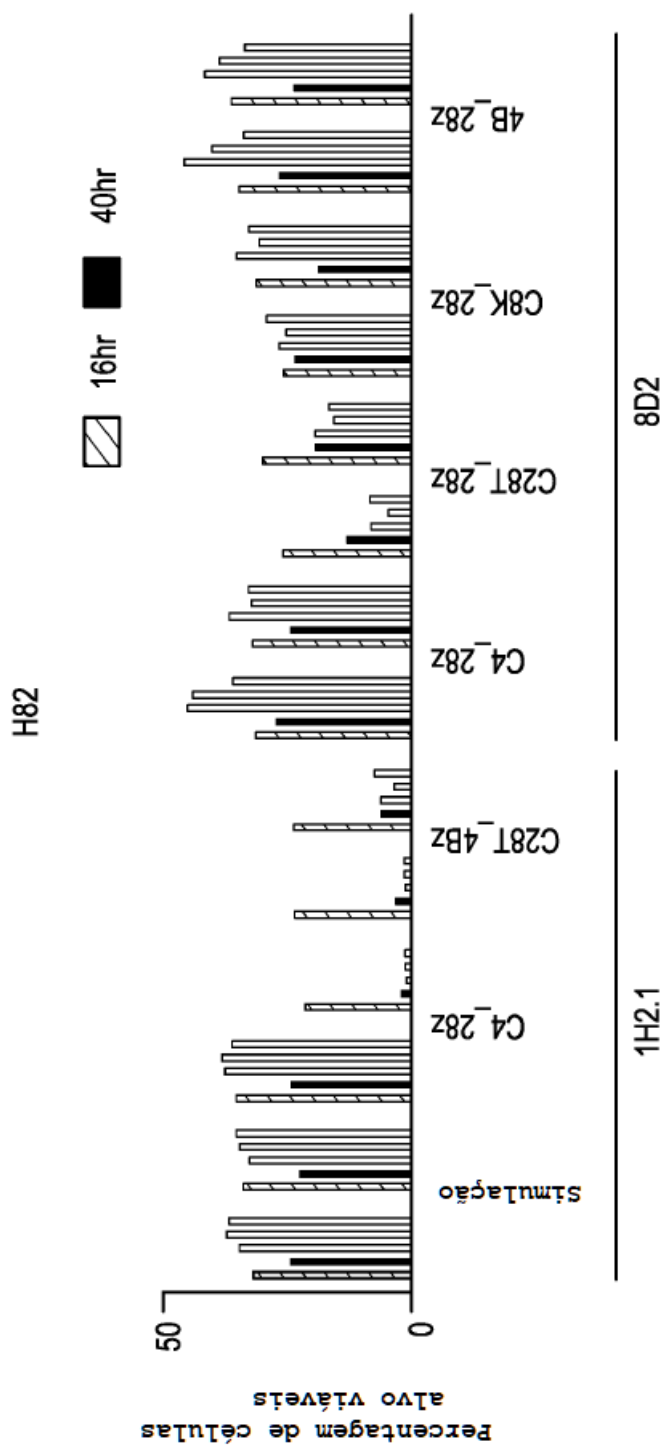


FIG. 3A

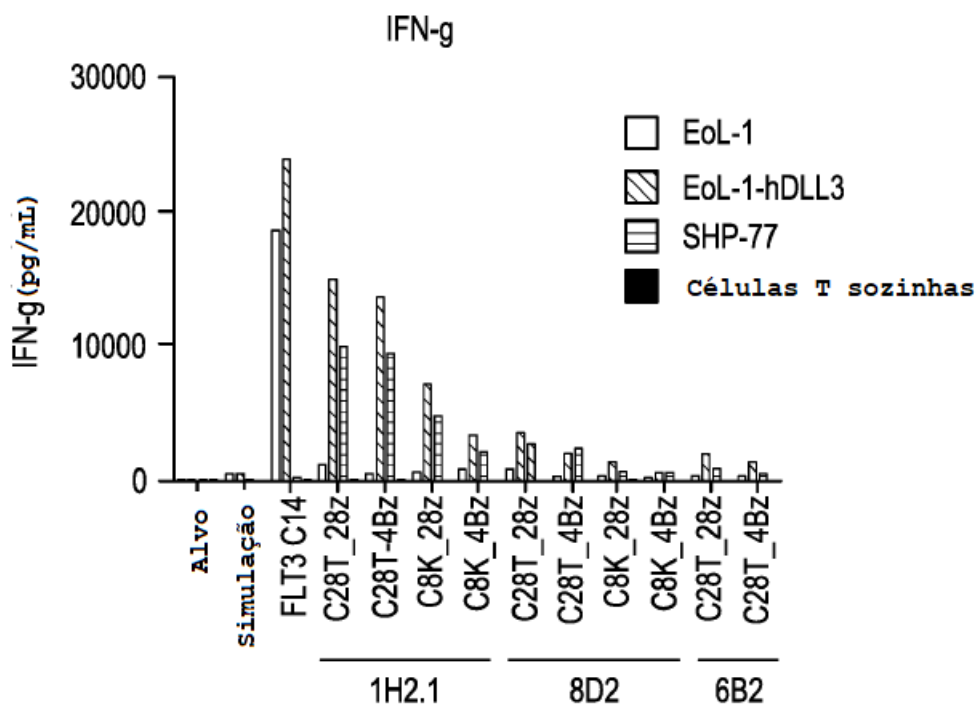


FIG. 3B

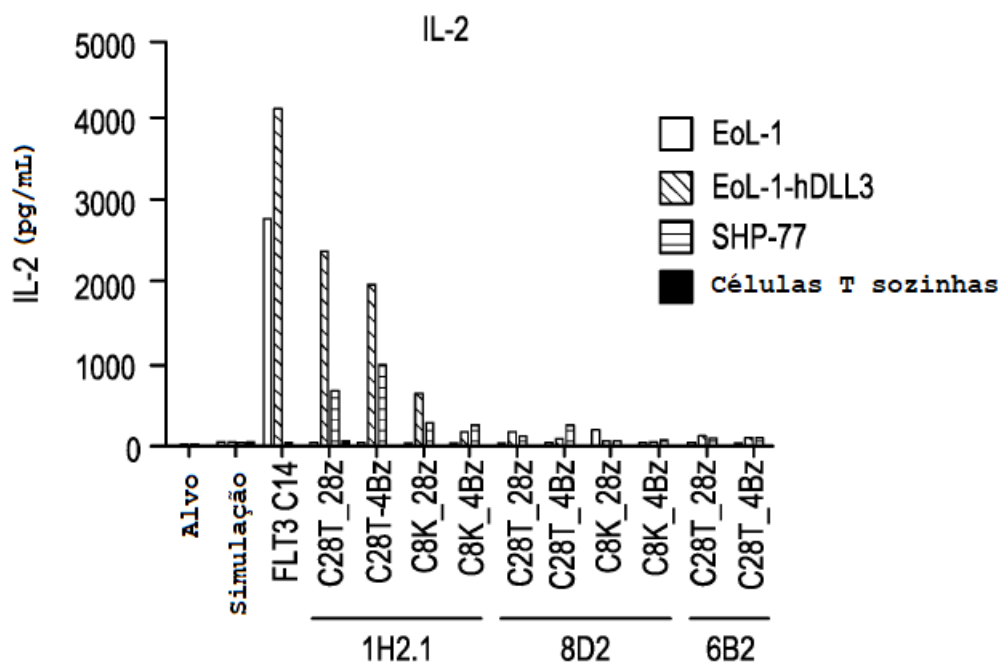
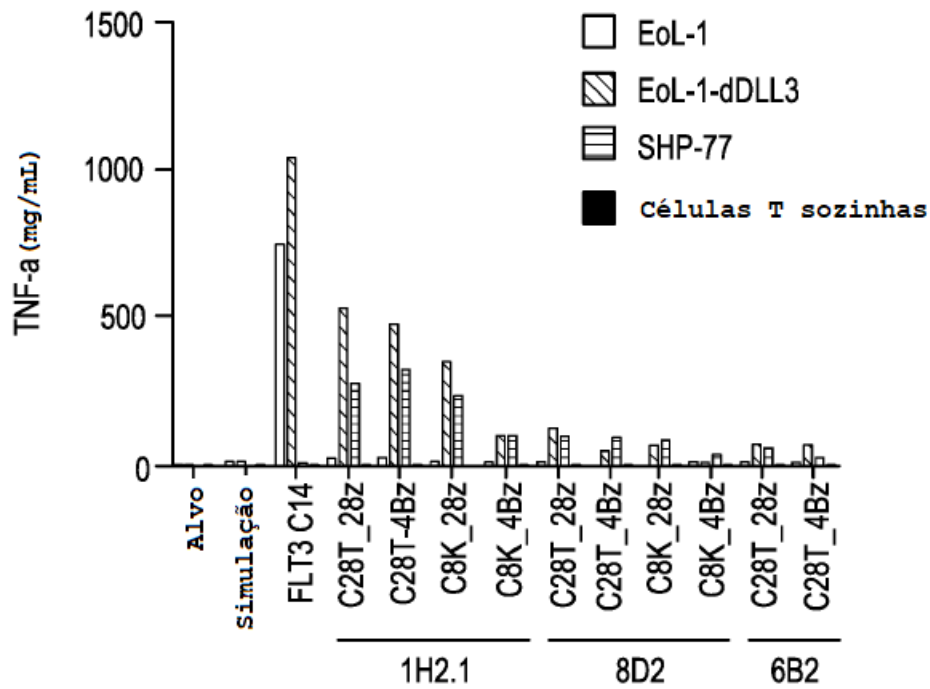
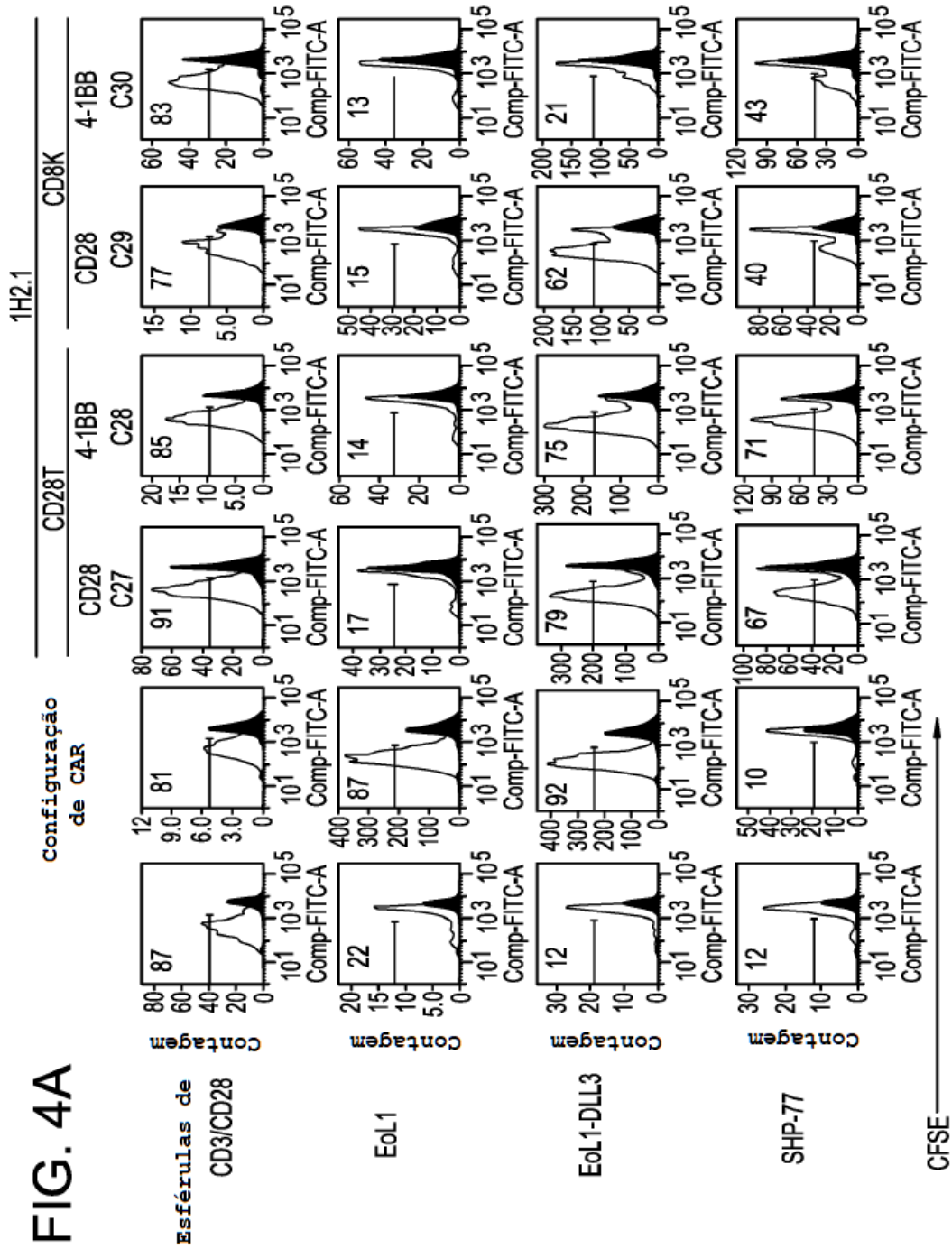


FIG. 3C



FOLHA DE SUBSTITUIÇÃO (REGRA 26)



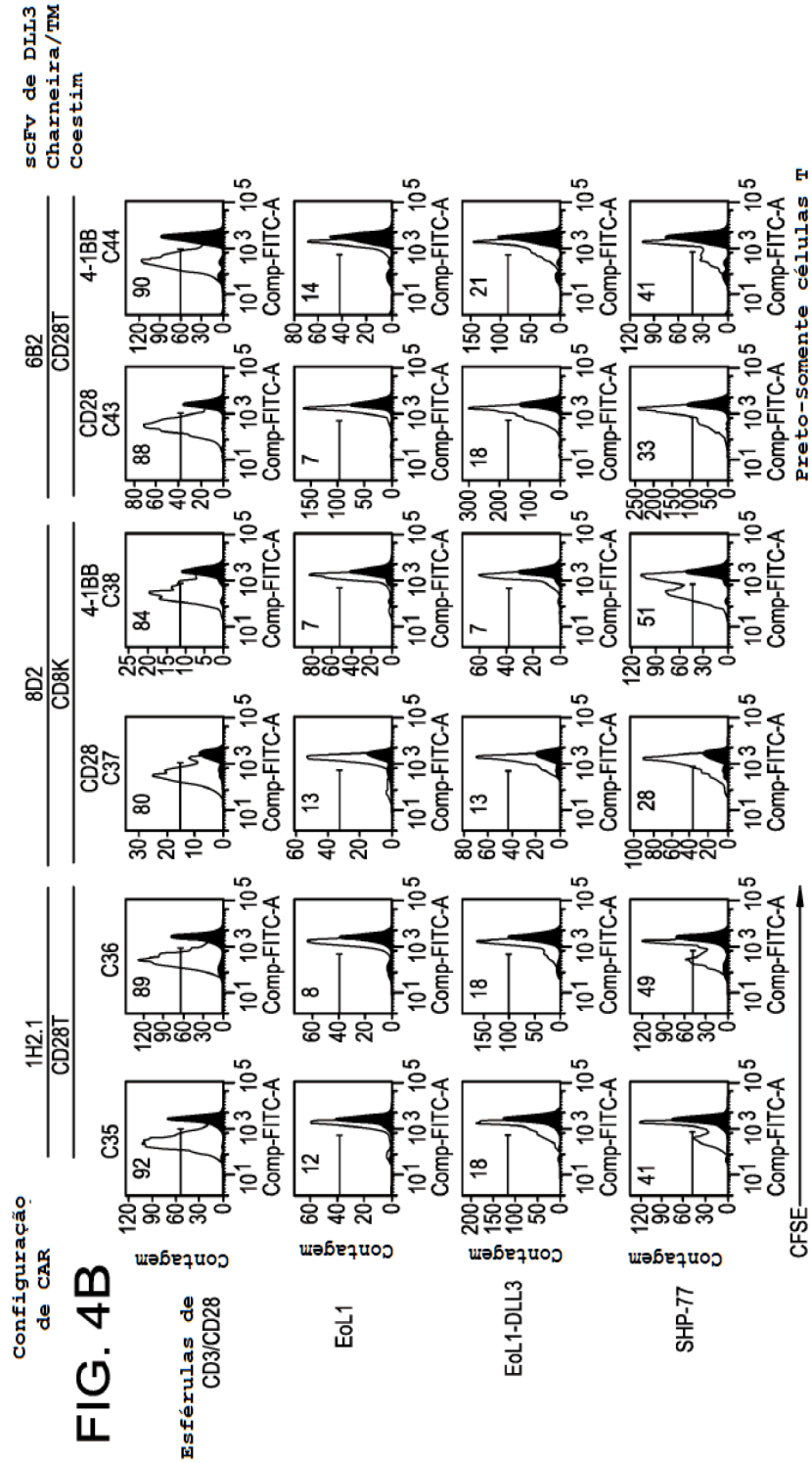


FIG. 4B

FIG. 5

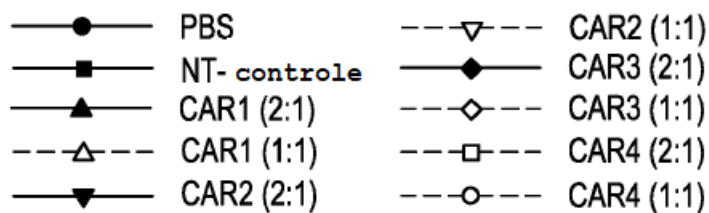
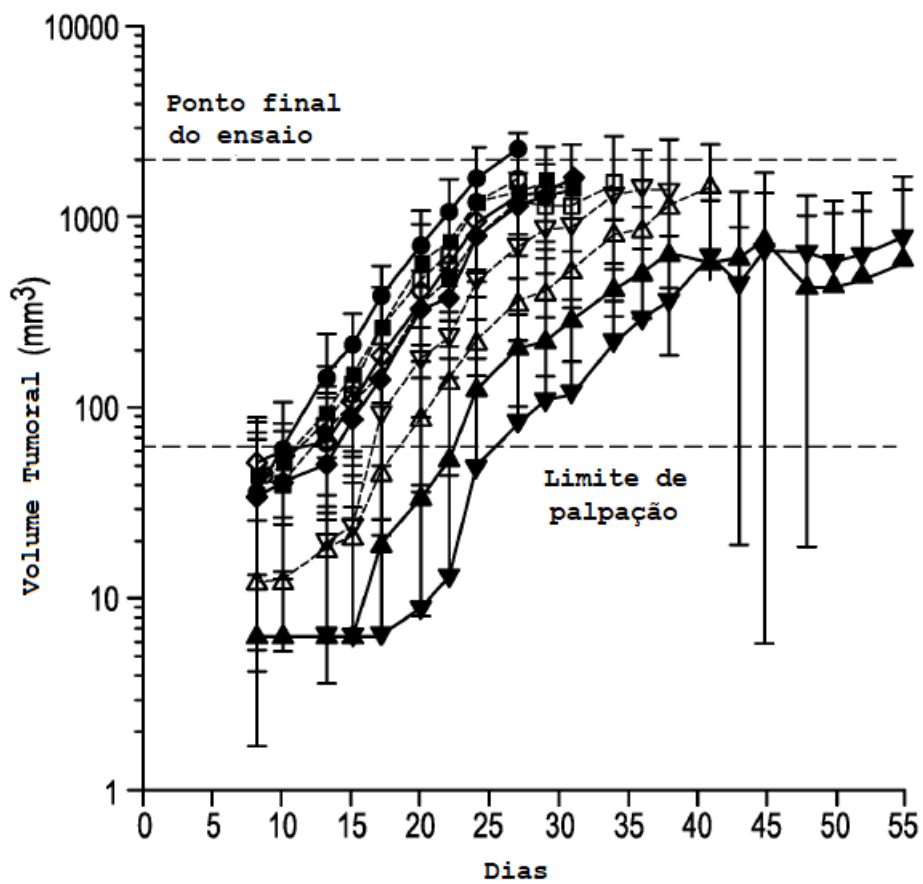


FIG. 6

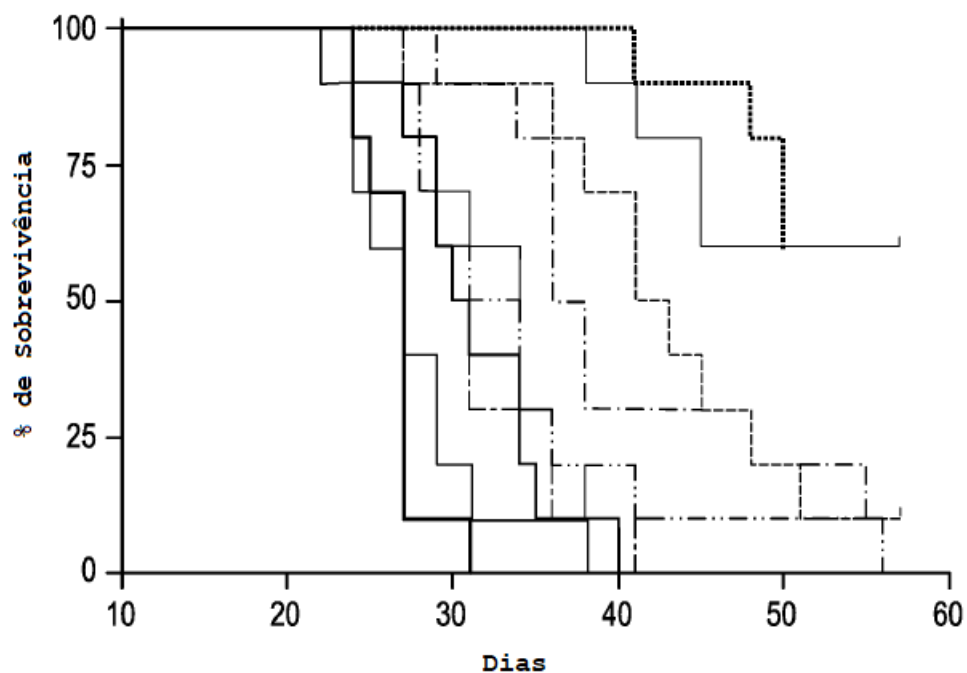
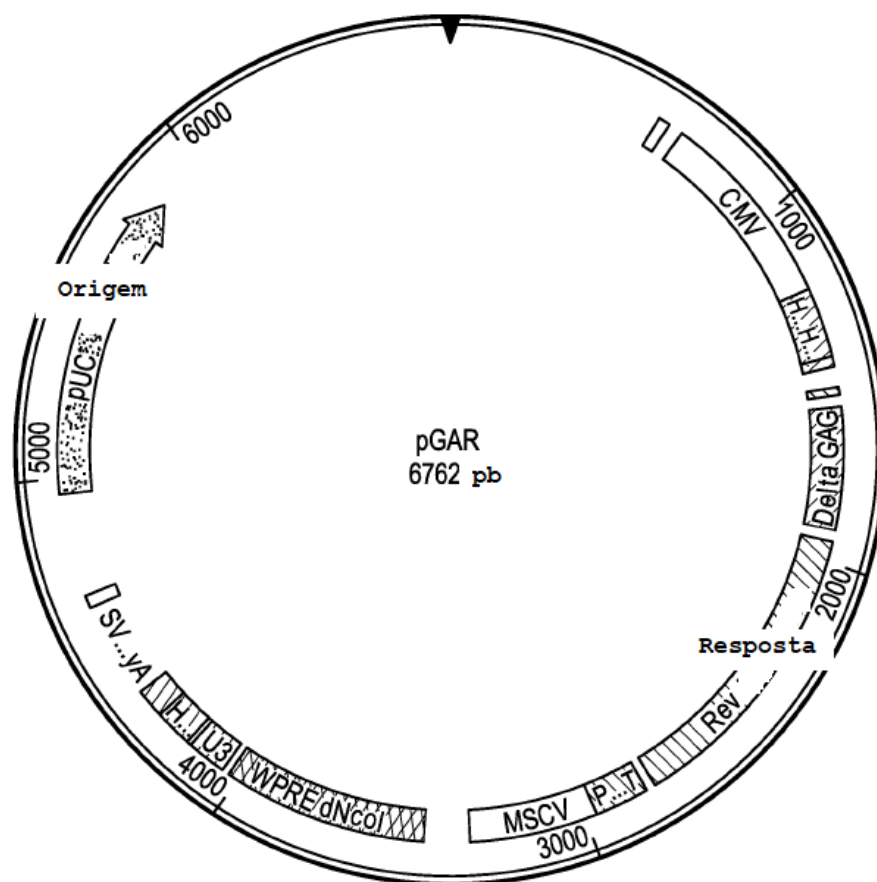


FIG. 7



RESUMO

RECEPTORES QUIMÉRICOS PARA DLL3 E MÉTODOS DE SEU USO

Moléculas de ligação ao antígeno, receptores quiméricos e células imunitárias manipuladas para DLL3 são divulgados de acordo com a invenção. A invenção se relaciona adicionalmente com vetores, composições e métodos de tratamento e/ou detecção usando as moléculas de ligação ao antígeno para DLL3 e células imunitárias manipuladas.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 202001309 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 09/10/2020
- Hora de Geração do Código: 16:39:18
- Código de Controle:
 - Campo 1: 2865A7A8DC190184
 - Campo 2: 723D074B44E07134