



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

(21) BR 112020020887-6 A2



(22) Data do Depósito: 11/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 06/04/2021

(54) Título: VETORES VIRAIS E LINHAGENS CELULARES DE EMPACOTAMENTO

(51) Int. Cl.: C12N 15/86.

(30) Prioridade Unionista: 12/04/2018 US 62/656,823.

(71) Depositante(es): UMOJA BIOPHARMA, INC.

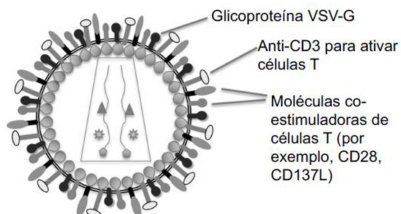
(72) Inventor(es): ANDREW SCHARENBERG; LAURIE BEITZ.

(86) Pedido PCT: PCT US2019026923 de 11/04/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/200056 de 17/10/2019

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

(57) Resumo: VETORES VIRAIS E LINHAGENS CELULARES DE EMPACOTAMENTO. A divulgação se refere, de modo geral, a vetores de ácido nucleico e linhagens celulares de empacotamento para expansão in vivo de células T. Mais particularmente, a divulgação se refere à injeção intratumoral direta de um vetor lentiviral adaptado para transdução e expansão mediada por drogas de linfócitos infiltrantes de tumor in vivo.



VETORES VIRAIS E LINHAGENS CELULARES DE EMPACOTAMENTO REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica prioridade do Pedido de Patente Provisório US nº 62/656,823, depositado em 12 de abril de 2018, cuja divulgação está incorporada neste documento por referência em sua totalidade para todos os fins.

DESCRIÇÃO DO ARQUIVO DE TEXTO ENVIADO ELETRONICAMENTE

[0002] A Listagem de Sequência associada a este pedido é fornecida em formato de texto ao invés de uma cópia em papel e está incorporada por meio do presente instrumento por referência no relatório descritivo. O nome do arquivo de texto que contém a listagem de sequências é VITI_001_01WO_SeqList_ST25.txt. O arquivo de texto tem 94 KB, foi criado em 11 de abril de 2019 e está sendo enviado eletronicamente via EFS-Web.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0003] A divulgação se refere geralmente a vetores virais, linhagens de celulares de empacotamento e métodos de uso relacionados e, em particular, para a expansão de populações de células imunes *in vivo* para o tratamento de uma condição de doença.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0004] A imunoterapia contra o câncer é uma modalidade de tratamento baseada na indução terapêutica de respostas imunes a tumores. A terapia adotiva com células T (ACT) é uma forma de imunoterapia contra o câncer. Linfócitos, particularmente linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), são isolados do corpo, cultivados *ex vivo*, expandidos e, em seguida, reinfundidos. A etapa de expansão pode incluir expansão específica do antígeno ou manipulação genética dos TILs. ACT é revisado em Rosenberg et al. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 348:62-8 (2015).

[0005] Os presentes inventores perceberam que, como alternativa ao ACT, a transdução *in vivo* de TILs, ou outras células imunes, poderia potencializar a expansão de células *in vivo* em vez de *ex vivo*. Além disso, os presentes inventores perceberam que a transdução *in vivo* de TILs, ou outras células imunes, permitiria o tratamento de câncer ou outras condições de doença

sem os procedimentos caros, demorados e arriscados exigidos pelo ACT.

[0006] Consequentemente, existe uma necessidade de meios para expandir as populações de TILs ou outras células imunes *in vivo*. Em particular, existe uma necessidade de agentes terapêuticos capazes de expandir seletivamente populações desejáveis de TILs ou outras células imunes *in vivo*. A presente divulgação fornece vetores virais, linhagens de células de empacotamento e métodos relacionados de uso para expansão de TILs ou outras células imunes *in vivo* para o tratamento de uma condição de doença.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0007] A presente divulgação é baseada, em parte, na descoberta de que vetores lentivirais e linhagens de células de empacotamento projetadas para expressar receptores de ativação de células T/células NK (bem como opcionalmente outras proteínas efetoras) são úteis para a expansão *in vivo* de células T . Vetores lentivirais e linhagens de células de empacotamento da presente divulgação podem ser adaptados para transdução e expansão mediada por drogas de linfócitos infiltrantes de tumor *in vivo*, tal como quando o vetor lentiviral é empacotado em uma partícula lentiviral usando uma linhagem de células de empacotamento e as partículas lentivirais resultantes são distribuídas no corpo de um sujeito. A injeção intratumoral de partículas lentivirais de acordo com a presente divulgação resulta na expansão *in vivo* de linfócitos infiltrantes de tumor. A expansão de linfócitos infiltrantes de tumor é controlável pelo uso de uma molécula pequena, quando o receptor de ativação de células T/células NK é capaz de ser ativado (ou inativado) por uma molécula tão pequena. Opcionalmente, a linhagem de células de empacotamento expressa uma ativação de células T ou molécula de coestimulação, facilitando a transdução de células T por partículas lentivirais derivadas da linhagem de células de empacotamento na ausência de agentes ativadores exógenos. Opcionalmente, o vetor lentiviral confere resistência a droga (s) imunossupressora (s), facilitando a expansão seletiva de células alvo.

[0008] Em um aspecto, a divulgação fornece um vetor de ácido nucleico compreendendo um promotor específico de células T e/ou células NK operacionalmente ligado a uma sequência de ácido nucleico que codifica o

receptor de ativação de células T/células NK, em que o receptor de ativação de células T/células NK é capaz de ser ativado por uma molécula pequena. Numa modalidade, o vetor ácido nucleico é um vetor lentiviral. Em uma modalidade, o vetor de ácido nucleico compreende uma sequência pelo menos parcialmente idêntica às SEQ ID NOs: 6-11 ou fragmentos deste.

[0009] Em outro aspecto, a divulgação fornece um vetor de ácido nucleico compreendendo um promotor forte operacionalmente ligado a uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor de ativação de células T/células NK, em que o receptor de ativação de células T/células NK é capaz de ser ativado por uma molécula pequena. Em uma modalidade, o promotor forte é selecionado a partir de SEQ ID NOs: 1-5.

[0010] Em outro aspecto, a divulgação fornece uma linhagem de células de empacotamento para gerar partículas lentivirais capazes de ativar e transduzir eficientemente células T, compreendendo células cultivadas capazes de empacotar um vetor de lentivírus, em que as células cultivadas são geneticamente manipuladas para expressar uma molécula de coestimulação ou de ativação de células T.

[0011] Em outro aspecto, a divulgação fornece uma partícula lentiviral compreendendo um vetor de ácido nucleico, tal como qualquer um dos vetores de ácido nucleico da presente divulgação. Em uma modalidade, a partícula lentiviral compreende uma ativação de células T ou molécula de coestimulação, por exemplo, um anticorpo anti-CD3, ligante de CD28 ou ligante de 41bb.

[0012] Em outro aspecto, a divulgação fornece uma partícula lentiviral para ativar e transduzir de forma eficiente células T, preparadas por transdução do vetor de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 19, em células geneticamente manipuladas para expressar uma ativação de células T ou molécula de co-estimulação.

[0013] Em outro aspecto, a divulgação fornece um método para o tratamento de um sujeito que sofre de câncer, compreendendo a administração de qualquer uma das partículas lentivirais da presente divulgação ao sujeito e a administração de uma molécula pequena (o receptor de ativação de células

T/células NK do partícula lentiviral sendo capaz de ser ativada pela molécula pequena) para o sujeito, em que o câncer é tratado no sujeito. Em

[0014] Em outro aspecto, a divulgação fornece um método para expandir células T capazes de reconhecer e matar células tumorais em um sujeito em necessidade deste, compreendendo a administração de qualquer uma das partículas lentivirais da presente divulgação ao sujeito e a administração de uma molécula pequena (o receptor de ativação de células T/células NK da partícula lentiviral sendo capaz de ser ativado por uma molécula pequena) para o sujeito, em que células T capazes de reconhecer e matar células tumorais no sujeito são expandidas.

[0015] Em outro aspecto, a divulgação fornece um ácido nucleico compreendendo um promotor específico para células T, células NK ou células T e células NK, em que a sequência de ácido nucleico é pelo menos 90% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1-4.

[0016] Outros aspectos e modalidades da divulgação serão evidentes a partir da descrição pormenorizada que se segue.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0017] As FIGS 1A-1B representam partículas lentivirais. FIG. 1A é um diagrama de uma modalidade da partícula lentiviral com superfície modificada, que compreende anti-CD3 expresso na superfície e moléculas co-estimuladoras de células T não presentes na partícula lentiviral representada na FIG. 1B.

[0018] FIG. 2 representa o protocolo experimental usado para gerar a linhagem celular de empacotamento HATSE-293 a partir de células HEK-293T transduzidas com um vetor lentiviral que codifica scFV anti-CD3, CD86 e CD137L. CD86⁺CD137L⁺ foram isolados por separação de células ativadas por fluorescência, expandidos e congelados para armazenamento e uso de longo prazo.

[0019] FIGS. 3A-3K representam a análise FACS de células 293 de origem e a linhagem celular de empacotamento HATSE-293 para CD46 (expressão constitutiva esperada em ambas as linhagens celulares) e expressão CD86⁺/CD137L⁺ (expressão esperada apenas na linhagem celular HATSE-293).

[0020] FIGS. 3A-3E representam a análise da linhagem celular HEK-

293 de origem para CD46 (expressão constitutiva esperada) e expressão de CD86/CD137L (nenhuma expressão esperada). Nenhuma marcação de fluorescência detectável foi observada nas amostras não coradas (simulação) (FIG. 3A). A alta expressão de CD46 foi detectada por coloração com anticorpo anti-CD46 (FIG. 3A-B; PE anti-CD46 humano) e nenhuma expressão de CD86 (FIG. 3E; anti-CD86 humano pacific blue) ou CD137L (FIG. 3D; PE anti-ligante 4-1BB humano (CD137L)) detectado por coloração específica para CD86 e CD137L, respectivamente.

[0021] FIGS. 3F-3K representam a análise da linhagem celular HATSE-293 para CD46 (expressão constitutiva esperada em ambas as linhagens celulares) e expressão de CD86/CD137L (expressão de CD86⁺/CD137L⁺ esperada). FIG. 3F e FIG. 3G não demonstra marcação de fluorescência detectável nas amostras não coradas (simulação). FIG. 3H e FIG. 3I demonstra alta expressão uniforme de CD46 detectado por coloração de anticorpo anti-CD46 (PE anti-CD46 humano). FIG. 3J e FIG. 3K demonstra que duas populações que expressam quantidades baixas e altas de CD86 ou CD137L são detectadas usando anticorpos anti-CD86 (FIG. 3J) e anti-CD137L (FIG. 3K), respectivamente.

[0022] FIG. 4 representa curvas de crescimento de células T transduzidas por partículas lentivirais de controle ou partículas lentivirais geradas a partir das linhagens de celulares HATSE descritas nas definições e exemplos que se seguem. Como um controle positivo, as células T foram transduzidas com partículas lentivirais de controle na presença de stimbeads. "Dias pós-transdução" refere-se ao número de dias decorridos após o dia em que as células foram expostas às partículas (dia 0).

[0023] FIG. 5 representa micrografias de fluorescência de células expostas a partículas de controle 293T [293T sem stim]; 293T partículas de controle e stimbeads [293T stim]; partículas HATSE separadas 1x [HATSE separadas 1x (sem stim)]; ou partículas HATSE separadas 2x [HATSE separadas 2x (sem stim)].

[0024] FIG. 6 representa um mapa de vetor para vivo-TIL 104 LNGFR (SEQ ID NO: 6).

[0025] FIG. 7 representa um mapa de vetor para vivo-TIL 105 TCP1

(SEQ ID NO: 7).

[0026] FIG. 8 representa um mapa de vetor para vivo-TIL 106 TCP2

(SEQ ID NO: 8).

[0027] FIG. 9 representa um mapa de vetor para vivo-TIL 107 TCP3

(SEQ ID NO: 9).

[0028] FIG. 10 representa um mapa de vetor para vivo-TIL 108 TCP4 (SEQ ID NO: 10).

[0029] FIG. 11 representa um mapa de vetor para vivo-TIL 109 hPerfP (SEQ ID NO: 11).

[0030] FIGS. 12A-12F mostram resultados para um receptor de ativação de células T/NK controláveis por molécula pequena exemplificativa, denominada RACCR. FIG. 12A ilustra o projeto da molécula RACCR exemplificada. FIG. 12A mostra células transduzidas com uma partícula lentiviral de controle expressando GFP. FIG. 12B mostra células transduzidas com uma partícula com superfície modificada expressando mCherry. FIG. 12C mostra células transduzidas com uma partícula com superfície modificada que expressa RACCR.

[0031] FIG. 12E mostra um gráfico da expansão de células T de células T transduzidas com várias partículas lentivirais com superfície modificada (SE-LVP), incluindo SE-LVPs que expressam RACCR, na presença de IL-2 ou rapamicina. FIG. 12F mostra dados que confirmam a expansão de células T conduzida por RACCR é controlável com rapamicina.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0032] Os presentes inventores perceberam que, como alternativa ao ACT, a transdução *in vivo* de TILs, ou outras células imunes, poderia potencializar a expansão de células *in vivo* em vez de *ex vivo*. Além disso, os presentes inventores realizaram a transdução *in vivo* de TILs, ou outras células imunes, permite o tratamento de câncer ou outras condições de doença sem as desvantagens da expansão *ex vivo* de células imunes.

[0033] Assim, a presente divulgação fornece meios de expandir populações de TILs ou outras células imunes *in vivo*. Em particular, a presente divulgação fornece agentes terapêuticos capazes de expandir seletivamente

populações desejáveis de TILs ou outras células imunes *in vivo*. A presente divulgação fornece vetores virais, linhagens celulares de empacotamento e métodos relacionados de uso para expansão de TILs ou outras células imunes *in vivo* para o tratamento de uma condição de doença.

[0034] A presente divulgação é baseada, em parte, na descoberta de que vetores lentivirais e linhagens celulares de empacotamento projetadas para expressar receptores de ativação de células T/células NK (bem como opcionalmente outras proteínas efetoras) são úteis para a expansão *in vivo* de células T. Vetores lentivirais e linhagens celulares de empacotamento da presente divulgação podem ser adaptados para transdução e expansão mediada por drogas de linfócitos infiltrantes de tumor *in vivo*, tal como quando o vetor lentiviral é empacotado em uma partícula lentiviral usando uma linhagem celular de empacotamento e as partículas lentivirais resultantes são distribuídas no corpo de um sujeito, tal como a um paciente que sofre de um tumor sólido. Os vetores e partículas lentivirais divulgados podem ser usados para ACT por transdução *in vitro* de células T autólogas ou alogênicas ou outras células imunes. Em alguns casos, os vetores lentivirais e divulgação de partículas são configurados para uso *in vivo*. A injeção intratumoral de partículas lentivirais resulta na expansão *in vivo* de linfócitos infiltrantes de tumor porque os vetores lentivirais são configurados para fornecer a expressão de receptores de ativação de células T/células NK capazes de fornecer sinais mitogênicos para células alvo transduzidas *in vitro* ou *in vivo*.

1.1 Vetores de Ácido Nucleico

[0035] Conforme usado neste documento, o termo "vetor de ácido nucleico" se destina a significar qualquer ácido nucleico que funciona para carrear, abrigar ou expressar um ácido nucleico de interesse. Os vetores de ácido nucleico podem ter funções especializadas, como expressão, empacotamento, pseudotipagem ou transdução. Os vetores de ácido nucleico também podem ter funções manipuladoras se adaptados para uso como um vetor de clonagem ou transporte. A estrutura do vetor pode incluir qualquer forma desejada que seja viável de fazer e desejável para um uso particular. Tais formas incluem, por exemplo, formas circulares, tais como plasmídeos e fagomídeos, bem como

formas lineares ou ramificadas. Um vetor de ácido nucleico pode ser composto de, por exemplo, DNA ou RNA, bem como conter parcial ou totalmente, derivados, análogos e miméticos de nucleotídeos. Esses vetores de ácido nucleico podem ser obtidos de fontes naturais, produzidos de forma recombinante ou sintetizados quimicamente.

[0036] Exemplos não limitativos de sistemas de vetores da presente divulgação incluem um retrovírus, um lentivírus, um vírus espumoso e um transposon da Bela Adormecida.

1.1.1 Vetores lentivirais

[0037] Lentivírus são retrovírus complexos que, além dos genes retrovirais comuns gag, pol e env, contêm outros genes com função regulatória ou estrutural. A maior complexidade permite que o vírus module seu ciclo de vida, como no curso de uma infecção latente. Alguns exemplos de lentivírus incluem os vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2) e o vírus da imunodeficiência símia (SIV). Os vetores lentivirais foram gerados pela atenuação múltipla dos genes de virulência do HIV, por exemplo, os genes env, vif, vpr, vpu e nef são deletados, tornando o vetor biologicamente seguro.

[0038] Os vetores lentivirais oferecem grandes vantagens para a terapia gênica. A menos que sejam manipulados para serem não integrantes, os vetores lentivirais se integram de forma estável nos cromossomos das células alvo, permitindo a expressão de longo prazo dos transgenes distribuídos. Além disso, eles não transferem genes virais, evitando, portanto, o problema de geração de células transduzidas que podem ser destruídas por células T citotóxicas. Além disso, eles têm uma capacidade de clonagem relativamente grande, suficiente para a maioria das aplicações clínicas previstas. Além disso, os lentivírus, em contraste com outros retrovírus, são capazes de transduzir células que não se dividem. Isso é muito importante no contexto da terapia gênica para tecidos como o sistema hematopoiético, o cérebro, o fígado, os pulmões e os músculos. Por exemplo, os vetores derivados de HIV-1 permitem a distribuição eficiente in vivo e ex vivo, integração e expressão estável de transgenes em células, tais como neurônios, hepatócitos e miócitos (Blomer et al., 1997; Kafri et al., 1997; Naldini et al., 1996; Naldini et al., 1998).

[0039] Os vetores lentivirais são conhecidos na técnica, *ver* Naldini et al. (1996) *Science* 272: 263-7; Zufferey et al. (1998) *J. Virol.* 72: 9873-9880; Dull et al. (1998) *J. Virol.* 72: 8463-8471; Patente US Nº 6,013,516; e US Pat. Nº 5,994,136, que são incorporados neste documento por referência em sua totalidade. Em geral, esses vetores são configurados para carrear as sequências essenciais para a seleção de células contendo o vetor, para a incorporação de ácido nucleico estranho em uma partícula lentiviral e para a transferência do ácido nucleico para uma célula alvo.

[0040] Um sistema de vetor lentiviral comumente usado é o chamado sistema de terceira geração. Os sistemas de vetores lentivirais de terceira geração incluem quatro plasmídeos. O "plasmídeo de transferência" codifica a sequência polinucleotídica que é distribuída pelo sistema de vetor lentiviral à célula alvo. O plasmídeo de transferência geralmente tem uma ou mais sequências de transgene de interesse flanqueadas por sequências de repetição terminal longa (LTR), que facilitam a integração das sequências de plasmídeo de transferência no genoma do hospedeiro. Por razões de segurança, os plasmídeos de transferência são geralmente concebidos para tornar a replicação do vetor resultante incompetente. Por exemplo, o plasmídeo de transferência carece de elementos genéticos necessários para a geração de partículas infecciosas na célula hospedeira. Além disso, o plasmídeo de transferência pode ser projetado com uma deleção da LTR 3', tornando o vírus "autoinativado" (SIN). *Ver* Dull et al. (1998) *J. Virol.* 72: 8463-71; Miyoshi et al. (1998) *J. Virol.* 72: 8150-57.

[0041] Os sistemas de terceira geração também geralmente incluem dois "plasmídeos de empacotamento" e um "plasmídeo de envelope". O "plasmídeo de envelope" geralmente codifica um gene Env operativamente ligado a um promotor. Em um sistema exemplificativo de terceira geração, o gene Env é VSV-G e o promotor é o promotor CMV. O sistema de terceira geração usa dois plasmídeos de empacotamento, um codificando gag e pol e outro codificando rev como um recurso de segurança adicional - uma melhoria em relação ao plasmídeo de empacotamento único dos chamados sistemas de segunda geração. Embora mais seguro, o sistema de terceira geração pode ser mais complicado de usar e resultar em títulos virais mais baixos devido à adição de um

plasmídeo adicional. Plasmídeos de empacotamento exemplificativos incluem, sem limitação, pMD2.G, pRSV-rev, pMDLG-pRRE e pRRL-GOI.

[0042] Os sistemas de vetores lentivirais dependem do uso de uma "linhagem celular de empacotamento". Em geral, a linhagem celular de empacotamento é uma linhagem celular cujas células são capazes de produzir partículas lentivirais infecciosas quando o plasmídeo de transferência, o (s) plasmídeo (s) de empacotamento e o plasmídeo de envelope são introduzidos nas células. Vários métodos de introdução de plasmídeos nas células podem ser usados, incluindo transfecção ou eletroporação. Em alguns casos, uma linhagem celular de empacotamento é adaptada para empacotamento de alta eficiência de um sistema de vetor lentiviral em partículas lentivirais.

[0043] Conforme usado neste documento, o termo "vetor lentiviral" se destina a significar um ácido nucleico que codifica uma sequência de ácido nucleico cis lentiviral necessária para o empacotamento do genoma. Um vetor lentiviral também pode codificar outras sequências de ácido nucleico cis benéficas para a distribuição de genes, incluindo, por exemplo, sequências cis necessárias para a transcrição reversa, integração proviral ou transcrição do genoma. Um vetor lentiviral realiza funções de transdução de um vetor lentiviral. Como tal, a composição exata de um genoma de vetor dependerá do material genético desejado a ser introduzido em uma célula-alvo. Portanto, um genoma de vetor pode codificar, por exemplo, polipeptídeos ou funções adicionais além das necessárias para empacotamento, transcrição reversa, integração ou transcrição. Essas funções geralmente incluem a codificação de elementos cis necessários para a expressão de um ácido nucleico de interesse. As sequências ou elementos cis lentivirais podem ser derivados de um genoma de lentivírus ou outro genoma de vírus ou vetor, desde que o genoma do vetor lentiviral possa ser empacotado por uma linhagem celular de empacotamento em uma partícula lentiviral e introduzido em uma célula alvo.

[0044] Exemplos não limitativos de vetores lentivirais incluem SEQ ID NOs: 6-11, que são ilustrados nas FIGS. 6-11.

[0045] As partículas lentivirais produzidas geralmente incluem um genoma de RNA (derivado do plasmídeo de transferência), um envelope de

bicamada lipídica no qual a proteína Env está embutida e outras proteínas acessórias, incluindo integrase, protease e proteína matriz (ver FIG. 1B). Conforme usado neste documento, o termo "partícula lentiviral" se destina a significar uma partícula viral que inclui um envelope, tem uma ou mais características de um lentivírus e é capaz de invadir uma célula hospedeira alvo. Tais características incluem, por exemplo, infectar células hospedeiras sem divisão, transduzir células hospedeiras sem divisão, infectar ou transduzir células imunes do hospedeiro, contendo um vírion lentiviral incluindo um ou mais dos polipeptídeos estruturais gag p7, p24 e p17, contendo um envelope lentiviral incluindo uma ou mais das glicoproteínas codificadas de env p41, p120 e p160, contendo um genoma incluindo uma ou mais sequências de ação cis de lentivírus funcionando em replicação, integração proviral ou transcrição, contendo um genoma que codifica uma protease lentiviral, transcriptase reversa ou integrase, ou contendo um genoma que codifica atividades regulatórias, tais como Tat ou Rev. Os plasmídeos de transferência podem compreender uma sequência cPPT, conforme descrito na Patente US Nº 8,093,042.

[0046] A eficiência do sistema é uma preocupação importante na manipulação vetorial. A eficiência de um sistema de vetor lentiviral pode ser avaliada de várias maneiras conhecidas na técnica, incluindo medição do número de cópias do vetor (VCN) ou genomas do vetor (vg), tal como por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), ou título do vírus em unidades infecciosas por mililitro (UI/mL). Por exemplo, o título pode ser avaliado usando um ensaio funcional realizado na linhagem de células tumorais cultivadas HT1080 como descrito em Humbert et al. Development of Third-generation Cocal Envelope Producer Cell Lines for Robust Lentiviral Gene Transfer into Hematopoietic Stem Cells and T-cells. *Molecular Therapy* 24:1237–1246 (2016). Quando o título é avaliado em uma linhagem celular em cultura que está se dividindo continuamente, nenhuma estimulação é necessária e, portanto, o título medido não é influenciado pela manipulação na superfície da partícula lentiviral. Outros métodos para avaliar a eficiência dos sistemas de vetores lentivirais são fornecidos em Gaererts et al. Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnol.* 6:34 (2006).

[0047] É amplamente conhecido que os sistemas de vetores lentivirais têm eficiência limitada e que as tentativas de alterar o sistema de vetores lentivirais frequentemente resultam em eficiência diminuída. Os presentes inventores descobriram surpreendentemente que o plasmídeo de envelope de sistemas de vetores lentivirais (*por exemplo*, um sistema de terceira geração) pode ser modificado para codificar uma pluralidade de polipeptídeos além da glicoproteína de fusão ou variante funcional desta.

[0048] Em alguns casos, os vetores e linhagens celulares de empacotamento da divulgação são capazes de gerar partículas lentivirais de manipulação na superfície com títulos de pelo menos cerca de 1×10^6 IU/mL, pelo menos cerca de 2×10^6 IU/mL, pelo menos cerca de 3×10^6 IU/mL, pelo menos cerca de 4×10^6 IU/mL, pelo menos cerca de 5×10^6 IU/mL, pelo menos cerca de 6×10^6 IU/mL, pelo menos cerca de 7×10^6 IU/mL, pelo menos cerca de 8×10^6 IU/mL, pelo menos cerca de 9×10^6 IU/mL, ou pelo menos cerca de 1×10^7 IU/mL. Em alguns casos, os vetores multicistrônicos da divulgação são capazes de gerar partículas lentivirais com superfície modificada com títulos de pelo menos cerca de 1×10^7 IU/mL, pelo menos cerca de 2×10^7 IU/mL, pelo menos cerca de 3×10^7 IU/mL, pelo menos cerca de 4×10^7 IU/mL, pelo menos cerca de 5×10^7 IU/mL, pelo menos cerca de 6×10^7 IU/mL, pelo menos cerca de 7×10^7 IU/mL, pelo menos cerca de 8×10^7 IU/mL, pelo menos cerca de 9×10^7 IU/mL, ou pelo menos cerca de 1×10^8 IU/mL.

1.2 Receptores de ativação de células T/células NK

[0049] A divulgação contempla vetores de ácido nucleico, vetores lentivirais e vetores AAV que codificam receptores de ativação de células T/células NK. Tal conforme usado neste documento, o termo "receptores de ativação de células T/células NK" refere-se a uma ou mais proteínas transmembrana que são configuradas para serem expressas na superfície celular de células transduzidas de modo que o receptor de ativação de células T/células NK forneça um sinal mitogênico para a célula transduzida. Um receptor de ativação de células T/células NK é usado porque as células-alvo são, na maioria dos casos, células T ou células NK. Os presentes métodos podem ser adaptados para uso com outros tipos de células pelo uso de um receptor de ativação que

retêm a atividade em outro tipo de célula. Receptores de ativação de células T/células NK úteis aqui podem incluir um domínio de sinalização que é um domínio de sinalização de receptor de citocina, um domínio de sinalização de receptor coestimulador, um domínio de sinalização de subunidade de receptor de célula T, um domínio de sinalização de subunidade de receptor de célula NK, um domínio de sinalização de receptor de fator de crescimento ou semelhante.

1.2.1 Exemplos não limitantes de receptores de ativação de células T/células NK

[0050] O domínio de sinalização usado pode ser aquele de uma cadeia gama de receptor de citocina comum ou de uma cadeia beta de receptor de citocina comum. O domínio de sinalização pode incluir um ITAM ou uma tirosina capaz de se ligar a um domínio SH2 quando a tirosina for fosforilada. Em alguns casos, a sinalização pode ser desencadeada por homo- ou heterodimerização do receptor de ativação. A fosforilação de um ou mais resíduos de tirosina em um domínio intracelular de um receptor de ativação pode, em alguns casos, levar à dimerização com um domínio SH2 e, assim, iniciar uma cascata de sinalização mitogênica. Em alguns casos, um domínio de sinalização da presente divulgação pode ser capaz de ser fosforilado em um resíduo de tirosina e, posteriormente, se ligar a um domínio SH2 em outra molécula.

[0051] Em alguns casos, o receptor de ativação de células T/células NK é um receptor de ativação de ocorrência natural. Alternativamente, um composto de um ou mais elementos genéticos retirados de diferentes receptores de ativação conhecidos na técnica. Exemplos de receptores de ativação de células T/células NK manipulados, úteis na presente invenção, incluem, sem limitação, receptores de IL2 ou receptores de IL7 constitutivamente ativos, conforme descrito em Hunter et al. Chimeric γ c cytokine receptors confer cytokine independent engraftment of human T lymphocytes. *Mol Immunol.* 2013 Nov;56(1-2):1-11.; Shum et al. Constitutive Signaling from an Engineered IL7 Receptor Promotes Durable Tumor Elimination by Tumor-Redirected T Cells. *Cancer Discov.* 2017 Nov;7(11):1238-1247.

1.2.2 Receptores de ativação de células T/NK controláveis por moléculas pequenas

[0052] Pode, em alguns casos, ser vantajoso fornecer um meio para controlar a expansão das células transduzidas no corpo. Em alguns casos, isso pode servir como um sistema de segurança para proteger novamente a expansão excessiva das células. Em outros casos, pode-se controlar a expansão de células transduzidas para fins terapêuticos. Assim, a presente divulgação fornece receptores de ativação de células T/células NK que são controláveis pelo uso de uma molécula pequena. Quando o vetor lentiviral codifica tal receptor de ativação de célula T/célula NK controlável, a administração da molécula pequena permite a ativação do receptor de ativação para fornecer um sinal mitogênico às células transduzidas, enquanto a cessação da administração da molécula pequena impede que o receptor de ativação forneça um sinal mitogênico para células transduzidas. Desta forma, os TILs *in vivo* gerados pela administração de partículas lentivirais a um sujeito se expandirão apenas enquanto a molécula pequena estiver presente no sujeito. A molécula pequena pode ser fornecida sistemicamente ou localmente e simultaneamente com ou durante o período após a administração da partícula lentiviral. A expansão dos TILs pode ser monitorada por meio de amostras de sangue, biópsia ou imagens médicas, e a molécula pequena pode ser retirada se uma expansão excessiva for observada. Em alguns casos, a administração pulsada ou intermitente da molécula pequena pode ser usada para otimizar o protocolo de tratamento. Em alguns casos, a molécula pequena será titulada para ajustar a expansão do TIL. Em alguns casos, a molécula pequena pode ser retirada ou administrada em resposta à remissão ou recidiva do tumor ou por outras razões terapêuticas.

[0053] Em alguns casos, os receptores de ativação de células T/células NK podem ser configurados para serem controlados por uma molécula pequena por substituição dos domínios extracelulares de um receptor de ativação de células T/células NK diméricas por subunidades de proteína que dimerizam, de modo induzível, na presença de uma molécula pequena, ou que dimerizam, de modo induzível, na ausência de uma molécula pequena e retornam ao estado monomérico após a remoção, degradação ou diluição da molécula pequena. É contemplado que, no caso de um receptor de ativação de células T/células NK heterodimérico, o receptor de ativação de células T/células NK pode ser

modificado de modo que o domínio extracelular de uma unidade do receptor de ativação de células T/células NK compreende um monômero das subunidades de proteína que dimerizam, de modo induzível, e o domínio extracelular da outra unidade do receptor de ativação de células T/células NK compreende o outro monômero das subunidades de proteína que dimerizam de modo induzível. Um receptor de ativação de células T/células NK heterodimérico pode ser modificado desta maneira usando subunidades de proteína homodiméricas que dimerizam, de modo induzível, ou subunidades de proteínas heterodiméricas que dimerizam de modo induzível. Em outros casos, um receptor de ativação de células T/células NK homodimérico pode ser modificado desta maneira usando subunidades de proteínas homodiméricas que dimerizam de modo induzível ou subunidades de proteínas heterodiméricas que dimerizam de modo induzível. O receptor de ativação de células T/células NK controláveis por moléculas pequenas pode ser codificado por um único transgene se for homodimérico ou por dois transgenes quando for heterodimérico.

[0054] Exemplos de subunidades de proteína que dimerizam de modo induzível incluem, sem limitação, a proteína de ligação a FK506 (FKBP) e o domínio de ligação a rapamicina FKBP12 (FRB). A proteína de ligação a FK506 se dimeriza na presença de tacrolimo (FK506). O domínio de ligação FKBP12-rapamicina (FRB) se dimeriza na presença de rapamicina. Assim, a molécula pequena de acordo com a presente divulgação pode ser tacrolimo, rapamicina ou um rapalog (um análogo da rapamicina). Outros exemplos de moléculas pequenas pelas quais os receptores controláveis por moléculas pequenas podem ser controlados incluem, sem limitação, rapamicina, um rapalog, cumermicina, giberelina, ácido abscísico (ABA), metotrexato, ciclosporina A, FKCsA, trimetoprima (Tmp) - ligante sintético para FKBP (SLF), ou quaisquer derivados destes. Pares exemplificativos de domínios adequados como proteínas de fusão nos receptores da presente divulgação incluem, sem limitação, um par selecionado de FKBP e FRB, FKBP e calcineurina, FKBP e ciclofilina, FKBP e DHFR bacteriano, calcineurina e ciclofilina, PYL1 e ABI1, ou GIB1 e GAI, ou variantes destes.

[0055] Em alguns casos, o receptor controlável por molécula

pequena compreende um domínio extracelular que compreende um ou mais domínios de ligação de molécula pequena. A ligação da molécula pequena ao (s) domínio (s) extracelular (es) causa interação intramolecular de moléculas receptoras (*por exemplo*, homodimerização ou heterodimerização), ativando assim um sinal a jusante do (s) domínio (s) intracelular (es). O (s) domínio (s) intracelular (es) do receptor controlável por molécula pequena podem compreender um ou mais domínios selecionados a partir de domínios ou fragmentos de CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, Morte Programada-1 (PD-1), co-estimulador de células T induzíveis (ICOS), antígeno-1 associado à função linfocitária (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 gama, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gama, molécula MHC classe 1, proteínas receptoras de TNF, uma proteína de imunoglobulina, receptor de citocina, integrinas, moléculas de ativação linfocítica de sinalização (Proteínas SLAM), ativando receptores de células NK, BTLA, um receptor de ligante 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, IL-21R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA -6, CD49f, ITGAD, CD11d, 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, um ligante que se liga especificamente a CD83, CD27, CD28, ICOS, 4-1BB, CD40, RANK/TRANCE-R, OX40, TGFbR1, TGFbRII, myd88, CD40 e quaisquer outros membros da superfamília de receptores de TNF e combinações destes.

[0056] Um "homólogo" de uma proteína de interesse, como FKBP ou FRB, inclui proteínas que compreendem ou consistem em uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos cerca de 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% de identidade com a sequência de aminoácidos da proteína. Um homólogo

também pode ser uma proteína que é codificada por um ácido nucleico que tem pelo menos cerca de 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% de identidade com uma sequência de nucleotídeos.

[0057] Um "homólogo funcional" de uma proteína de interesse refere-se a um homólogo da proteína com pelo menos uma atividade biológica da proteína. Por exemplo, um homólogo funcional de FKPB refere-se a um homólogo de FKBP que heterodimeriza com FRB na presença de rapamicina (ou rapalogs relacionados) ou homodimeriza na presença de moléculas como AP1903; um homólogo funcional de FRB refere-se a um homólogo de FRB que se heterodimeriza com FKBP na presença de rapamicina (ou rapalogs relacionados).

[0058] Em algumas modalidades, o receptor de ativação de células T/células NK compreende (a) uma primeira cadeia compreendendo um ou ambos: (i) um domínio FKPB funcional que compartilha pelo menos 95%, 99% ou 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 13, e (ii) um domínio IL2Rb funcional que compartilha pelo menos 95%, 99% ou 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 14; e/ou (b) uma segunda cadeia compreendendo um ou ambos: (i) um domínio FRB funcional que compartilha pelo menos 95%, 99% ou 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 16, e (ii) um domínio funcional IL2Rg que compartilha pelo menos 95%, 99% ou 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 17.

[0059] Em algumas modalidades, o receptor de ativação de células T/células NK compreende (a) uma primeira cadeia compreendendo um domínio FKPB funcional e um domínio IL2Rb funcional, em que a primeira cadeia compartilha pelo menos 95%, 99% ou 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 12; e/ou (b) uma segunda cadeia compreendendo um domínio FRB funcional e um domínio IL2Rg funcional, em que a segunda cadeia compartilha pelo menos 95%, 99% ou 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 15.

1.2.3 Receptores de Antígeno Quimérico

[0060] Pode, em alguns casos, ser vantajoso fornecer um meio para direcionar células transduzidas para células ou tecidos específicos. Em alguns casos, o vetor lentiviral compreende (em vez de ou em adição a outros genes) um polinucleotídeo que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR). Vários

CARs conhecidos na técnica podem ser empregados. Alternativamente, podem ser utilizadas fusões de receptor de célula T (TCR). Quando o vetor codifica um CAR, o CAR pode compreender um ou mais domínios selecionados a partir de domínios ou fragmentos de CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, Morte Programada-1 (PD-1), co-estimulador de células T induzíveis (ICOS), antígeno-1 associado à função linfocitária (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 gama, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gama, molécula MHC classe 1, proteínas receptoras de TNF, uma proteína de imunoglobulina, receptor de citocina, integrinas, moléculas de ativação linfocítica de sinalização (Proteínas SLAM), ativando receptores de células NK, BTLA, um receptor de ligante 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, IL-21R 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, um ligante que se liga especificamente a CD83, CD27, CD28, ICOS, 4-1BB, CD40, RANK/TRANCE-R, OX40, TGFbR1, TGFbRII, myd88, e quaisquer outros membros da superfamília de receptores de TNF e combinações destes.

1.2.4 Receptores de Antígenos Quiméricos Controláveis por Moléculas Pequenas

[0061] Pode, em alguns casos, ser vantajoso fornecer um meio para controlar o direcionamento das células transduzidas. Em alguns casos, isso pode servir como um sistema de segurança para proteger novamente a atividade excessiva das células. Em outros casos, pode-se controlar a atividade de células transduzidas para fins terapêuticos. Assim, a presente divulgação fornece CARs ou receptores de direcionamento semelhantes, *por exemplo* Fusões de TCR, que

são controláveis pelo uso de uma molécula pequena. Quando o vetor lentiviral codifica esse receptor de direcionamento controlável, a administração da molécula pequena permite a ativação do receptor de direcionamento para direcionar as células transduzidas às células-alvo, enquanto a cessação da administração da molécula pequena impede o receptor de direcionar as células transduzidas às células-alvo. Desta forma, os TILs *in vivo* gerados pela administração de partículas lentivirais a um sujeito se ativarão apenas enquanto a molécula pequena estiver presente no sujeito. A molécula pequena pode ser fornecida sistemicamente ou localmente e simultaneamente com ou durante o período após a administração da partícula lentiviral. A atividade dos TILs pode ser monitorada por meio de amostras de sangue, biópsia ou imagens médicas, e a molécula pequena pode ser retirada se uma atividade excessiva for observada. Em alguns casos, a administração pulsada ou intermitente da molécula pequena pode ser usada para otimizar o protocolo de tratamento. Em alguns casos, a molécula pequena será titulada para ajustar a atividade do TIL. Em alguns casos, a molécula pequena pode ser retirada ou administrada em resposta à remissão ou recidiva do tumor ou por outras razões terapêuticas.

[0062] Em alguns casos, receptores de direcionamento (*por exemplo* CARs) podem ser configurados para serem controlados por uma molécula pequena por fusão a subunidades de proteínas que dimerizam de modo induzível na presença de uma molécula pequena ou que dimerizam de modo induzível na ausência de uma molécula pequena e retornam ao estado monomérico após remoção, degradação ou diluição da molécula pequena. É contemplado que, no caso de um receptor de direcionamento heterodimérico, o receptor de ativação de células T/células NK pode ser modificado de modo que o domínio extracelular de uma unidade do receptor de direcionamento compreende um monômero das subunidades de proteína que dimerizam de modo induzível, e o domínio extracelular da outra unidade do receptor de direcionamento compreende o outro monômero das subunidades de proteína que dimerizam de modo induzível. Um receptor de direcionamento heterodimérico pode ser modificado desta maneira usando subunidades de proteína homodiméricas que dimerizam de modo induzível ou subunidades de proteínas heterodiméricas que dimerizam de modo

induzível. Em outros casos, um receptor de direcionamento homodimérico pode ser modificado desta maneira usando subunidades de proteínas homodiméricas que dimerizam de modo induzível ou subunidades de proteínas heterodiméricas que dimerizam de modo induzível. O receptor de direcionamento controlável por molécula de pequena pode ser codificado por um único transgene se for homodimérico ou por dois transgenes quando for heterodimérico.

[0063] Exemplos de subunidades de proteína que dimerizam de modo induzível incluem, sem limitação, a proteína de ligação a FK506 (FKBP) e o domínio de ligação a rapamicina FKBP12 (FRB). A proteína de ligação a FK506 se dimeriza na presença de tacrolimo (FK506). O domínio de ligação FKBP12-rapamicina (FRB) se dimeriza na presença de rapamicina. Assim, a molécula pequena de acordo com a presente divulgação pode ser tacrolimo, rapamicina ou um rapalog (um análogo da rapamicina). Outros exemplos de moléculas pequenas pelas quais os receptores controláveis por moléculas pequenas podem ser controlados incluem, sem limitação, rapamicina, um rapalog, cumermicina, giberelina, ácido abscísico (ABA), metotrexato, ciclosporina A, FKCsA, trimetoprima (Tpm) - ligante sintético para FKBP (SLF), ou quaisquer derivados destes. Pares exemplificativos de domínios adequados como proteínas de fusão nos receptores da presente divulgação incluem, sem limitação, um par selecionado de FKBP e FRB, FKBP e calcineurina, FKBP e ciclofilina, FKBP e DHFR bacteriano, calcineurina e ciclofilina, PYL1 e ABI1, ou GIB1 e GAI, ou variantes destes.

[0064] Em alguns casos, o receptor de direcionamento controlável por molécula pequena compreende um domínio extracelular compreendendo um ou mais domínios de ligação de molécula pequena. A ligação da molécula pequena ao (s) domínio (s) extracelular (es) causa interação intramolecular de moléculas receptoras (*por exemplo*, homodimerização ou heterodimerização), ativando assim para células alvo e/ou um sinal a jusante do (s) domínio (s) intracelular (es). O (s) domínio (s) intracelular (es) do receptor controlável por molécula pequena podem compreender um ou mais domínios selecionados a partir de domínios ou fragmentos de CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, Morte Programada-1 (PD-1), co-estimulador de células T

induzíveis (ICOS), antígeno-1 associado à função linfocitária (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 gama, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 zeta, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor Fc gama, molécula MHC classe 1, proteínas receptoras de TNF, uma proteína de imunoglobulina, receptor de citocina, integrinas, moléculas de ativação linfocítica de sinalização (Proteínas SLAM), ativando receptores de células NK, BTLA, um receptor de ligante 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, IL-21R 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 ligante que se liga especificamente a CD83, CD27, CD28, ICOS, 4-1BB, CD40, RANK/TRANCE-R, OX40, TGFbR1, TGFbRII, myd88, CD40 e quaisquer outros membros da superfamília de receptores de TNF e combinações destes. Outros CARs controláveis exemplificativos são fornecidos pela Patente US Nº 10,196,444, incorporada neste documento por referência.

[0065] Em algumas modalidades, as duas subunidades de proteína que dimerizam de modo induzível são cada uma fundidas a uma proteína transmembrana compreendendo domínio (s) de sinalização e a um agente de ligação (*por exemplo* , fragmento variável de cadeia única, scFv), respectivamente. O agente de ligação é capaz de se ligar especificamente a um alvo de interesse. A dimerização induzida por moléculas pequenas reconstitui uma unidade dimérica que vai do agente de ligação através das subunidades da proteína dimerizada até o (s) domínio (s) de sinalização intracelular (s) através da região transmembrana da proteína transmembrana. Em algumas modalidades, duas proteínas transmembrana são empregadas e dimerizadas induzíveis entre si e para a proteína de fusão do agente de ligação em resposta a uma ou duas

moléculas pequenas. Em algumas modalidades, o CAR controlável por molécula pequena compreende duas ou mais proteínas de fusão de agente de ligação que cada uma dimeriza individualmente para a proteína transmembrana compreendendo domínio (s) de sinalização.

1.4 Promotores e Elementos de Controle Genético

[0066] A presente divulgação contempla ainda vetores lentivirais compreendendo promotores e/ou potencializadores específicos para células T, células NK ou células T e células NK. A presente divulgação fornece sequências de ácido nucleico de promotores específicos de células T e/ou células NK (SEQ ID NOs: 1-4). Estes podem ser operativamente ligados ao receptor de ativação de células T/células NK geralmente inserindo a sequência promotora 5' para o gene codificado pelo vetor lentiviral. O uso do promotor pode ser idêntico a uma sequência estabelecida em SEQ ID NOs: 1-4 ou 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% idêntica a uma sequência estabelecida em SEQ ID NOs: 1-4, desde que o promotor retenha a atividade do promotor nas células T e/ou NK.

[0067] Em alguns casos, outros promotores podem ser usados para controlar a expressão do receptor de ativação de células T/células NK. Exemplos de promotores úteis na presente divulgação incluem, sem limitação, um promotor MND, um promotor específico de células T, um promotor específico de células T CD4, um promotor específico de células T CD8, um promotor específico de células NK, um promotor específico de células T- promotor específico de células e células NK, um promotor específico de células T CD4 e células NK e um promotor específico de células T CD8 e células NK.

[0068] Em alguns casos, um promotor “forte” é usado. Será entendido que a força de um promotor é determinada em parte pelos atributos da célula em que opera. Em alguns casos, o promotor forte da presente divulgação resulta em expressão de alto nível de elementos gênicos aos quais está operacionalmente ligado em uma célula alvo, como um TIL. Os promotores fortes incluem, sem limitação, citomegalovírus (CMV) e vírus de células-tronco murinas (MSCV), fosfoglicerato quinase (PGK), uma sequência promotora composta pelo potencializador de CMV e porções do promotor beta-actina de galinha e o gene da beta-globina de coelho (CAG), sequência promotora composta por porções do

promotor SV40 e do promotor CD43 (SV40/CD43), e um promotor sintético que contém a região U3 de uma LTR MoMuLV modificada com potencializador do vírus do sarcoma mieloproliferativo (MND). Promotores fortes exemplificativos úteis nas composições e método da presente divulgação são fornecidos por Jones et al. Lentiviral vector design for optimal T cell receptor gene expression in the transduction of peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes. *Hum Gene Ther.* 2009 Jun;20(6):630-40.

[0069] Em alguns casos, o promotor forte pode ser um promotor forte sintético. Promotores fortes sintéticos exemplificativos são fornecidos por Schlabach et al. (2010) *Proc Natl Acad Sci USA.* 10: 2538–2543. Em alguns casos, outros promotores são usados. Em alguns casos, qualquer promotor ativo na linhagem celular de empacotamento é usado. Em alguns casos, um promotor induzível é usado, *por exemplo*, um promotor induzível por droga.

[0070] Em alguns casos, os vetores da presente divulgação podem compreender o Elemento Regulador Pós-transcricional do Vírus da Hepatite da Marmota (wPRE) ou uma sequência de ácido nucleico substancialmente idêntica a wPRE. Ver Patente US Nº 6,136,597; Lee et al. (2005) *Exp Physiol.* 90: 33–7. Variantes do elemento wPRE com tamanho reduzido são conhecidas na técnica. wPRE-O refere-se a uma variante de wPRE com o tamanho intermediário

[0071] Em alguns casos, os vetores lentivirais da presente divulgação podem compreender uma sequência polinucleotídica que codifica o peptídeo 2A. O termo "peptídeo 2A" refere-se a um peptídeo autoclivável configurado para gerar duas ou mais proteínas a partir de uma única estrutura de leitura aberta. Os peptídeos 2A são oligopeptídeos virais de 18-22 resíduos que medeiam a "clivagem" de polipeptídeos durante a tradução em células eucarióticas. "Peptídeo 2A" pode se referir a peptídeos com várias sequências de aminoácidos. Na presente divulgação será entendido que, quando um vetor lentiviral compreende dois ou mais peptídeos 2A, os peptídeos 2A podem ser idênticos entre si ou diferentes. A metodologia detalhada para o projeto e uso de peptídeos 2A é fornecida por Szymczak-Workman et al. (2012) *Cold Spring Harb. Protoc.* 2012: 199-204. Na literatura, os peptídeos 2A são frequentemente referidos como peptídeos autocliváveis, mas estudos mecanicistas mostraram que

a "autoclivagem" observada é, na verdade, uma consequência do ribossomo pular a formação da ligação glicil-prolil peptídeo no terminal C do peptídeo 2A. Donnelly et al. (2001) *J Gen Virol.* 82:1027-41.

[0072] Em alguns casos, os vetores lentivirais da presente divulgação podem compreender o Elemento Regulador Pós-transcricional do Vírus da Hepatite da Marmota (wPRE) ou uma sequência de ácido nucleico substancialmente idêntica a wPRE. Ver Lee et al. Optimizing regulatable gene expression using adenoviral vectors. *Exp Physiol.* 90 (1): 33–7 (2005). Nos vetores virais da presente divulgação, a sequência wPRE aumenta a expressão de genes distribuídos pelos referidos vetores virais.

1.5 Glicoproteínas de Fusão

[0073] Várias glicoproteínas de fusão podem ser usadas para pseudotipar vetores lentivirais. Embora o exemplo mais comumente usado seja a glicoproteína do envelope do vírus da estomatite vesicular (VSVG), muitas outras proteínas virais também foram usadas para pseudotipagem de vetores lentivirais. Ver Joglekar et al. (2017) *Human Gene Therapy Methods* 28:291-301. A presente divulgação contempla a substituição de várias glicoproteínas de fusão. Notavelmente, algumas glicoproteínas de fusão resultam em maior eficiência do vetor.

[0074] Em algumas modalidades, a pseudotipagem de uma glicoproteína de fusão ou variante funcional desta facilita a transdução direcionada de tipos de células específicos, incluindo, mas não se limitando a, células T ou células NK. Em algumas modalidades, a glicoproteína de fusão ou variante funcional desta é/são polipeptídeo (s) de comprimento completo, fragmento (s) funcional (is), homólogo (s) ou variante (s) funcional (is) do vírus da imunodeficiência humana (HIV) gp160, vírus da leucemia murina (MLV) gp70, vírus da leucemia do macaco gibbon (GALV) gp70, vírus da leucemia felina (RD114) gp70, retrovírus anfotrópico (Ampho) gp70, 10A1 MLV (10A1) gp70, retrovírus ecotrópico (Eco) gp70, vírus da leucemia de babuíno (BaEV) gp70, vírus do sarampo (MV) H e F, vírus Nipah (NiV) H e F, vírus da raiva (RabV) G, vírus Mokola (MOKV) G, vírus Ebola Zaire (EboZ) G, vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) GP1 e GP2, Baculovírus GP64, vírus Chikungunya (CHIKV) E1

e E2, vírus Ross River (RRV) E1 e E2, vírus Semliki Forest (SFV) E1 e E2, vírus Sindbis (SV) E1 e E2, vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV) E1 e E2, vírus da encefalite equina ocidental (WEEV) E1 e E2, Influenza A, B, C ou D HA, vírus da peste aviária (FPV) HA, vírus da estomatite vesicular VSV-G ou vírus Chandipura e vírus Piry CNV-G e PRV-G. Em alguns casos, a glicoproteína de fusão ou variante funcional desta é um polipeptídeo de comprimento completo, fragmento funcional, homólogo ou variante funcional da proteína G do vírus da estomatite vesicular Alagoas (VSAV), Carajas Vesiculovírus (CJSV), Chandipura Vesiculovírus (CHPV), Vesiculovírus Cocal (COCV), Vírus da Estomatite Vesicular Indiana (VSIV), Vesiculovírus Isfahan (ISFV), Vesiculovírus Maraba (MARAV), Vírus da Estomatite Vesicular New Jersey (VSNJV), Vírus Bas-Congo (BASV). Em algumas modalidades, a glicoproteína de fusão ou variante funcional desta é a proteína G do vírus Cocal.

1.6 Ligantes de inibição de checkpoint

[0075] Em alguns casos, os vetores lentivirais da presente divulgação compreendem ainda uma sequência de ácido nucleico que codifica um ligante de inibição de checkpoint. Opcionalmente, o ligante de inibição de checkpoint é capaz de bloquear o checkpoint PD-1/PD-L1. Opcionalmente, o ligante de inibição do checkpoint é capaz de bloquear o checkpoint Tim-3.

[0076] A terapia com inibidores de checkpoint é uma forma de tratamento do câncer que usa agentes para estimular ou inibir os checkpoints imunes e, assim, modular a resposta imune. Os tumores podem usar checkpoints para se proteger do sistema imunológico do sujeito ou de agentes terapêuticos usados na imunoterapia contra o câncer. A presente divulgação fornece um vetor lentiviral compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica um ligante de inibição de checkpoint, em que partículas lentivirais produzidas a partir do vetor lentiviral exibem o ligante inibidor de checkpoint em sua superfície e, portanto, a administração da partícula lentiviral resulta na distribuição do checkpoint - inibir o ligante para o sujeito no sítio de uso terapêutico. A presente divulgação fornece ainda vetores lentivirais compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica um ligante de inibição de checkpoint, em que a administração de partículas lentivirais produzidas a partir do vetor lentiviral

distribui a sequência polinucleotídica para células alvo, que então expressam o ligante inibidor de checkpoint no uso do sítio terapêutico usar.

[0077] Exemplos de ligantes inibidores de checkpoint fornecidos pela presente divulgação incluem, sem limitação, anticorpo anti-CTLA-4, anticorpos anti-PD-1 e anticorpos anti-PD-L1 ou quaisquer ligantes não anticorpos (por exemplo, nanocorpos, DARPs) que interagir com CTLA4, PD-1 ou PD-L1, respectivamente. Em alguns casos, o ligante de inibição de checkpoint é capaz de bloquear o checkpoint PD-1/PD-L1 e/ou o checkpoint Tim-3 e/ou o checkpoint CTLA-4. O uso da inibição de checkpoint é revisado em, por exemplo, Anderson et al. Tim-3: an emerging target in the cancer immunotherapy landscape. *Cancer Immunol Res.* 2014 May;2(5):393-8.

1.5 Resistência a Drogas Imunossupressoras

[0078] Em alguns casos, os vetores lentivirais da presente divulgação compreendem ainda uma sequência de ácido nucleico (*por exemplo*, no plasmídeo de transferência) que fornece resistência a uma droga imunossupressora. Uma sequência de ácido nucleico que fornece resistência a uma droga imunossupressora irá, em alguns casos, facilitar a expansão seletiva das células alvo quando a droga imunossupressora é administrada a um paciente durante qualquer um dos métodos para tratar um sujeito ou qualquer um dos métodos para expandir células T capazes de reconhecer e matar células tumorais em um sujeito em necessidade deste, fornecidas pela presente divulgação. Em alguns casos, a droga imunossupressora é metotrexato, rapamicina, um rapalog, tacrolimo, ciclosporina ou qualquer combinação destes. A droga imunossupressora pode ser a mesma que a molécula pequena ou diferente, ou seja, o vetor lentiviral pode ser projetado de modo que os receptores de ativação de células T/células NK controláveis por moléculas pequenas sejam induzidas por uma droga imunossupressora de modo que sempre que a droga imunossupressora for administrada ao sujeito, a expansão das células transduzidas seja desencadeada. Alternativamente, pode ser vantajoso projetar o vetor lentiviral para permitir o controle da expansão da célula transduzida independente da imunossupressão.

[0079] Em alguns casos, o vetor lentiviral facilita a expansão seletiva

das células alvo, conferindo resistência a uma droga imunossupressora às células transduzidas, facilita a expansão seletiva das células alvo. A presente divulgação fornece vetores lentivirais que compreendem qualquer uma das sequências nucleicas que conferem resistência a uma droga imunossupressora conhecida na técnica. Exemplos de drogas imunossupressoras incluem, sem limitação, rapamicina ou um derivado deste, um rapalog ou um derivado deste, tacrolimo ou um derivado deste, ciclosporina ou um derivado deste, metotrexato ou derivados destes, e micofenolato mofetil (MMF) ou derivados destes. Vários genes de resistência são conhecidos na técnica. A resistência à rapamicina pode ser conferida por uma sequência polinucleotídica que codifica o domínio da proteína FRb, encontrada no domínio mTOR e conhecida por ser o alvo do complexo FKBP-rapamicina. A resistência ao tacrolimo pode ser conferida por uma sequência polinucleotídica que codifica o mutante de calcineurina CNa22 ou o mutante de calcineurina CNb30. A resistência à ciclosporina pode ser conferida por uma sequência polinucleotídica que codifica o mutante de calcineurina CNa12 ou o mutante de calcineurina CNb30. Esses mutantes de calcineurina são descritos em Brewin et al. (2009) *Blood* 114: 4792-803. A resistência ao metotrexato pode ser fornecida por várias formas mutantes de di-hidrofolato redutase (DHFR), ver Volpato et al. (2011) *J Mol Recognition* 24:188–198, e a resistência ao MMF pode ser fornecida por várias formas mutantes de inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), ver Yam et al. (2006) *Mol Ther* 14: 236–244.

[0080] Drogas imunossupressoras são comumente usadas antes, durante e/ou após a ACT. Em alguns casos, o uso de uma droga imunossupressora pode melhorar os resultados do tratamento. Em alguns casos, o uso de uma droga imunossupressora pode diminuir os efeitos colaterais do tratamento, como, sem limitação, doença do enxerto contra o hospedeiro aguda, doença do enxerto contra o hospedeiro crônica e doença linfoproliferativa pós-transplante. A presente divulgação contempla o uso de drogas imunossupressoras com qualquer um dos métodos de tratamento ou prevenção de uma doença ou condição da presente divulgação, incluindo, sem limitação, métodos da presente divulgação em que o vetor lentiviral confere resistência a

uma droga imunossupressora para células transduzidas.

2.1 Linhagens Celulares de Empacotamento

[0081] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece linhagens celulares de empacotamento para gerar partículas lentivirais capazes de ativar e transduzir de forma eficiente células T, compreendendo células cultivadas capazes de empacotar um vetor de lentivírus, em que as células cultivadas são geneticamente modificadas para expressar uma ativação de células T ou co-molécula de estimulação, ou são induzidos a expressar transitoriamente uma ativação de células T ou molécula de coestimulação por meio de transfecção transitória. As linhagens celulares de empacotamento da presente divulgação podem ser usadas com qualquer vetor lentiviral incluindo, mas não se limitando àqueles descritos anteriormente. Em alguns casos, será vantajoso usar a linhagem celulares de empacotamento com um vetor lentiviral compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor de ativação de células T/células NK. Em alguns casos, será vantajoso para esse receptor de ativação de células T/células NK ser capaz de ser ativado por uma molécula pequena. Mas as linhagens celulares de empacotamento divulgadas podem ser usadas com outros vetores lentivirais também.

[0082] Em alguns casos, a linhagem celulares de empacotamento é uma linhagem celulares HEK-293T. Resultados semelhantes podem ser alcançados com outras linhagens celulares, incluindo, sem limitação, linhagens celulares HEK-293T projetadas para serem deficientes em B2M ou outras proteínas de superfície imunologicamente ativas. Outras linhagens celulares que são transfectáveis *in vitro* e capazes de produção de vetor lentiviral de alto título podem ser usadas -*por exemplo*, linhagens celulares que compreendem a sequência do gene para o antígeno T grande do polioma vírus operativamente ligado a um promotor.

[0083] A linhagem celular de empacotamento pode ser, em alguns casos, geneticamente modificada para não ter expressão de MHC de classe I, expressão de MHC de classe II ou expressão de ligantes de checkpoints inibitórios, como PD-L1 (um ligante de PD-1) ou ligantes para TIM3. Como a expressão de ligantes inibitórios pela linhagem celulares de empacotamento pode

limitar a ativação de células T pelas partículas lentivirais, essas modificações genéticas servem, em alguns casos, para eliminar tais sinais inibitórios, promovendo ainda mais a ativação de células T e transdução pelas partículas lentivirais.

[0084] Em alguns casos, uma linhagem celulares de empacotamento é geneticamente modificada para compreender um ou mais genes úteis no empacotamento de vetores lentivirais em partículas lentivirais. Em alguns casos, uma linhagem celular de empacotamento pode compreender sequências polinucleotídicas que codificam os genes *gag-pol*, *env*, e *rev*. Em um vetor lentiviral típico da presente invenção, pelo menos parte de uma ou mais das regiões de codificação da proteína *gag-pol* e *env* pode ser removida do vetor lentiviral e fornecida pela linhagem celular de empacotamento. Os vetores lentivirais podem ser empacotados de acordo com os métodos fornecidos em Dull et al. (1998) *J Virol* 72: 8463-71, que está incorporado neste documento na sua totalidade. Linhagens celulares de empacotamento exemplificativos são fornecidas em *Retroviruses*. Cold Spring Harbour Laboratory (Coffin et al., eds) (1997).

[0085] A presente divulgação fornece ainda a manipulação genética da linhagem celular de empacotamento para melhorar os atributos imunológicos dos vetores lentivirais e partículas da presente divulgação de outras maneiras, incluindo, sem limitação, adicionar genes, excluir genes e introduzir mutações pontuais em genes.

2.2 Ativação de células T ou moléculas de co-simulação

[0086] Convencionalmente, a transdução lentiviral *in vitro* requer adicional de um agente ativador exógeno, como um "stimbead", por exemplo, Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28. Partículas lentivirais feitas usando as linhagens celulares de empacotamento da presente divulgação incorporam uma ou mais cópias da ativação de células T ou molécula de coestimulação que é expressa pela linhagem de células de empacotamento na partícula lentiviral; e a incorporação de ativação de células T ou molécula (s) de coestimulação na partícula lentiviral torna a partícula lentiviral capaz de ativar e transduzir eficientemente as células T na ausência de um agente ativador exógeno, ou seja,

sem um stimbead ou agente equivalente. Isso permite que as partículas lentivirais feitas a partir dessas linhagens celulares de empacotamento sejam usadas *in vivo* nos casos em que a distribuição exógena de um agente de ativação pode ser impraticável.

[0087] Em alguns casos, a ativação de células T ou molécula de coestimulação pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em um anticorpo anti-CD3, ligante CD28 (CD28L) e ligante 41bb (41BBL ou CD137L). Várias moléculas de ativação ou coestimulação de células T são conhecidas na técnica e incluem, sem limitação, agentes que se ligam especificamente a qualquer uma das proteínas expressas em células T CD3, CD28, CD134 também conhecidas como OX40, ou 41bb também conhecidas como 4-1BB ou CD137 ou TNFRSF9. Por exemplo, um agente que se liga especificamente a CD3 pode ser um anticorpo anti-CD3 (*por exemplo*, OKT3, CRIS-7 ou I2C) ou um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo anti-CD3. Em alguns aspectos, um agente que se liga especificamente a CD3 é um fragmento Fv de cadeia única (scFv) de um anticorpo anti-CD3. Em alguns casos, a presente divulgação contempla que a ativação de células T ou molécula de coestimulação é selecionada a partir do grupo que consiste em um anticorpo anti-CD3, ligante CD28 (CD28L) e ligante 41bb (41BBL ou CD137L). O CD86 também conhecido como B7-2 é um ligante tanto para o CD28 quanto para o CTLA-4. Em alguns casos, um CD28L pode ser CD86. CD80 é um ligante adicional para CD28. Em alguns casos, o ligante para CD28 é CD80. Em alguns casos, o ligante para CD28 é um anticorpo anti-CD28 ou um scFv anti-CD28 fundido a um domínio transmembranar para exibição na superfície da partícula lentiviral. Partículas lentivirais compreendendo uma ou mais moléculas de ativação de células T ou coestimulação podem ser feitas por métodos fornecidos por WO2016/139463.

3 Partículas Lentivirais

[0088] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece ainda partículas lentivirais compreendendo qualquer um dos vetores lentivirais da presente divulgação. As partículas lentivirais da presente divulgação podem ser feitas com as linhagens celulares de empacotamento da presente divulgação ou

com outra linhagem celular de empacotamento ou por cotransfecção de células cultivadas, por exemplo, células HEK-293T, com o vetor lentiviral e plasmídeos auxiliares. As partículas lentivirais da presente divulgação podem ser preparadas, por exemplo, transduzindo qualquer um dos vetores lentivirais da presente divulgação em células cultivadas geneticamente modificadas para expressar uma ativação de células T ou molécula de coestimulação. Em alguns casos, devido ao vetor lentiviral, à linhagem celular de empacotamento escolhida ou aos plasmídeos auxiliares co-transfectados, a partícula lentiviral compreenderá uma ativação de células T ou molécula de coestimulação, cuja molécula pode ser, sem limitação, um anticorpo anti-CD3, um ligante CD28 ou ligante 41bb. As células cultivadas geneticamente modificadas para expressar uma ativação de células T ou molécula de coestimulação podem ser células HEK-293T. Em alguns casos, as células cultivadas são geneticamente modificadas para não ter expressão de MHC de classe I, expressão de MHC de classe II ou expressão de ligantes de checkpoint inibitórios, como PD-L1 (um ligante de PD-1) ou ligantes para TIM3.

4 Métodos de Uso

[0089] Em outro aspecto, a divulgação fornece métodos para tratar um sujeito que sofre de câncer, compreendendo a administração de qualquer partícula lentiviral da presente divulgação ao sujeito e a administração da molécula pequena ao sujeito, em que o câncer é tratado no sujeito.

[0090] Em algumas modalidades, a divulgação fornece uma partícula lentiviral com superfície modificada para uso em terapia. Em outras modalidades, a divulgação fornece uma partícula lentiviral com superfície modificada para uso em um método de tratamento de um câncer. Em outras modalidades, a divulgação fornece uma partícula lentiviral com superfície modificada para uso na fabricação de um medicamento para o tratamento do câncer.

[0091] Em alguns casos, o câncer é um tumor sólido, como um melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas ou câncer de mama. Os métodos da presente divulgação podem incluir o tratamento de qualquer câncer, incluindo, sem limitação, leucemia granulocítica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, adenocarcinoma, adenossarcoma, câncer adrenal,

carcinoma adrenocortical, câncer anal, astrocitoma anaplásico, angiossarcoma, câncer do apêndice, astrocitoma, carcinoma de células basais, linfoma de células B, câncer de ducto biliar, câncer de bexiga, câncer de osso, câncer de medula óssea, câncer de intestino, câncer de cérebro, glioma de tronco de cérebro, tumor de cérebro, câncer de mama, tumores carcinoides, câncer cervical, colangiocarcinoma, condrossarcoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide crônica, câncer de cólon, câncer colorretal, craniofaringioma, linfoma cutâneo, melanoma cutâneo, astrocitoma difuso, carcinoma ductal in situ, câncer endometrial, ependimoma, câncer colorretal, sarcoma epitelióide, sarcoma de esôfago, câncer esofágico extra câncer de olho, câncer de trompa de Falópio, fibrossarcoma, câncer de vesícula biliar, câncer gástrico, câncer gastrointestinal, câncer carcinoide gastrointestinal, tumores estromais gastrointestinais, geral, tumor de células germinativas, doença trofoblástica gestacional, glioblastoma multiforme, glioma, leucemia de células pilosas, câncer de cabeça e pescoço, hemangiendotelioma, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, infiltração carcinoma ductal, carcinoma lobular infiltrante, câncer de mama inflamatório, câncer intestinal, câncer de ducto biliar intra-hepático, câncer de mama invasivo/infiltrante, câncer de células das ilhotas, câncer de mandíbula, sarcoma de Kaposi, câncer de rim, câncer de laringe, leiomiossarcoma, metástases leptomeníngicas, leucemia, câncer de lábio, lipossarcoma, câncer de fígado, carcinoma lobular in situ, astrocitoma de baixo grau, câncer de pulmão, câncer de linfonodo, linfoma, câncer de mama masculino, carcinoma medular, meduloblastoma, melanoma, meningioma, carcinoma de células de Merkel, condrossarcoma mesenquimal, mesenquimatoso, mesotelioma, metastático câncer de mama, melanoma metastático, câncer escamoso metastático do pescoço, gliomas mistos, câncer de boca, carcinoma mucinoso, melanoma mucoso, mieloma múltiplo, micose fungoide, síndrome mielodisplásica, câncer de cavidade nasal, câncer de nasofaringe, câncer de pescoço, neuroblastoma, tumores neuroendócrinos, linfoma não-Hodgkin, linfoma não-Hodgkin câncer de pulmão de células pequenas, câncer de células de aveia, câncer ocular, melanoma ocular, oligodendroglioma, câncer oral, câncer de cavidade oral, câncer orofaríngeo, sarcoma osteogênico, osteossarcoma, câncer de ovário,

câncer epitelial de ovário, tumor de células germinativas de ovário, carcinoma de ovário peritoneal primário, tumor estromal do cordão sexual, doença de Paget, câncer pancreático, carcinoma papilar, câncer dos seios paranasais, câncer da paratireoide, câncer pélvico, câncer peniano, câncer do nervo periférico, câncer peritoneal, câncer faríngeo, feocromocitoma, astrocitoma pilocítico, tumor da região pineal, pinoblastoma, tumores pituitários, sistema nervoso central primário, câncer de próstata, câncer retal, carcinoma de células renais, câncer de pelve renal, rabdomyossarcoma, câncer de glândula salivar, sarcoma, sarcoma, osso, sarcoma, tecido mole, sarcoma, útero, câncer de seio, câncer de pele, câncer de células pequenas de pulmão, câncer de intestino delgado, sarcoma de tecidos moles, câncer de coluna, câncer de coluna vertebral, câncer de medula espinhal, tumor espinhal, carcinoma de células escamosas, câncer de estômago, sarcoma sinovial, linfoma de células t, câncer testicular, câncer de garganta, timoma/carcinoma tímico, câncer de tireoide, câncer de língua, câncer de amígdala, câncer de células transicionais, câncer de células transicionais, câncer de células transicionais, câncer de mama triplo-negativo, câncer tubular, carcinoma tubular, câncer não diagnosticado, câncer ureteral, câncer ureteral, câncer uretral, adenocarcinoma uterino, câncer uterino, sarcoma uterino, câncer vaginal, câncer vulvar.

[0092] Em outro aspecto, a divulgação fornece um método para expandir células T capazes de reconhecer e matar células tumorais em um sujeito em necessidade deste, incluindo as etapas de administração de uma partícula lentiviral da divulgação ao sujeito, de modo que células T capazes de reconhecer e matar células tumorais no sujeito são transduzidas pela partícula lentiviral e expandidas. Em algumas modalidades, a partícula lentiviral é administrada por injeção intravenosa ou por injeção intratumoral.

[0093] Em alguns casos, a partícula lentiviral compreende um agente de direcionamento ou o vetor de ácido nucleico codifica um agente de direcionamento. Agentes de direcionamento exemplificativos incluem anticorpos e receptores de antígenos quiméricos ("CAR"). O termo "anticorpo" se refere a uma imunoglobulina de ligação ao antígeno intacta de qualquer tipo, ou um fragmento desta que se liga especificamente ao antígeno alvo do anticorpo e inclui, por

exemplo, anticorpos quiméricos, humanizados, totalmente humanos e biespecíficos. O CAR usado na presente divulgação em alguns casos compreende um domínio de ligação que é específico para células B, *por exemplo*, específico para um marcador de CD que pode ser encontrado no linfoma de células B, como CD19, CD22, CD20 ou CD79a, CD19 sendo preferido. As células T que foram geneticamente modificadas para expressar um CAR (por exemplo, um CAR de células T) são exemplificadas em WO2007/131092. O agente de direcionamento serve, em alguns casos, para direcionar a imunidade mediada por células para outros tipos de células particulares, como células tumorais.

[0094] Em outro aspecto, a divulgação fornece métodos para expandir células T capazes de reconhecer e matar células tumorais em um sujeito em necessidade destes, compreendendo a administração de qualquer partícula lentiviral da presente divulgação ao sujeito e a administração da molécula pequena ao sujeito, em que as células T capazes de reconhecer e matar células tumorais no sujeito são expandidas.

[0095] Em certas modalidades, um sujeito tratado pelos métodos descritos neste documento pode ser um mamífero. Em alguns casos, um sujeito é um humano, um primata não humano, um porco, um cavalo, uma vaca, um cachorro, um gato, um coelho, um camundongo ou um rato. Um sujeito pode ser uma mulher ou um homem.

[0096] As terapias de combinação também são contempladas pela invenção. Combinação conforme usado neste documento inclui tratamento simultâneo ou tratamento sequencial. Combinações de métodos da invenção com tratamentos médicos padrão (por exemplo, corticosteroides) são especificamente contempladas, assim como combinações com novas terapias. Em alguns casos, um sujeito pode ser tratado com um esteroide (por exemplo, prednisona, prednisolona, deflazacort) para prevenir ou reduzir uma resposta imune à administração de uma partícula lentiviral descrita neste documento. Em certos casos, um sujeito pode receber aférese ou outro modulador imunológico se o sujeito expressar anticorpos para a partícula lentiviral descrita neste documento. Em alguns casos, tais moduladores imunológicos podem ser desnecessários, particularmente quando um agente imunossupressor (por exemplo, tacrolimo ou

sirolimo) é administrado. Em alguns casos, o rituxan é administrado simultaneamente ou sequencialmente com o tratamento com partículas lentivirais. Rituxan pode, em alguns casos, servir para bloquear as respostas imunológicas contra as partículas lentivirais

[0097] As partículas lentivirais, pequenas moléculas e drogas imunossupressoras da presente divulgação podem ser administradas por qualquer via, incluindo via oral, nasal, intravenosa, intra-arterial, intramuscular ou intraperitoneal. Em alguns casos, a partícula lentiviral é administrada por injeção intravenosa ou por injeção intratumoral. Em alguns casos, a molécula pequena é administrada por injeção intravenosa ou por via oral. Em alguns casos, a molécula pequena é administrada em concentrações suficientes para ativar o receptor de ativação de células T/células NK. Em alguns casos, a molécula pequena é rapamicina, opcionalmente administrada em concentrações suficientes para manter as concentrações séricas de rapamicina maiores do que 0,1 nM, 1 nM ou 10 nM. Em alguns casos, a molécula pequena é um rapalog, opcionalmente administrado em concentrações suficientes para manter as concentrações séricas do rapalog superiores a 0,1 nM, 1 nM ou 10 nM. Em alguns casos, a molécula pequena é capaz de causar dimerização do receptor de ativação de células T/células NK, resultando em um sinal de ativação de células.

[0098] Em alguns casos, a molécula pequena é administrada simultaneamente com a partícula lentiviral; ou a molécula pequena é administrada cerca de 30 minutos, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas ou cerca de 10 horas antes ou depois da administração da partícula lentiviral. Em alguns casos, o método compreende ainda a administração ao sujeito de um agente imunossupressor. Em alguns casos, o agente imunossupressor é tacrolimo, opcionalmente administrado em concentrações suficientes para manter as concentrações séricas de tacrolimo maiores que 0,1 nM, 1 nM ou 10 nM. Em alguns casos, o agente imunossupressor é a ciclosporina, opcionalmente administrada em concentrações suficientes para manter as concentrações séricas de ciclosporina maiores que 0,1 nM, 1 nM ou 10 nM. Em alguns casos, o agente imunossupressor é uma droga imunossupressora. Em alguns casos, o agente imunossupressor é uma droga imunossupressora e o

vetor lentiviral compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína que fornece resistência à referida droga imunossupressora

[0099] As formas farmacêuticas apropriadas para uso em injeção podem incluir soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Em todos os casos, a forma deve ser estéril e deve ser fluida à medida que exista fácil seringabilidade. Deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenamento e deve ser preservada contra as ações contaminante de micro-organismos, tais como bactérias e fungos. O carreador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido, e semelhantes), misturas apropriadas destes e óleos vegetais. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de surfactantes. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser alcançada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e semelhantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares ou cloreto de sódio. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada pelo uso de agentes retardantes de absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[00100] Soluções injetáveis estéreis são preparadas pela incorporação de rAAV nas quantidades necessárias no solvente adequado com vários outros ingredientes enumerados acima, conforme necessário. As soluções injetáveis podem ser preparadas assepticamente ou esterilizadas por filtro.

5 Definições

[00101] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado que é comumente compreendido por aqueles versados comuns na técnica ao qual pertence a invenção. Para fins da presente invenção, os seguintes termos são definidos abaixo.

[00102] Conforme usado neste documento, "partículas de controle 293T" ou "Mock (vetor 293T)" referem-se a partículas lentivirais geradas por

transdução de células 293T com um vetor lentiviral. Tal conforme usado neste documento, "stimbeads" refere-se a um reagente à base de grânulo usado para estimular as células T durante a transdução. O rótulo "+Controle (vetor + stimbeads)" refere-se à transdução com partículas de controle 293T com stimbeads.

[00103] Tal conforme usado neste documento, o termo "células HATSE" ou "linhagem celular HATSE" ou "HATSE-293" refere-se a uma linhagem celular de empacotamento criada pela transdução de células 293T com vetor (es) lentiviral (is) que codificam CD86 e CD137L e submetido à separação de células ativadas por fluorescência (FACS) para células que expressaram altamente CD86 e CD137L uma ou mais vezes. O rótulo "vetor de células HATSE(separado 1x)" refere-se a partículas lentivirais geradas por transdução de células HATSE com um vetor lentiviral após as células HATSE serem separadas por FACS para células CD86⁺/CD137L⁺ duplamente positivas uma vez. O rótulo "vetor de células HATSE(separada 2x) se refere a partículas lentivirais geradas por transdução de células HATSE com um vetor lentiviral após as células HATSE serem separadas por FACS para células CD86⁺/ CD137L⁺ duplamente positivas uma vez.

[00104] Os artigos "um", "uma" e "o" e "a" são usados neste documento para se referir a um ou mais de um (ou seja, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais de um elemento.

[00105] O uso da alternativa (por exemplo, "ou") deve ser entendido significando um, ambos ou qualquer combinação destes das alternativas.

[00106] O termo "e/ou" deve ser entendido como significando uma ou ambas as alternativas.

[00107] Tal conforme usado neste documento, o termo "cerca de" ou "aproximadamente" refere-se a uma quantidade, nível, valor, número, frequência, porcentagem, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento que varia em até 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% ou 1% de uma quantidade, nível, valor, número, frequência, porcentagem, a dimensão, tamanho, a quantidade, peso, ou comprimento de referência. Numa modalidade, o termo "cerca de" ou "aproximadamente" refere-se a um intervalo de quantidade, nível,

valor, número, frequência, porcentagem, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, ou $\pm 1\%$ sobre uma quantidade de referência, nível, valor, número, frequência, porcentagem, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento.

[00108] Qualquer intervalo de concentração, intervalo de porcentagem, intervalo de razão, ou intervalo de número inteiro deve ser entendido como incluindo o valor de qualquer número inteiro dentro do intervalo citado e, quando apropriado, suas frações (como um décimo e um centésimo de um número inteiro), a menos que indicado de outra forma. O termo "cerca de", quando imediatamente anterior a um número ou numeral, significa que o número ou numeral varia mais ou menos 10%.

[00109] Ao longo deste relatório descritivo, a menos que o contexto peça o contrário, as palavras "compreendem", "compreende" e "compreendendo" serão entendidas como implicando a inclusão de uma etapa ou elemento ou grupo de etapas ou elementos declarados, mas não a exclusão de qualquer outro elemento ou etapa ou grupo de elementos ou etapas. Em modalidades específicas, os termos "inclui", "tem", "contém" e "compreende" são usados como sinônimos.

[00110] Por "consistindo em" entende-se incluir, e limitado a, o que segue a frase "consistindo em." Assim, a frase "consistindo em" indica que os elementos listados são obrigatórios ou mandatórios e que nenhum outro elemento pode estar presente.

[00111] Por "consistindo essencialmente em" entende-se incluir elementos listados após a expressão, e limitado a outros elementos que não interferem com ou contribuem com a atividade ou ação especificada na divulgação dos elementos listados.

[00112] Referência ao longo deste relatório descritivo a "uma modalidade", "a modalidade", "uma modalidades específica", "uma modalidade relacionada", "uma determinada modalidade", "uma modalidade adicional" ou "uma outra modalidade" ou combinação destas significa que uma característica específica, estrutura ou característica descrita em conexão com a modalidade é incluída em pelo menos uma modalidade da presente invenção. Assim, as

aparições das frases anteriores em vários locais ao longo deste relatório descritivo não estão necessariamente todas se referindo à mesma modalidade. Além disso, os recursos, estruturas ou características específicas podem ser combinados de forma apropriada em uma ou mais modalidades.

[00113] Conforme usado neste documento, o termo “isolado” significa material que é substancialmente ou essencialmente isento de componentes que normalmente o acompanham em seu estado nativo. Em modalidades específicas, o termo “obtido” ou “derivado” é usado como sinônimo de isolado.

[00114] Um “sujeito”, “paciente” ou “indivíduo”, conforme usado neste documento, inclui qualquer animal que exibe dor que pode ser tratado com os vetores, composições e métodos contemplados neste documento. Sujeitos adequados (por exemplo, pacientes) incluem animais de laboratório (como camundongo, rato, coelho ou porquinho-da-índia), animais de fazenda e animais domésticos ou animais de estimação (como gato ou cachorro). Os primatas não humanos e, preferencialmente, os pacientes humanos, estão incluídos.

[00115] Tal conforme usado neste documento, "tratamento" ou "tratando" inclui qualquer efeito benéfico ou desejável associado ao tratamento. "Tratamento" não indica necessariamente a erradicação completa ou cura da doença ou condição, ou dos sintomas associados desta.

[00116] Tal conforme usado neste documento, "prevenir" e palavras semelhantes, como "prevenido", "prevenir" etc., indicam uma abordagem para prevenir, inibir ou reduzir a probabilidade de ocorrência ou recorrência do distúrbio. Tal conforme usado neste documento, "prevenção" e palavras semelhantes também incluem reduzir a intensidade, efeito, sintomas e/ou carga da doença ou distúrbio antes do início ou recorrência.

[00117] Tal conforme usado neste documento, "quantidade terapêuticamente eficaz" ou "quantidade eficaz" ou "quantidade eficaz" de um vírus ou partícula lentiviral refere-se à quantidade do vírus ou partícula lentiviral necessária para atingir um resultado profilático ou terapêutico benéfico ou desejado, incluindo resultados clínicos .

[00118] Uma "quantidade profilaticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um vírus ou partícula lentiviral eficaz para atingir o resultado

profilático desejado. Normalmente, mas não necessariamente, uma vez que uma dose profilática é usada em sujeitos antes da ou em uma fase inicial da doença, a quantidade profilaticamente eficaz é menor do que a quantidade terapeuticamente eficaz.

[00119] Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de um vírus ou partícula lentiviral pode variar de acordo com fatores como o estado de doença, idade, sexo e peso do indivíduo, e a capacidade das células-tronco e progenitoras de induzir uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também aquela em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais do vírus são superados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" inclui uma quantidade que é eficaz para "tratar" um sujeito (por exemplo, um paciente).

[00120] Uma quantidade "aumentada" ou "potencializada" de uma resposta fisiológica, por exemplo, atividade eletrofisiológica ou atividade celular, é tipicamente uma quantidade "estatisticamente significativa" e pode incluir um aumento que é 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 ou mais vezes (por exemplo, 500, 1000 vezes) (incluindo todos os números inteiros e pontos decimais entre e acima de 1, por exemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) o nível de atividade em um sujeito não tratado.

[00121] Uma quantidade "decrecente" ou "reduzida" de uma resposta fisiológica, por exemplo, atividade eletrofisiológica ou atividade celular, é tipicamente uma quantidade "estatisticamente significativa" e pode incluir uma diminuição que é 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 ou mais vezes (por exemplo, 500, 1000 vezes) (incluindo todos os números inteiros e pontos decimais entre e acima de 1, por exemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) o nível de atividade em um sujeito não tratado.

[00122] Por "manter" ou "preservar" ou "manutenção" ou "sem alteração", ou "sem alteração substancial" ou "sem redução substancial" refere-se geralmente a uma resposta fisiológica que é comparável a uma resposta causada por qualquer um dos veículos, ou uma molécula/composição de controle. Uma resposta comparável é aquela que não é significativamente diferente ou mensurável diferente da resposta de referência.

[00123] "Ligação receptor-ligante", "ligação de ligante" e "ligação" são usados indistintamente neste documento para significar a interação física entre um receptor e um ligante ou um ligante sintético. A ligação do ligante pode ser medida por uma variedade de métodos conhecidos na técnica (por exemplo, detecção de associação com um ligante marcado radioativamente).

[00124] Tal conforme usado neste documento, os termos "afinidade de ligação específica" ou "liga-se especificamente" ou "especificamente ligado" ou "ligação específica" são usados indistintamente ao longo do relatório descritivo e reivindicações e referem-se à ligação que ocorre entre uma espécie pareada de moléculas, por exemplo, receptor e ligante. Quando a interação das duas espécies produz um complexo ligado não covalentemente, a ligação que ocorre é tipicamente eletrostática, ligação de hidrogênio ou o resultado de interações lipofílicas. Em várias modalidades, a ligação específica entre uma ou mais espécies é direta. Em uma modalidade, a afinidade de ligação específica é cerca de 2 vezes maior que a ligação de fundo (ligação não específica), cerca de 5 vezes maior que a ligação de fundo, cerca de 10 vezes maior que a ligação de fundo, cerca de 20 vezes maior que a ligação de fundo, cerca de 50 vezes maior que a ligação de fundo, cerca de 100 vezes maior que a ligação de fundo ou cerca de 1000 vezes maior que a ligação de fundo ou mais.

[00125] Em geral, "identidade de sequência" ou "homologia de sequência" refere-se a uma correspondência exata de nucleotídeo a nucleotídeo ou aminoácido a aminoácido de dois polinucleotídeos ou sequências polipeptídicas, respectivamente. Normalmente, técnicas para determinação de identidade de sequência incluem a determinação da sequência de nucleotídeo de um polinucleotídeo e/ou a determinação da sequência dos aminoácidos codificados assim, e a comparação destas sequências para uma segunda sequência de nucleotídeos ou de aminoácidos. Duas ou mais sequências (polinucleotídeos ou aminoácidos) podem ser comparadas ao determinar a "porcentagem de identidade". A identidade da porcentagem das duas sequências, seja sequências de ácidos nucleicos ou aminoácidos, é o número de correspondências exatas entre duas sequências alinhadas divididas pelo comprimento das sequências mais curtas e multiplicada por 100. A identidade

porcentual também pode ser determinada, por exemplo, comparando a informação de sequência usando o programa de computador BLAST avançado, incluindo a versão 2.2.9, disponível no National Institutes of Health. O programa BLAST é baseado no método de alinhamento de Karlin e Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268 (1990) e conforme discutido em Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Karlin e Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993); e Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997). Resumidamente, o programa BLAST define identidade como o número de símbolos alinhados idênticos (geralmente nucleotídeos ou aminoácidos), dividido pelo número total de símbolos na mais curta das duas sequências. O programa pode ser usado para determinar a porcentagem de identidade ao longo de todo o comprimento das proteínas sendo comparadas. Os parâmetros padrão são fornecidos para otimizar as pesquisas com sequências curtas de consulta, por exemplo, com o programa blastp. O programa também permite a utilização de um filtro SEG para mascarar segmentos das sequências de consulta, conforme determinado pelo programa SEG de Wootton e Federhen, Computers and Chemistry 17:149-163 (1993). Intervalos de graus desejados de identidade de sequência são de aproximadamente 80% a 100% e valores inteiros entre eles. Normalmente, as identidades porcentuais entre uma sequência divulgada e uma sequência reivindicada são pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98%.

[00126] O termo "exógeno" é usado neste documento para se referir a qualquer molécula, incluindo ácidos nucleicos, proteínas ou peptídeos, pequenos compostos moleculares e semelhantes que se originam de fora do organismo. Em contraste, o termo "endógeno" se refere a qualquer molécula que se origina de dentro do organismo (ou seja, produzida naturalmente pelo organismo).

[00127] O termo "MOI" é usado neste documento para se referir à multiplicidade de infecção, que é a proporção de agentes (por exemplo, partículas virais) para alvos de infecção (por exemplo, células).

[00128] Todas as publicações e patentes mencionadas neste documento são incorporadas por referência na sua totalidade, como se cada publicação individual, ou patente fosse especificamente e individualmente

indicada para ser incorporada por referência. Em caso de conflito, o presente pedido, incluindo quaisquer definições contidas neste documento, prevalecerá. No entanto, a menção de qualquer referência, artigo, publicação, patente, publicação de patentes e pedido de patente citado neste documento não é e não deve ser tomado como reconhecimento ou qualquer forma de sugestão de que eles constituem uma técnica anterior válida ou fazem parte do conhecimento geral comum em qualquer país do mundo.

[00129] Os títulos das seções usados neste documento são para fins organizacionais apenas e não devem ser interpretados como limitadores do objeto descrito.

[00130] A invenção será descrita adicionalmente nos exemplos a seguir, os quais não limitam o escopo da invenção descrito nas reivindicações.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Linhagem Celular de Empacotamento HATSE-293

[00131] Uma linhagem celular de empacotamento para gerar partículas lentivirais capazes de ativar e transduzir de forma eficiente células T, denominada HATSE-293, foi gerada como segue. Um vetor lentiviral foi construído compreendendo o promotor MND e uma estrutura de leitura aberta multicistrônica ligada ao peptídeo 2A que codifica um fragmento Fv de cadeia única anti-CD3 (scFv) do anticorpo monoclonal OKT3; CD86; e CD137L (anti-CD3scFV-**2A**-CD86-**2A**-CD137L). O vetor lentiviral foi transduzido em células HEK-293T cultivadas em cultura de células, resultando em integração estável do promotor MND e estrutura de leitura aberta multicistrônico no genoma das células hospedeiras. As células HEK-293T transduzidas foram submetidas à separação de células ativadas por fluorescência (FACS) para células que expressaram altamente CD86 e CD137L (**FIG. 2**). Devido à estrutura da estrutura de leitura aberta multicistrônica, as células CD86⁺/CD137L⁺ também expressam necessariamente o anti-CD3 scFv⁺. A população de células CD86⁺/CD137L⁺ foi expandida em cultura para produzir a linhagem celular de empacotamento HATSE-293 e alíquotas foram congeladas para armazenamento e uso de longo prazo. A expressão de CD86 e CD137 foi confirmada por citometria de fluxo (**FIG. 3**).

[00132] As células HATSE-293 foram co-transfectadas com o vetor lentiviral pMND-GFP e quatro plasmídeos de empacotamento lentiviral (pMD2.G, pRSV-rev, pMDLG-pRRE e pRRL-GOI), e as partículas virais foram colhidas do sobrenadante celular para produzir partículas lentivirais (denominadas partículas HATSE). Como um controle, as células HEK-293T foram co-transfectadas com o vetor lentiviral pMND-GFP e quatro plasmídeos de empacotamento lentiviral (pMD2.G, pRSV-rev, pMDLG-pRRE e pRRL-GOI), e as partículas virais foram colhidas do sobrenadante da célula para produzir partículas lentivirais (partículas de controle 293T).

[00133] Células T primárias humanas ($2,5 \times 10^5$ células) foram expostas a partículas HATSE ou partículas 293T, em MOI5 ou MOI 20, em duplicata, na presença ou ausência de estímulo de ativação de células T exógenas (Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 - “stimbeads”). O crescimento das células foi avaliado ao longo de 7 dias por um contador de células automatizado (Countess™ II, Thermo Fisher) (**FIG. 3**). O crescimento de células expostas a partículas HATSE foi semelhante às células T estimuladas por grânulos transduzidas com partículas de controle e foi aproximadamente duas vezes maior em 7 dias do que as partículas de controle 293T. A expressão de GFP foi avaliada por microscopia de fluorescência (**FIG. 4**). As células expostas a partículas de HATSE exibem explosão e alta expressão de GFP semelhante a células T estimuladas por grânulos transduzidas com partículas de controle, confirmando a transdução eficiente das células T expostas a partículas de HATSE, apesar da falta de exposição a um estímulo de ativação de células T heterólogas (*ou seja*, os grânulos estimulantes).

Exemplo 2: Lenti-RACCR

[00134] Lenti-RACCR é um vetor lentiviral que contém um transgene que codifica um receptor de superfície celular quimérico ativado por rapamicina (RACCR). Especificamente, este RACCR exemplificativo é feito de duas proteínas de fusão que são projetadas para dimerizar na presença de rapamicina, ativando assim a sinalização (FIG. 12A). A primeira proteína de fusão é o resultado da fusão do domínio citoplasmático da cadeia beta do receptor de IL-2 (IL2Rb) à proteína de ligação FK506 (FKBP) de modo que FKBP forme o domínio

extracelular da proteína de fusão. A segunda proteína de fusão é o resultado da fusão do domínio citoplasmático da cadeia gama do receptor de IL-2 (IL2Rg) com o domínio de ligação à rapamicina de FKBP (FRB) do alvo mamífero da rapamicina (mTOR) de modo que a FRB forme o domínio extracelular da proteína de fusão. Os domínios extracelulares são conhecidos por formar um complexo trimérico na presença de rapamicina, resultando na dimerização das subunidades do receptor para formar um complexo receptor de sinalização ativa.

[00135] Proteína de fusão (RACCR-beta – FKBP-IL2Rb com peptídeo sinal (entre parênteses) com peptídeo 2A (em itálico):

(MALPVTALLLPLALLLHAARP)ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMF
EVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEWCRKYMKSGNVKDLLQA
WDLYYHVFRISK**GKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFILVYLLINCRNTGPWLKKVL**
KCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERD
KVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYD
PYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGP
SPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTPGVPDLVDFQPPPE
LVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQEL
QGQDPTHLV*GSGATNFSLLKQAGDVEENPG*

(SEQ ID NO: 12).

[00136] O domínio FKBP tem a seguinte sequência:

EMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ
AYGRDLMEAEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISK

(SEQ ID NO:13).

[00137] O domínio IL2Rb tem a seguinte sequência:

GKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPS
KFFSQLSSEHGGDVQKWLSSFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQ
DKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDE
GVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPSTAPGG
SGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEE
VPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV

(SEQ ID NO:14)

[00138] Proteína de fusão RACCR-gama – FRB-IL2Rg com peptídeo

sinal (entre parênteses) com peptídeo 2A (em itálico)

(MPLGLLWLGLALLGALHAQA)GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTG
MLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYA
YGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGE**GSNTSKENPFLFALEAVVISVGS****MGLIISL**
LCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERL
CLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET*GSGATNFSLLKQA*
GDVEENPG

(SEQ ID NO: 15).

[00139] O domínio FRB tem a seguinte sequência:

GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFM
LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELL
KLGE

(SEQ ID NO:16).

[00140] O domínio IL2Rg tem a seguinte sequência:

GSNTSKENPFLFALEAVVISVGS**MGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLE**
DLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERL**CLVSEIPPKGGALGEGPGASP**
CNQHSPYWAPPCYTLKPET

(SEQ ID NO:17).

[00141] Um plasmídeo de transferência lentiviral que codifica a proteína fluorescente verde é empacotado em partículas lentivirais usando o plasmídeo de empacotamento padrão pMD2.G, e as partículas lentivirais resultantes são usadas para transduzir células T primárias humanas como um experimento de controle. Apenas a transdução de baixo nível é observada (FIG. 12B).

[00142] Um plasmídeo de transferência lentiviral que codifica mCherry é empacotado em partículas lentivirais usando um plasmídeo que codifica a ativação de células T e moléculas coestimuladoras, gerando assim uma partícula lentiviral com superfície modificada (SE-LVP). As partículas lentivirais resultantes (mCherry:SE-LVP) são usadas para transduzir células T primárias humanas como um experimento de controle. A transdução de alto nível é observada (FIG. 12C).

[00143] Um plasmídeo de transferência lentiviral que codifica RACCR é empacotado em partículas lentivirais usando um plasmídeo que codifica a

ativação de células T e moléculas coestimuladoras, gerando assim uma partícula lentiviral com superfície modificada (SE-LVP). As partículas lentivirais resultantes (RACCR:SE-LVP) são usadas para transduzir células T primárias humanas. A transdução de alto nível é observada (FIG. 12D).

[00144] Células T primárias humanas transduzidas com mCherry:SE-LVP ou RACCR:SE-LVP são cultivadas na presença de IL-2 ("IL2"), rapamicina ("rapa") ou nenhum tratamento ("NT"). Como um controle, o construto mCherry empacotado usando o plasmídeo de empacotamento padrão pMD2.G também é testado com IL-2. RACCR:SE-LVP medeia a expansão sustentada de células T ao longo de 18 dias na presença de rapamicina, mas sem IL-2 exógena (FIG. 12E). A expansão das células T depende da presença de rapamicina ou IL-2 (FIG. 12F). Isso constitui uma prova de conceito *in vitro* de que as partículas com superfície modificada podem fornecer uma carga útil do receptor estimulador do crescimento e expandir as células T humanas primárias. Nenhuma espinoculação ou outras manipulações das partículas lentivirais são necessárias para a transdução. A transdução de células em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10 forneceu aproximadamente 20% de eficiência de transdução.

[0100] Aqueles versados na técnica reconhecerão ou serão capazes de verificar o uso de não mais do que a experimentação de rotina e de muitos equivalentes para as modalidades específicas da invenção descritas neste documento. Pretende-se abranger tais equivalentes pelas seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Partícula lentiviral para ativação e transdução eficiente de células T, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor de ativação de células T/células NK controláveis por molécula pequena, em que a sequência de ácido nucleico está operacionalmente ligada a um promotor, em que o receptor de ativação de células T/células NK é capaz de ser ativado por uma molécula pequena.

2. Partícula lentiviral, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a partícula lentiviral é uma partícula lentiviral com superfície modificada compreendendo uma molécula de coestimulação ou de ativação de células T.

3. Partícula lentiviral, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de coestimulação ou de ativação de células T compreende um ou mais dentre um anticorpo anti-CD3, ligante de CD28 e ligante de 41bb.

4. Partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizada** pelo fato de que o receptor de ativação de células T/células NK compreende um domínio de sinalização selecionado do grupo que consiste em (i) um domínio de sinalização do receptor de citocina, (ii) um domínio de sinalização do receptor coestimulador, (iii) um domínio de sinalização de subunidade do receptor de células T, (iv) um domínio de sinalização de subunidade do receptor de células NK e (v) um domínio de sinalização do receptor do fator de crescimento.

5. Partícula lentiviral, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de sinalização compreende um domínio de sinalização do receptor de citocina de uma cadeia gama do receptor de citocina comum.

6. Partícula lentiviral, de acordo com a reivindicação 4 ou reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de sinalização compreende um domínio de sinalização do receptor de citocina de uma cadeia beta do receptor de citocina comum.

7. Partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 4 a 6, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de sinalização compreende um ITAM.

8. Partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 4 a 7, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de sinalização compreende uma tirosina capaz de se ligar a um domínio SH2 quando a tirosina for fosforilada.

9. Partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, **caracterizada** pelo fato de que o receptor de ativação de células T/células NK compreende a proteína de ligação a FK506 (FKPB) ou um homólogo funcional desta.

10. Partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, **caracterizada** pelo fato de que o receptor de ativação de células T/células NK compreende a proteína de ligação de FKBP12-rapamicina (FRB) ou um homólogo funcional desta.

11. Partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, **caracterizada** pelo fato de que a partícula lentiviral compreende ainda uma sequência de ácido nucleico que codifica um ligante de inibição de checkpoint.

12. Partícula lentiviral, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada** pelo fato de que o ligante de inibição de checkpoint é capaz de bloquear o checkpoint PD-1/PD-L1.

13. Partícula lentiviral, de acordo com a reivindicação 11 ou reivindicação 12, **caracterizada** pelo fato de que o ligante de inibição do checkpoint é capaz de bloquear o checkpoint Tim-3.

14. Partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína que fornece resistência a uma droga imunossupressora.

15. Partícula lentiviral, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada** pelo fato de que a droga imunossupressora é selecionada do grupo que consiste em metotrexato, rapamicina, um rapalog, tacrolimo e ciclosporina.

16. Partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda uma sequência de ácido nucleico que codifica um peptídeo 2A.

17. Partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 16, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda uma sequência de ácido nucleico wPRE.

18. Partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 17, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor inibitório negativo dominante TGFbeta.

19. Partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 18, **caracterizada** pelo fato de que o promotor é selecionado do grupo que consiste em um promotor MND, um promotor específico de células T, um promotor específico de células T CD4, um promotor específico de células T CD8, um promotor específico de células NK, um promotor específico de células T e células NK, um promotor específico de células T CD4 e células NK e um promotor específico de células T CD8 e células NK.

20. Partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 19, **caracterizada** pelo fato de que a sequência do promotor é pelo menos 90% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1-4.

21. Método para tratar um sujeito que sofre de câncer, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a) administrar uma partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 20, ao sujeito, e

b) administrar a molécula pequena ao sujeito, em que o câncer é tratado no sujeito.

22. Método para expandir células T capazes de reconhecer e matar células tumorais em um sujeito em necessidade, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

i) administrar uma partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 20, ao sujeito, e

b) administrar a molécula pequena ao sujeito, em que as células T capazes de reconhecer e matar células tumorais no sujeito são expandidas.

23. Método, de acordo com a reivindicação 21 ou reivindicação 22, **caracterizado** pelo fato de que a partícula lentiviral é administrada por injeção intravenosa.

24. Método, de acordo com a reivindicação 21 ou reivindicação 22, **caracterizado** pelo fato de que a partícula lentiviral é administrada por injeção intratumoral.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 24, **caracterizado** pelo fato de que a molécula pequena é administrada por injeção

intravenosa.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 24, **caracterizado** pelo fato de que a molécula pequena é administrada por via oral.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 26, **caracterizado** pelo fato de que a molécula pequena é administrada em concentrações suficientes para ativar o receptor de ativação de células T/células NK.

28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 27, **caracterizado** pelo fato de que a molécula pequena é rapamicina.

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado** pelo fato de que a rapamicina é administrada em concentrações suficientes para manter as concentrações séricas de rapamicina maiores que 0,1 nM, 1 nM ou 10 nM.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 27, **caracterizado** pelo fato de que a molécula pequena é um rapalog.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, **caracterizado** pelo fato de que o rapalog é administrado em concentrações suficientes para manter as concentrações séricas de rapalog maiores que 0,1 nM, 1 nM ou 10 nM.

32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 31, **caracterizado** pelo fato de que a molécula pequena causa a dimerização do receptor de ativação de células T/células NK, resultando em um sinal de ativação celular.

33. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 32, **caracterizado** pelo fato de que

i) a molécula pequena é administrada simultaneamente com a partícula lentiviral; ou

ii) a molécula pequena é administrada cerca de 30 minutos, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas ou cerca de 10 horas antes ou depois da partícula lentiviral ser administrada.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 33, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda administrar um agente imunossupressor ao sujeito.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, **caracterizado** pelo fato de que o agente imunossupressor é tacrolimo.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizado** pelo fato de que o tacrolimo é administrado em concentrações suficientes para manter as concentrações séricas de tacrolimo maiores que 0,1 nM, 1 nM ou 10 nM.

37. Método, de acordo com a reivindicação 34, **caracterizado** pelo fato de que o agente imunossupressor é a ciclosporina.

38. Método, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que a ciclosporina é administrada em concentrações suficientes para manter as concentrações séricas de ciclosporina maiores que 0,1 nM, 1 nM ou 10 nM.

39. Ácido nucleico **caracterizado** pelo fato de que compreende um promotor específico para células T, células NK ou células T e células NK, em que a sequência de ácido nucleico é pelo menos 90% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1-4.

40. Linhagem celular de empacotamento para gerar partículas lentivirais capazes de ativar e transduzir eficientemente células T, **caracterizada** pelo fato de que compreende células cultivadas capazes de empacotar um vetor de lentivírus, em que as células cultivadas são geneticamente manipuladas para expressar uma molécula de coestimulação ou de ativação de células T.

41. Linhagem celular de empacotamento, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de coestimulação e de ativação de células T é selecionada do grupo que consiste em um anticorpo anti-CD3, ligante de CD28 e ligante de 41bb.

42. Linhagem celular de empacotamento, de acordo com a reivindicação 40 ou 41, **caracterizada** pelo fato de que a linhagem celular de empacotamento é uma linhagem de células HEK-293T.

43. Linhagem celular de empacotamento, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 40 a 42, **caracterizada** pelo fato de que a linhagem celular de empacotamento é geneticamente modificada para não ter a expressão de MHC de classe I.

44. Linhagem celular de empacotamento, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 40 a 43, **caracterizada** pelo fato de que a linhagem celular de empacotamento é geneticamente modificada para não ter a expressão de MHC de classe II.

45. Linhagem celular de empacotamento, de acordo com qualquer uma das

reivindicações de 40 a 44, **caracterizada** pelo fato de que a linhagem celular de empacotamento é geneticamente modificada para não expressar um ligante do receptor inibitório.

46. Linhagem celular de empacotamento, de acordo com a reivindicação 45, **caracterizada** pelo fato de que o ligante do receptor inibitório é o ligante PD-L1 ou ligante de Tim3.

47. Vetor de ácido nucleico **caracterizado** pelo fato de que compreende um promotor específico de células T e/ou células NK operacionalmente ligado a uma sequência de ácido nucleico que codifica o receptor de ativação de células T/células NK, em que o receptor de ativação de células T/células NK é capaz de ser ativado por uma molécula pequena.

48. Vetor de ácido nucleico **caracterizado** pelo fato de que compreende um promotor forte operacionalmente ligado a uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor de ativação de células T/células NK, em que o receptor de ativação de células T/células NK é capaz de ser ativado por uma molécula pequena.

49. Vetor de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que o promotor é selecionado do grupo que consiste em um promotor MND, um promotor específico de células T, um promotor específico de células T CD4, um promotor específico de células T CD8, um promotor específico de células NK, um promotor específico de células T e células NK, um promotor específico de células T CD4 e células NK e um promotor específico de células T CD8 e células NK.

50. Vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 47 a 49, **caracterizada** pelo fato de que a sequência do promotor é pelo menos 90% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1-4.

51. Vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 47 a 50, **caracterizado** pelo fato de que o receptor de ativação de células T/células NK compreende um domínio de sinalização selecionado do grupo que consiste em um domínio de sinalização do receptor de citocina, um domínio de sinalização do receptor coestimulador, um domínio de sinalização da subunidade do receptor de células T, um domínio de sinalização da subunidade do receptor de células NK e um domínio de sinalização do receptor do fator de crescimento.

52. Vetor de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 51, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de sinalização compreende um domínio de sinalização do receptor de citocina de uma cadeia gama do receptor de citocina comum.

53. Vetor de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 51 ou reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de sinalização compreende um domínio de sinalização do receptor de citocina de uma cadeia beta do receptor de citocina comum.

54. Vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 51 a 53, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de sinalização compreende um ITAM.

55. Vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 51 a 54, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de sinalização compreende uma tirosina capaz de se ligar a um domínio SH2 quando a tirosina for fosforilada.

56. Vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 47 a 55, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda uma sequência de ácido nucleico que codifica um ligante de inibição de checkpoint.

57. Vetor de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 56, **caracterizado** pelo fato de que o ligante de inibição de checkpoint é capaz de bloquear o checkpoint PD-1/PD-L1.

58. Vetor de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 56, **caracterizado** pelo fato de que o ligante de inibição de checkpoint é capaz de bloquear o checkpoint Tim-3.

59. Vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 47 a 58, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína que fornece resistência a uma droga imunossupressora.

60. Vetor de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 59, **caracterizado** pelo fato de que a droga imunossupressora é selecionada do grupo que consiste em metotrexato, rapamicina, um rapalog, tacrolimo e ciclosporina.

61. Vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 47 a 60, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda uma ou mais sequências de ácido nucleico que codificam uma ou ambas dentre proteína de

ligação a FK506 (FKPB) ou um homólogo funcional desta e proteína de ligação de FKBP12-rapamicina (FRB) ou um homólogo funcional desta.

62. Vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 47 a 61, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda uma sequência de ácido nucleico que codifica um peptídeo 2A.

63. Vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 47 a 62, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda uma sequência de ácido nucleico wPRE.

64. Vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 47 a 62, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor inibitório negativo dominante TGFbeta.

65. Vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 47 a 63, **caracterizado** pelo fato de que o vetor de ácido nucleico é um vetor lentiviral.

66. Vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 47 a 64, **caracterizado** pelo fato de que o vetor de ácido nucleico é um vetor do vírus adeno-associado (AAV).

67. Vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 47 a 64, **caracterizado** pelo fato de que o vetor de ácido nucleico é um vetor de adenovírus.

68. Vetor de ácido nucleico **caracterizado** pelo fato de que compreende uma sequência pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 99% idêntica a uma sequência selecionada das SEQ ID NOs: 6-11.

69. Partícula lentiviral **caracterizada** pelo fato de que é produzida pela transfecção de uma linhagem celular de empacotamento com o vetor de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 67.

70. Partícula lentiviral, de acordo com a reivindicação 68, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda uma molécula de coestimulação ou de ativação de células T.

71. Partícula lentiviral, de acordo com a reivindicação 69, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de coestimulação e de ativação de células T é selecionada do grupo que consiste em um anticorpo anti-CD3, ligante de CD28 e ligante de 41bb.

72. Partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 20 ou de 68 a 70, método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 38, ou vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 47 a 67, **caracterizado** pelo fato de que o receptor de ativação de células T/células NK compreende:

(a) uma primeira cadeia compreendendo um ou ambos dentre: (i) um domínio de FKPB funcional que compartilha pelo menos 95%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 13, e (ii) um domínio de IL2Rb funcional que compartilha pelo menos 95%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 14; e/ou

(b) uma segunda cadeia compreendendo um ou ambos dentre: (i) um domínio de FRB funcional que compartilha pelo menos 95%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 16, e (ii) um domínio de IL2Rg funcional que compartilha pelo menos 95%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 17.

73. Partícula lentiviral, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 20 ou de 68 a 70, método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 38, ou vetor de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 47 a 67, **caracterizado** pelo fato de que o receptor de ativação de células T/células NK compreende:

(a) uma primeira cadeia compreendendo um domínio de FKPB funcional e um domínio de IL2Rb funcional, em que a primeira cadeia compartilha pelo menos 95%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 12; e/ou

(b) uma segunda cadeia compreendendo um domínio de FRB funcional e um domínio de IL2Rg funcional, em que a segunda cadeia compartilha pelo menos 95%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 15.

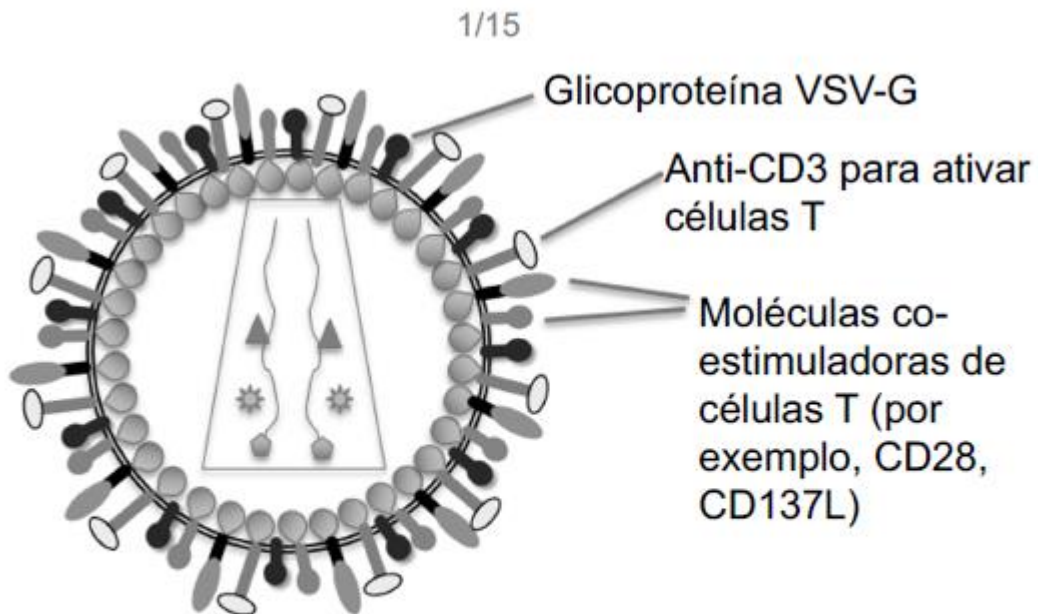


FIG. 1A

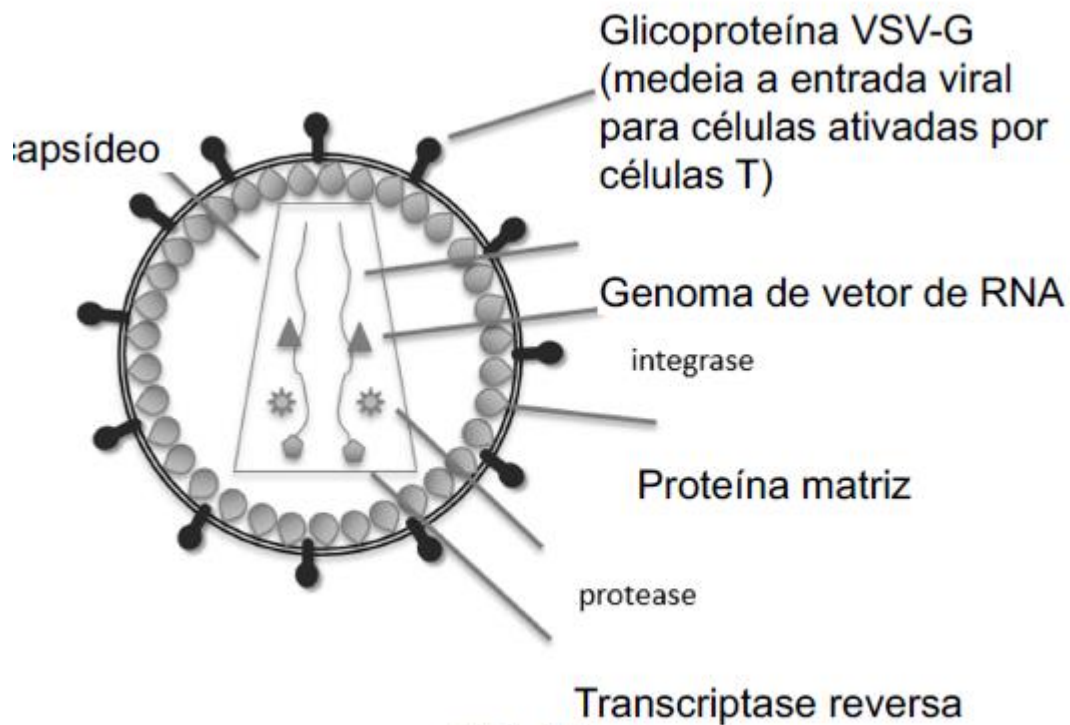


FIG. 1B

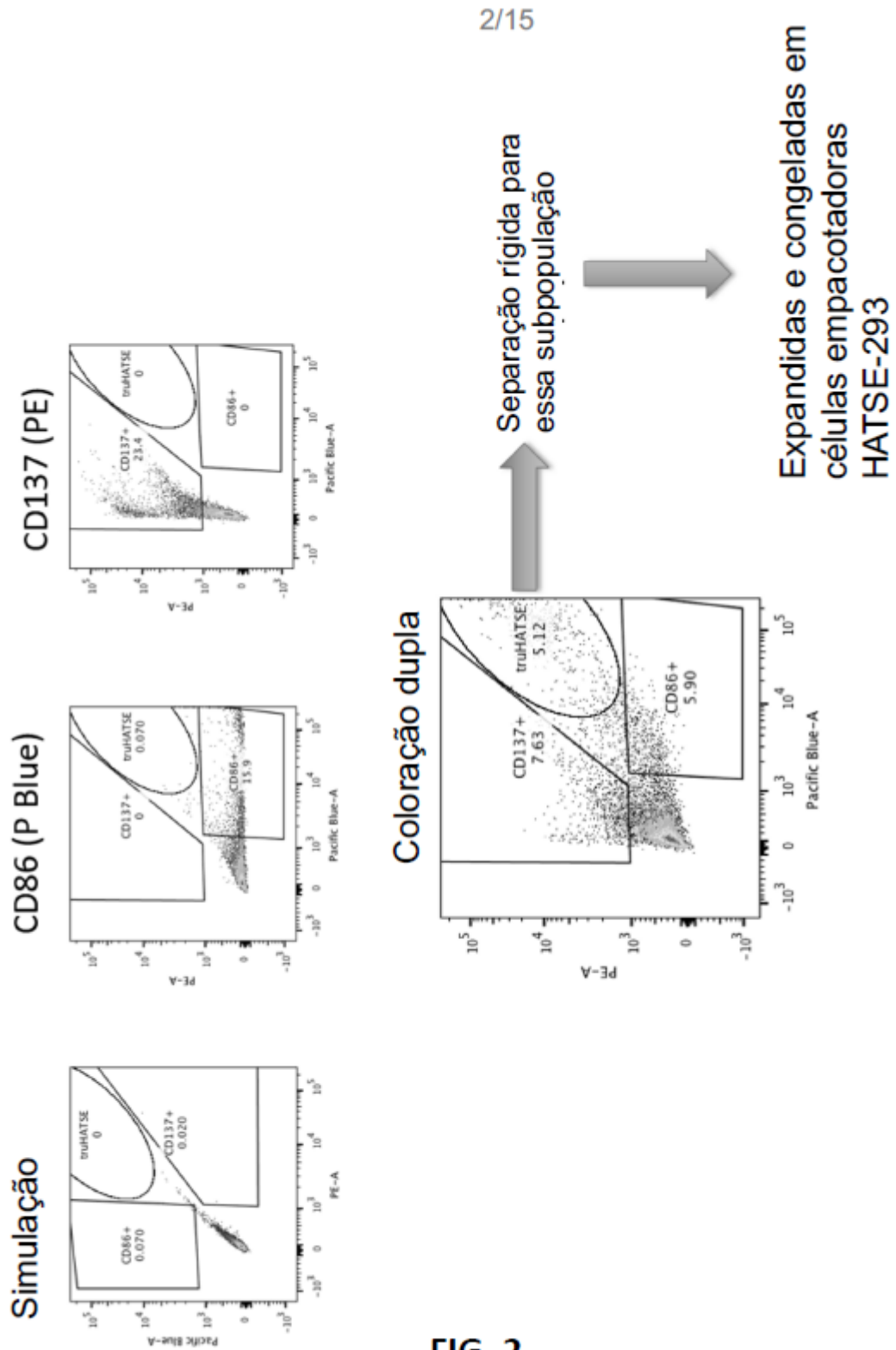


FIG. 2

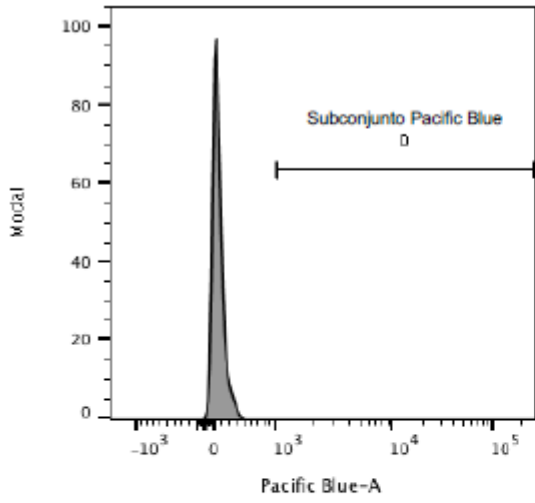


FIG. 3A

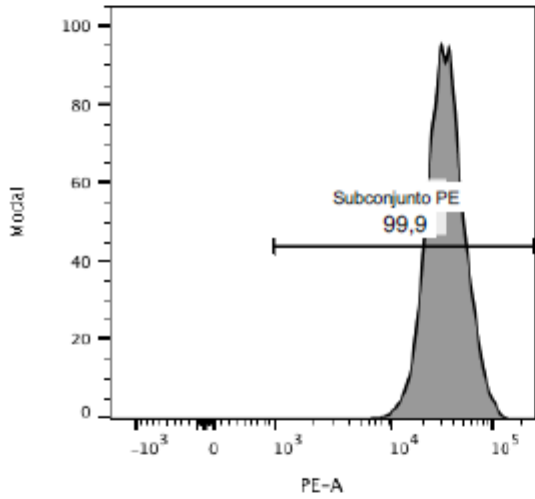


FIG. 3B

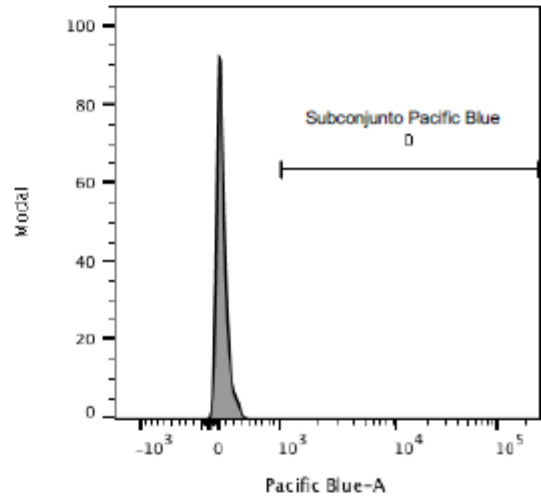


FIG. 3C

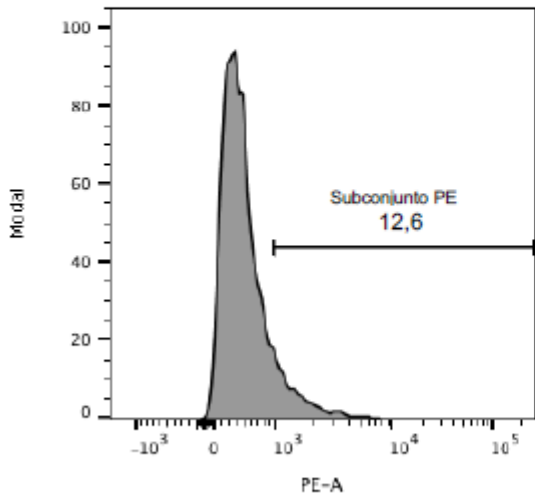


FIG. 3D

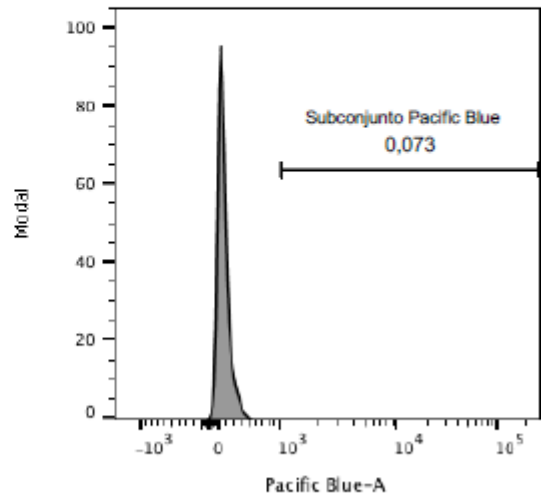


FIG. 3E

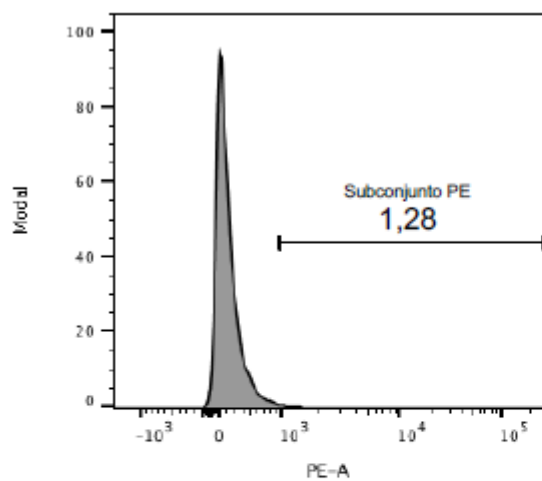


FIG. 3F

4/15

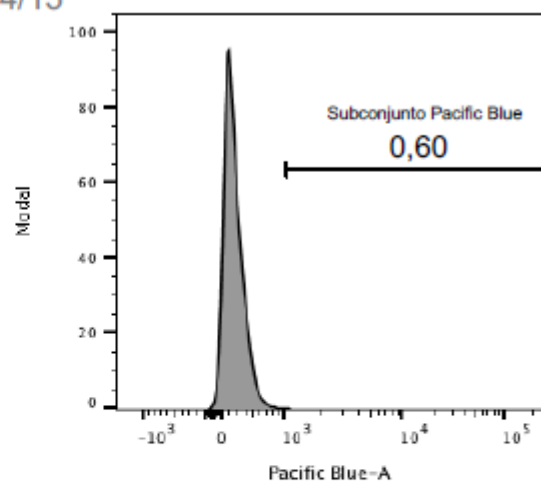


FIG. 3G

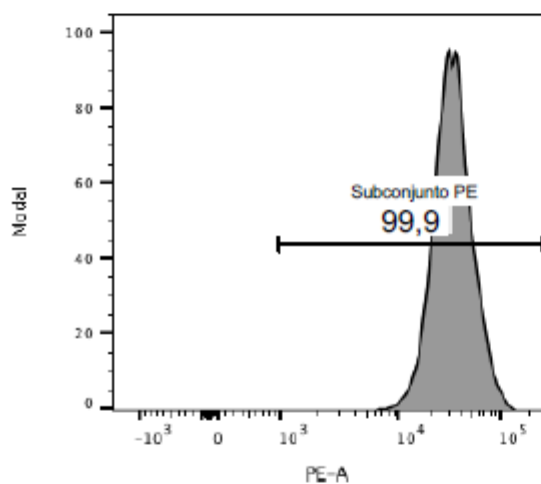


FIG. 3H

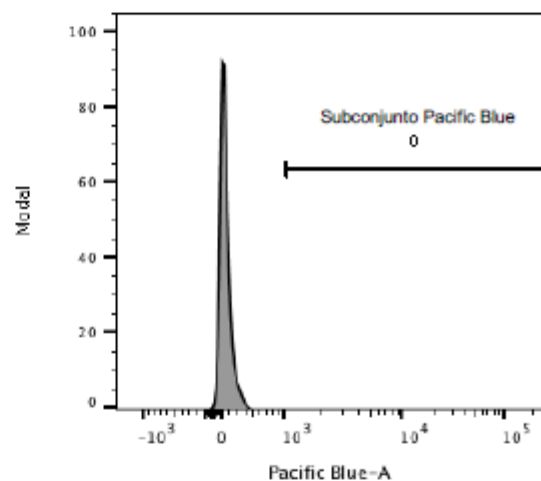


FIG. 3I

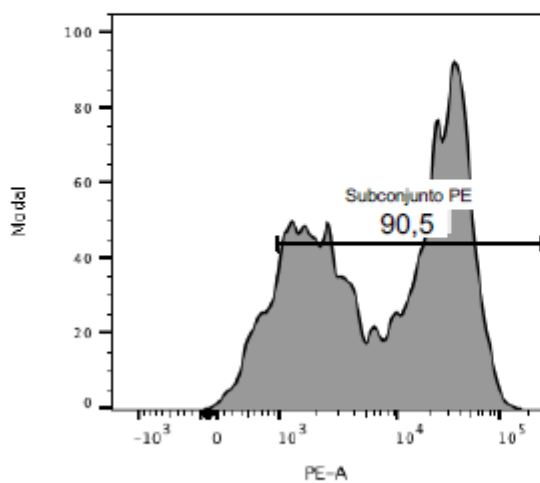


FIG. 3J

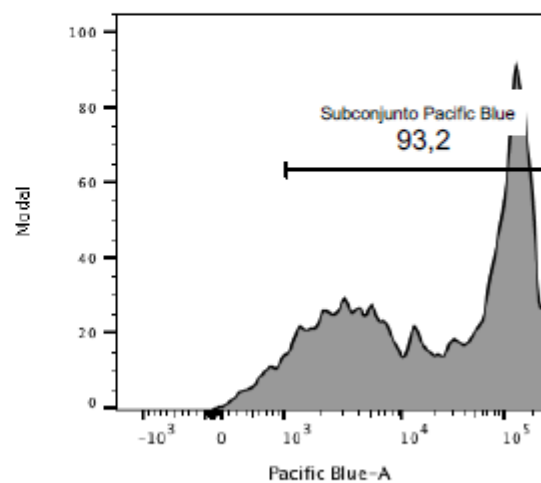


FIG. 3K

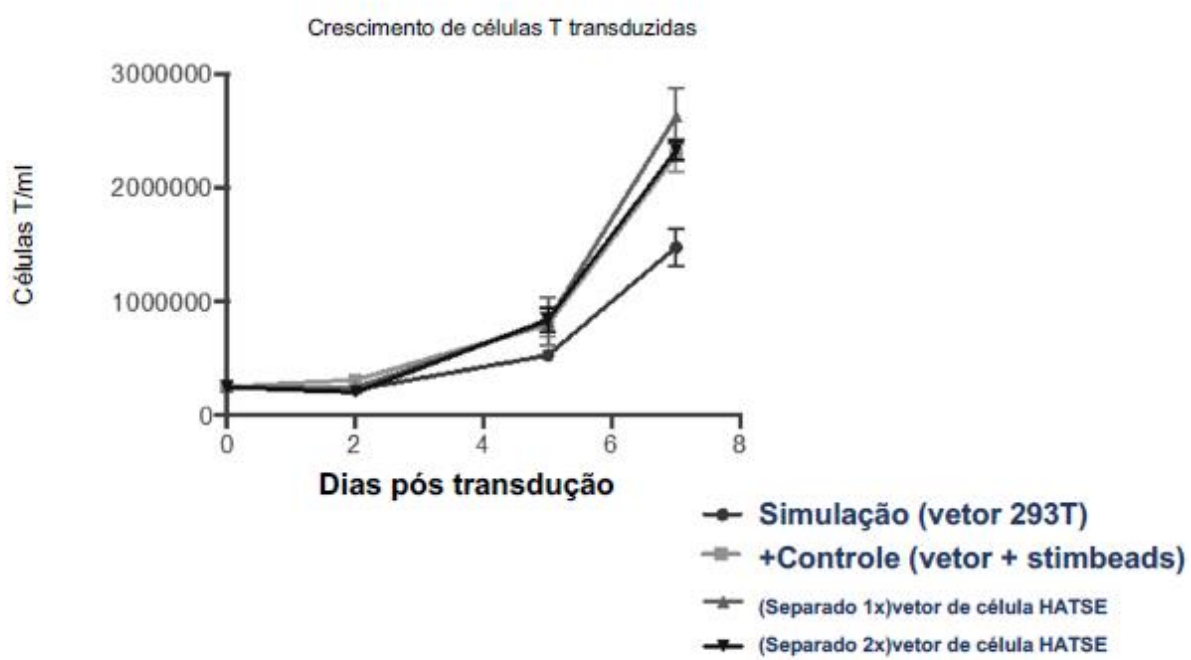
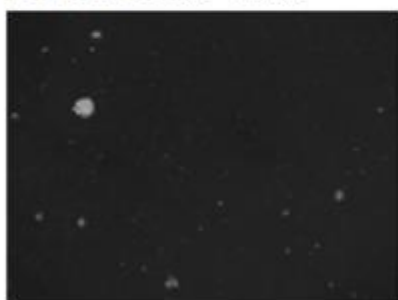
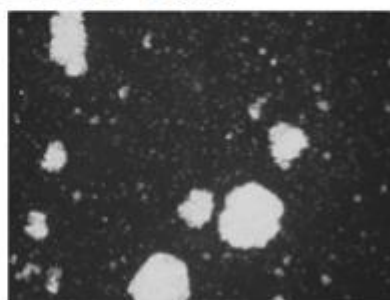


FIG. 4

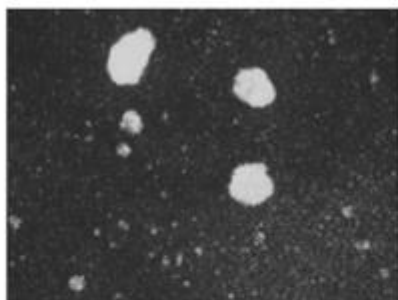
293T sem stim



293T stim



HATSE separado 1x
(sem stim)



HATSE separado 2x
(sem stim)

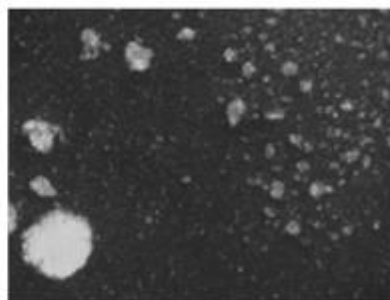


FIG. 5

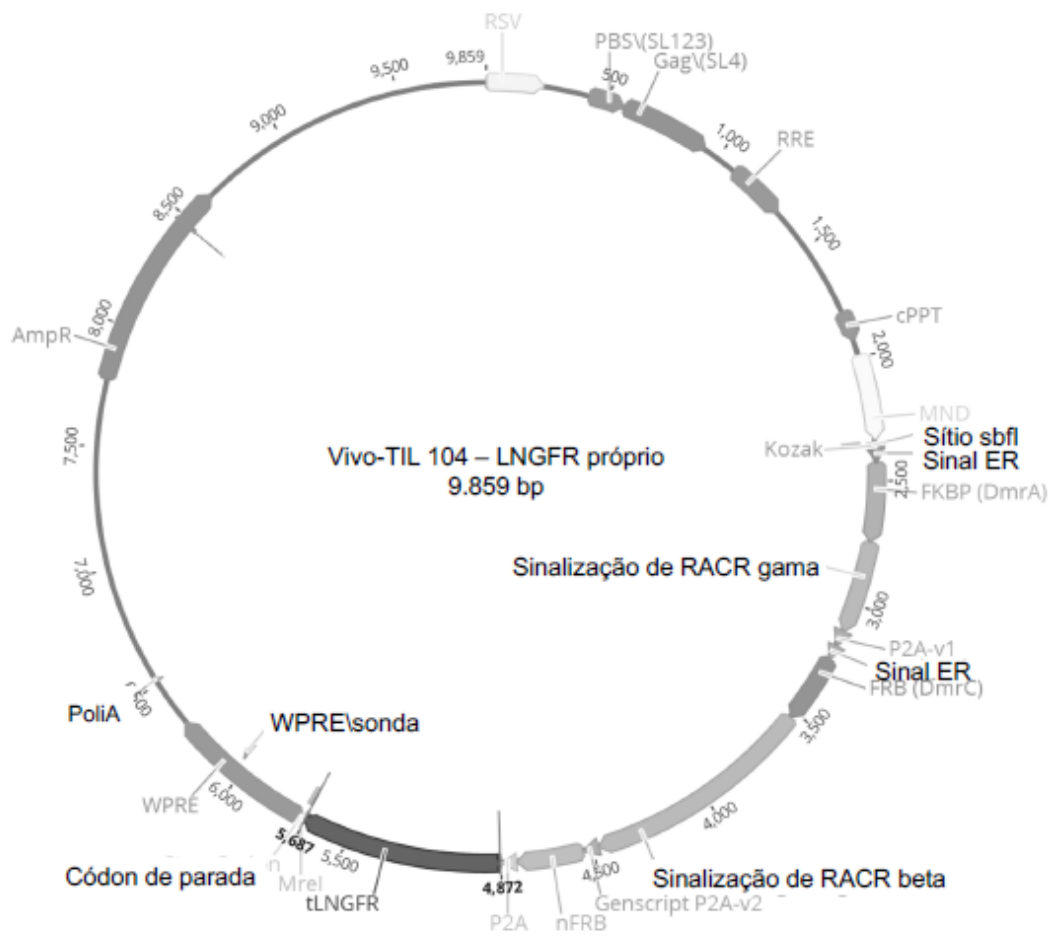


FIG. 6

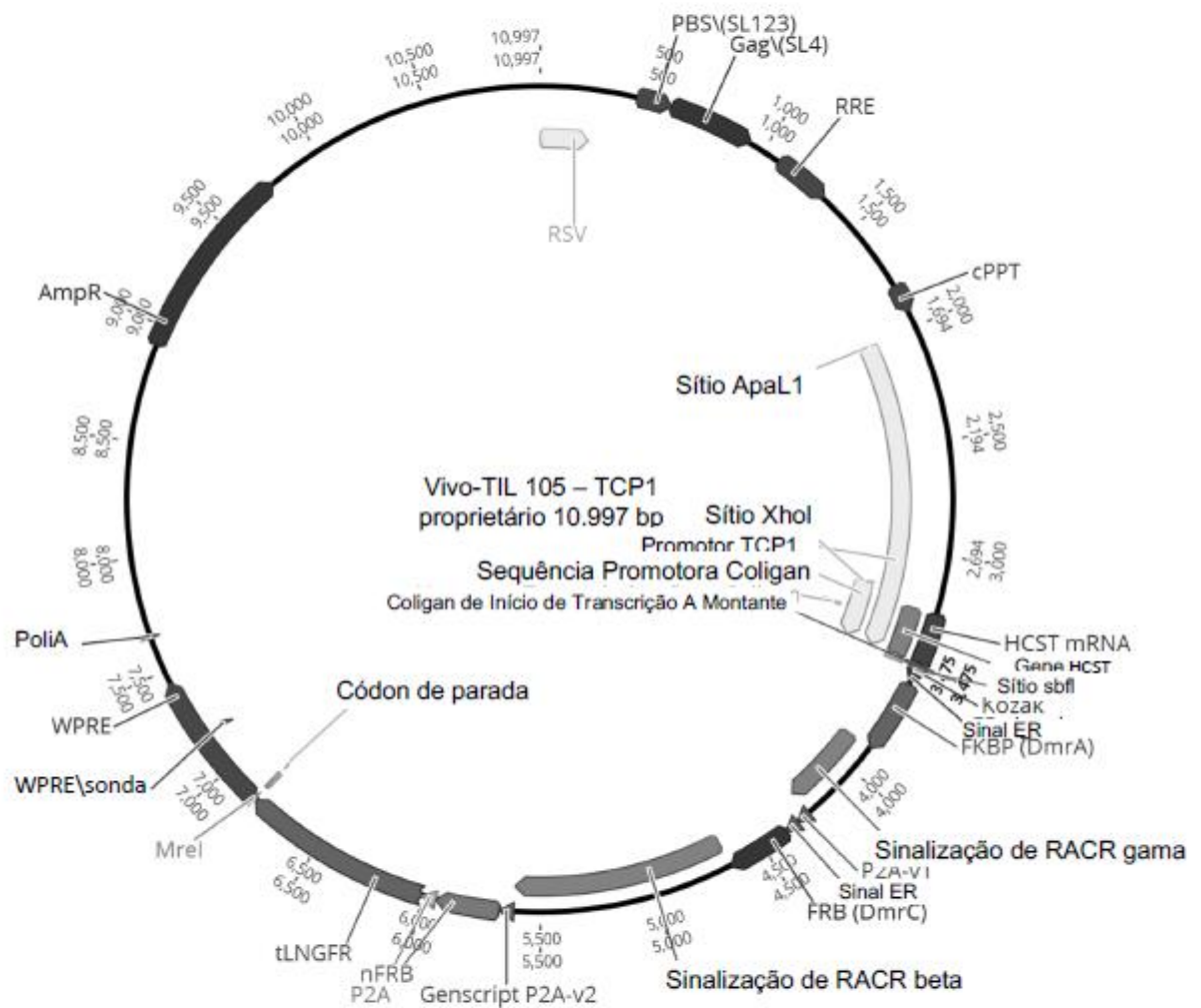


FIG. 7

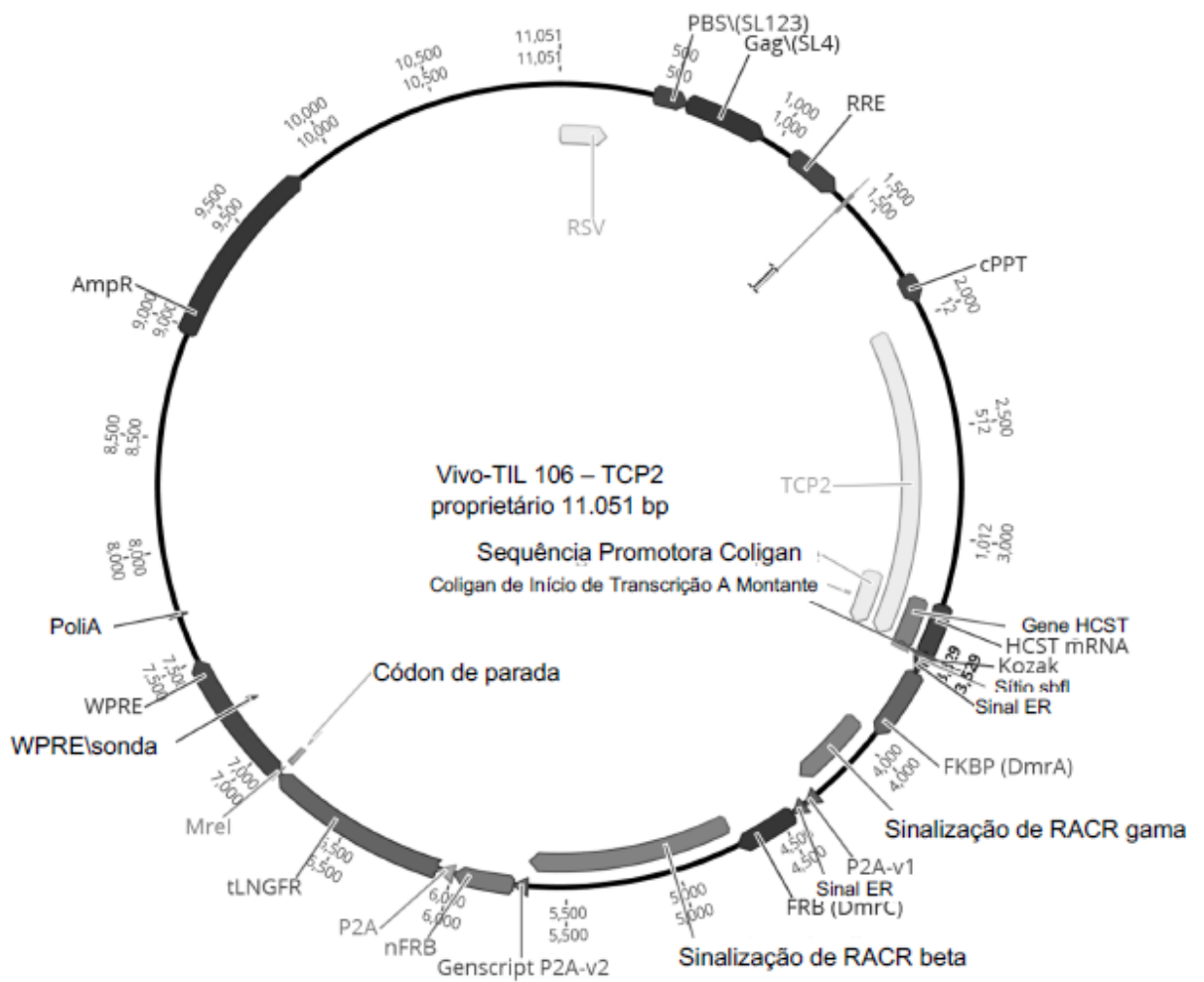


FIG. 8

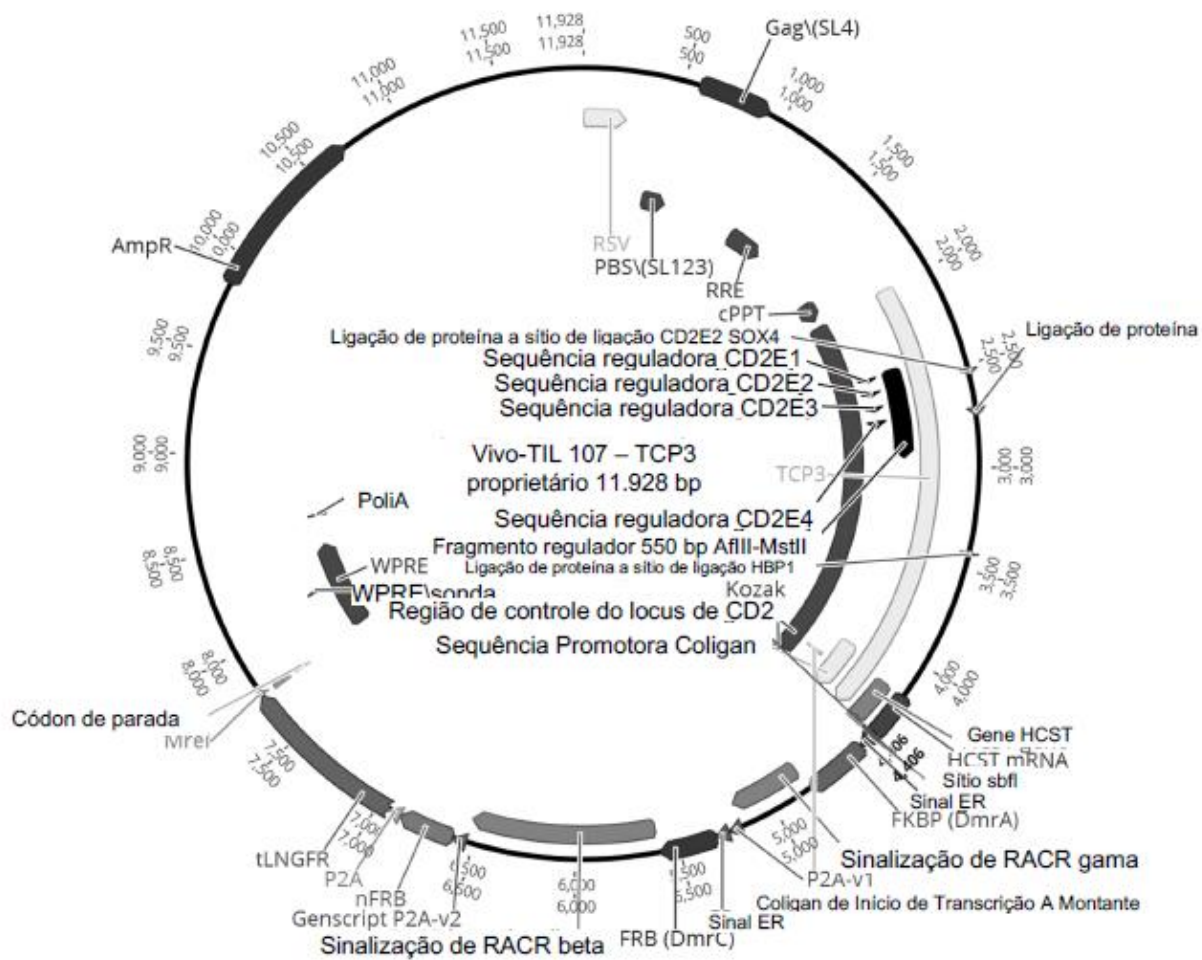


FIG. 9

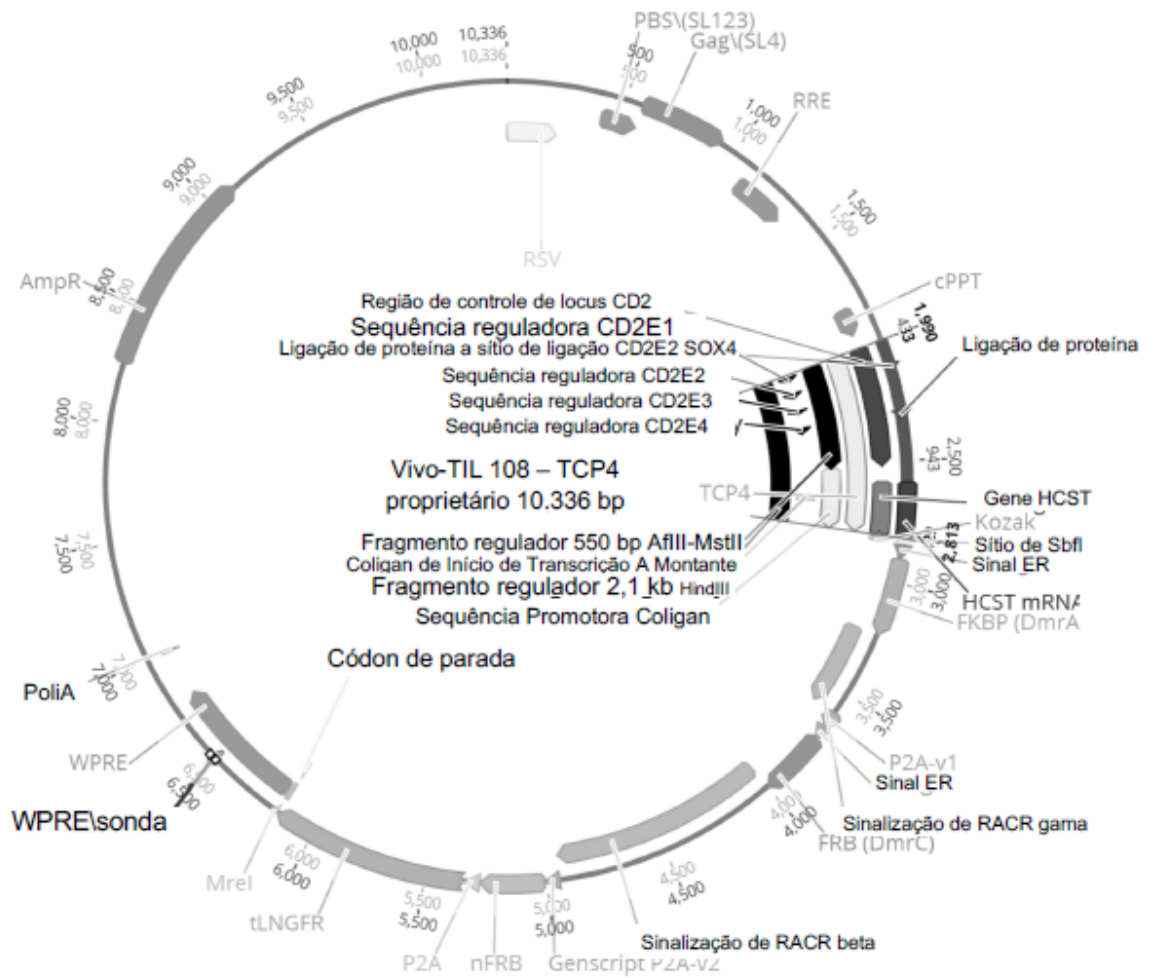


FIG. 10

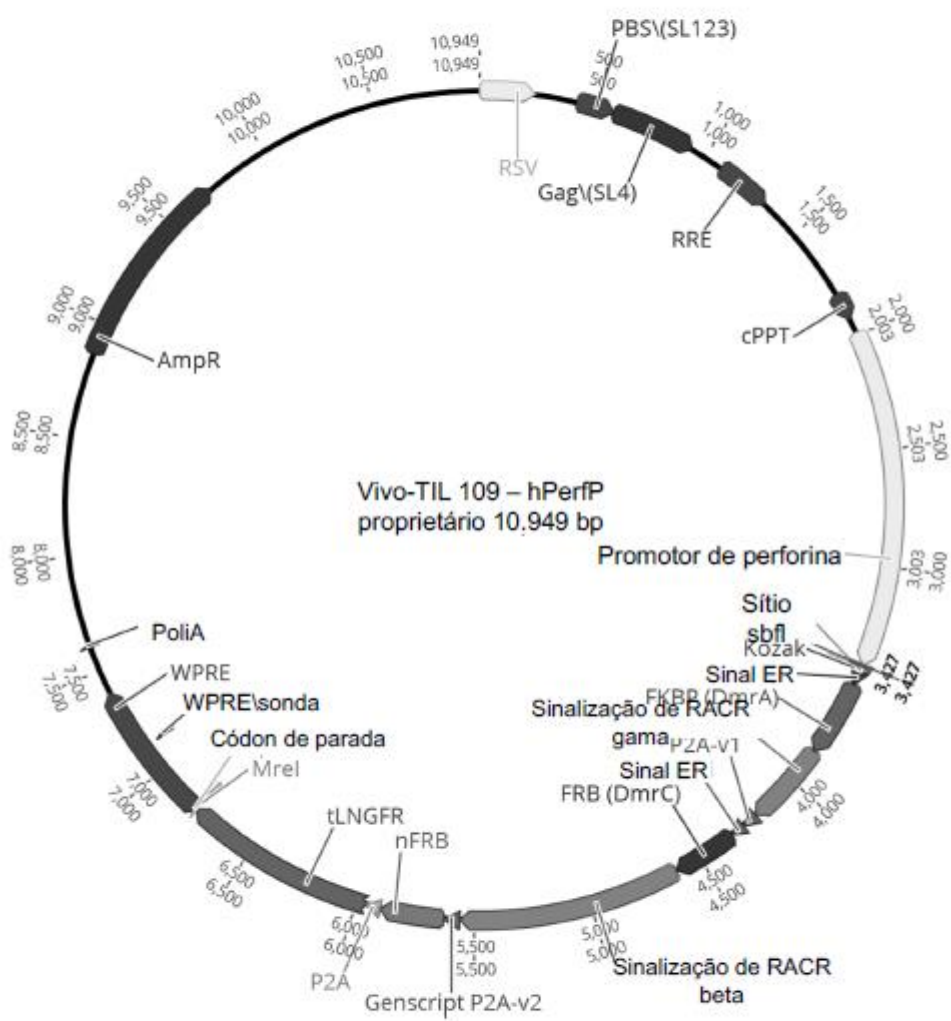


FIG. 11

Receptores IL2
quiméricos
RACCR

.....
Ligação de
ligante
.....

TM

.....
Transdução
de sinal de
.. citocina ..

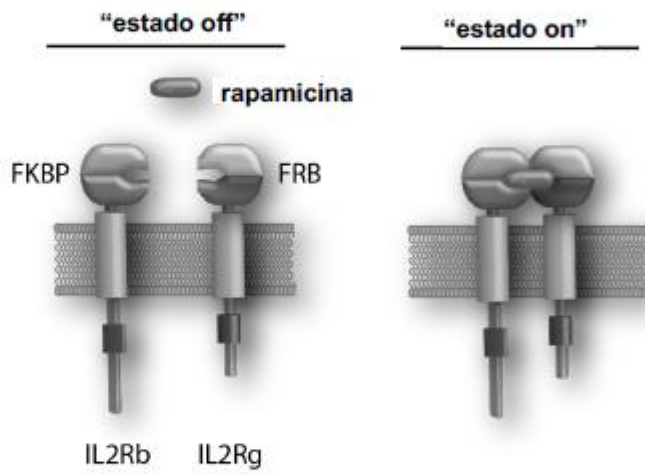


FIG. 12A

Carga útil: prom-GFP
Pacote: pMD2.G (padrão)

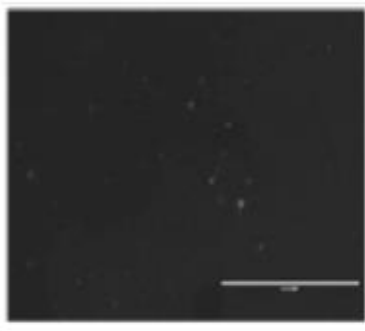


FIG. 12B

Carga útil: prom-Cherry
Pacote: pVT-SEC

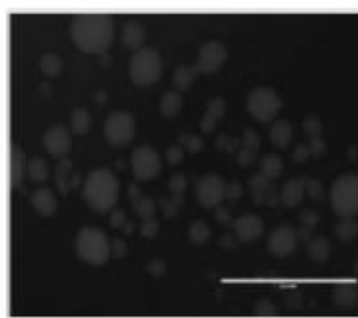


FIG. 12C

Carga útil: prom-RACCR
Pacote: pVT-SEC

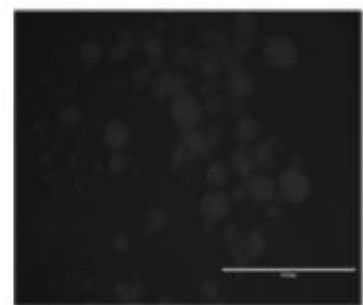


FIG. 12D

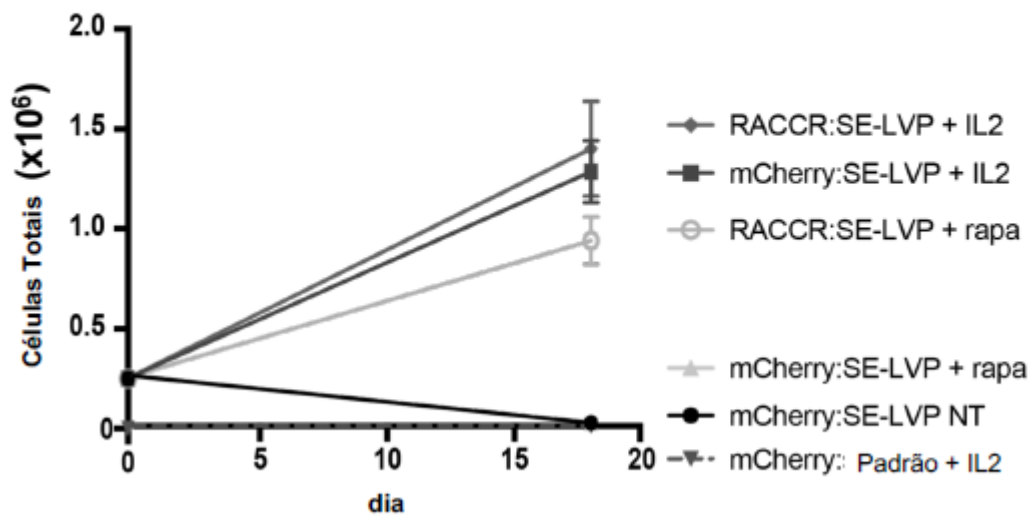


FIG. 12E

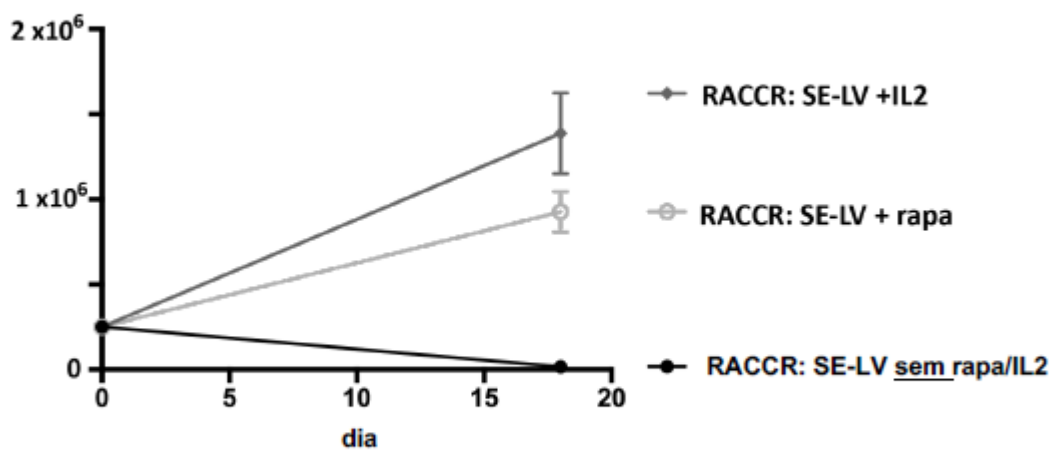


FIG. 12F

RESUMO

VETORES VIRAIS E LINHAGENS CELULARES DE EMPACOTAMENTO

A divulgação se refere, de modo geral, a vetores de ácido nucleico e linhagens celulares de empacotamento para expansão *in vivo* de células T. Mais particularmente, a divulgação se refere à injeção intratumoral direta de um vetor lentiviral adaptado para transdução e expansão mediada por drogas de linfócitos infiltrantes de tumor *in vivo*.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 202001317 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 08/12/2020
- Hora de Geração do Código: 17:46:23
- Código de Controle:
 - Campo 1: 65AF8CDA27300C9A
 - Campo 2: A41631CC90B7772F