



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

(21) BR 112020001132-0 A2



(22) Data do Depósito: 18/07/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 21/07/2020

(54) Título: INTERRUPTOR MODULÁVEL PARA SELEÇÃO DE CÉLULAS DOADORAS MODIFICADAS

(51) Int. Cl.: A61K 35/28; A61P 35/00; A61P 37/02.

(30) Prioridade Unionista: 18/07/2017 US 62/533,707.

(71) Depositante(es): CALIMMUNE, INC.; CALIMMUNE AUSTRALIA PTY LTD.

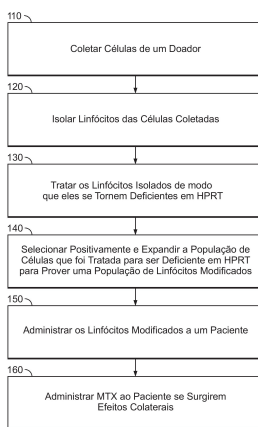
(72) Inventor(es): CHRISTOPHER WALTER ALMA; JEFFREY BARTLETT; LOUIS RANDALL BRETON; GEOFFREY PHILLIP SYMONDS; MING YAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2018042630 de 18/07/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/018491 de 24/01/2019

(85) Data da Fase Nacional: 17/01/2020

(57) Resumo: A invenção refere-se a métodos que são geralmente direcionados à prevenção, tratamento, supressão, controle ou de outro modo mitigação de efeitos colaterais de terapia de célula T, a terapia de célula T planejada para acelerar reconstituição imune, induzir um efeito de GVM e/ou se direcionar a células de tumor.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**INTERRUPTOR MODULÁVEL PARA SELEÇÃO DE CÉLULAS DOADORAS MODIFICADAS**”.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[1] O presente pedido reivindica o benefício da data de depósito do Pedido de Patente Provisório U.S. No. 62/533.707 depositado em 18 de julho de 2017, cuja descrição é aqui incorporada a título de referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[2] A presente invenção refere-se em geral aos campos de biologia molecular e, em particular, vetores e células hospedeiras transduzidas por vetores.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[3] Uso de um transplante de célula-tronco alogênico (alo-SCT) como uma opção terapêutica para doenças de outro modo letais está crescente continuamente. No entanto, doença enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) permanece uma grande complicação de alo-SCT, afetando até cerca de 40-60% de pacientes com alo-SCT. É acreditado que GVHD ocorra quando células imunocompetentes, a saber, linfócitos T, reconhecem antígenos de membrana nas células hospedeiras. Esses antígenos de membrana incluem um conjunto de polipeptídeos hospedeiros tais como antígenos de histocompatibilidade maior e menor exibidos pelo sistema de antígeno leucocitário humano. O polimorfismo desses polipeptídeos é acreditado disparar ativação de célula T e por fim lesão a tecido através de uma variedade de mecanismos celulares efetores. A ativação das células imunodadoras é aumentada também por citocinas liberadas do sítio de lesão a tecido associado com o regime de condicionamento intenso (“tempestade de citocina”).

[4] GVHD aguda (aGVHD) geralmente ocorre nos primeiros 100 dias após transplante, enquanto início de GVHD crônica (cGVHD)

é observado mais tarde. Mudanças no período de início de ambas as GVHDs aguda e crônica foram observadas, com casos agudos ocorrendo cerca de 100 dias após transplante e casos crônicos observados mais cedo do que o comum. Essas mudanças de padrões tradicionais de GVHD aguda e crônica foram observadas especialmente no contexto de intensidade de condicionamento reduzida e uso de sangue periférico como uma fonte de célula-tronco. Como aqui usado, o termo “GVHD” compreende doença enxerto-versus-hospedeiro ambas aguda e crônica.

[5] O objetivo de transplante de célula progenitora ou célula-tronco hematopoiética (HSCT) é obter o enxerto bem-sucedido de células doadoras dentro de um hospedeiro recipiente, de modo que quimerismo imune e/ou hematopoiético resulte. Tais transplantes são tipicamente usados no tratamento de distúrbios tais como leucemia, síndromes de falência da medula óssea e distúrbios herdados (por exemplo, anemia falciforme, talassemia, distúrbios de imunodeficiência e doenças do armazenamento metabólico tal como mucopolissacaridose), bem como linfoma de grau baixo. Quimerismo é a reconstituição dos vários compartimentos do sistema hematoimune do recipiente com populações de células doadoras carregando moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) derivadas de um doador alogeneico ou xenogeneico, e uma população celular derivada do recipiente ou, alternativamente, os compartimentos do sistema hematoimune do recipiente que podem ser reconstituídos com uma população celular carregando moléculas de MHC derivadas apenas do doador de medula alogeneico ou xenogeneico. Quimerismo pode variar de 100% (substituição total por células alogênicas ou xenogênicas) até níveis baixos detectáveis apenas através de métodos moleculares. Níveis de quimerismo podem variar com o tempo e ser permanentes ou “temporários”.

[6] Infusões de leucócitos do doador (DLI) têm sido usadas após alotransplante para tratar doença relapsada ou residual, para converter quimerismo de doador misto em integral, para restaurar função imune integral como um acréscimo ('add-back') após transplantes depletados em célula T e como uma profilaxia contra relapso como terapia preemptiva. As principais complicações após DLI incluem GVHD aguda e crônica e infecções associadas com aplasia da medula ou o uso de imunossupressão. Na maioria dos testes, até cerca de 60% de recipientes avaliáveis de DLI desenvolveram GVHD. GVHD se relaciona com atividade e resposta de GVT em alguns, mas não todos os estudos.

[7] Com o passar dos anos, vários métodos para profilaxia e tratamento de GVHD foram propostos, tais como medicações imunossupressoras, engenharia de enxerto e terapias celulares. Na verdade, existem várias abordagens para minimização de GVHD após DLI para impedir ou mitigar imunodeficiência pós-transplante ou induzir enxerto-versus-malignidade (GVM) em doença residual ou recorrente. Por exemplo, uma abordagem que parece minimizar GVHD envolve administração de DLI em dose baixa seguido por aumento de dose. A abordagem convencional para DLI tem sido infundir doses "a granel" únicas contendo números variáveis de células T CD3+, mas isso é acreditado estar associado com incidências significantes de GVHD aguda e crônica e ocasionalmente com morte. Por outro lado, transfusão de linfócitos doadores em alíquotas múltiplas, começando em números celulares baixos e aumentando a dosagem em intervalos variáveis conforme necessário, pode reduzir a incidência de GVHD. (*Vide* Mackinnon S, Papadopoulos EB, Carabasi, M.H. e outros, Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host

disease. Blood. 1995;86:1261-1268). A suposição subjacente ao uso de um regime de dose crescente é que a incidência de GVHD aumenta com a dose celular total administrada. Portanto, é acreditado que identificação da dose celular mínima capaz de induzir remissão reduziria o risco de GVHD.

[8] Alternativamente, é acreditado que GVHD possa ser reduzida através da depleção de linfócitos CD8+, que são pensados incluir a maioria das células responsáveis por mediação de GVHD (isto é, depleção de células efetoras de GVHD). Os resultados sugerem que atividade de enxerto-versus-leucemia pode ser retida com GVHD mínima. Em números pequenos de pacientes, a maioria das respostas foi mantida, embora o impacto clínico total dessa abordagem vá necessitar comparação direta com DLI não manipulada.

[9] É também acreditado que GVHD possa ser reduzida através da inativação de células efetoras de GVHD. Na verdade, DLI de célula T doadora irradiada é baseada na hipótese que as células induziriam efeitos de GVM no momento de infusão, mas não poderiam proliferar em resposta a aloantígenos. Ainda, o uso de células T doadoras expressando o gene da timidina cinase de herpes simplex seguido por tratamento com ganciclovir foi estudado quanto a seus efeitos relacionados à modulação de alorreatividade ocorrendo após transplante de medula óssea.

[10] Terapia de combinação de inibidores de calcineurina e metotrexato (MTX) tem sido usada com sucesso para reduzir a incidência e severidade de GVHD e é o padrão de cuidado para profilaxia de GVHD. MTX, um dos primeiros fármacos usados para profilaxia de GVHD, é acreditado inibir di-hidrofolato redutase e produção de timidilato e purinas, dessa maneira suprimindo resposta e proliferação de célula T bem como expressão de moléculas de adesão.

[11] Embora algumas dessas estratégias sejam eficazes na re-

dução de incidência de GVHD, essas estratégias frequentemente se associam a uma redução significativa no efeito de GVM, desta maneira comprometendo a eficácia total do HSCT.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[12] Em um aspecto da presente invenção está um método de provisão de benefícios de uma infusão de linfócito a um paciente com necessidade de tratamento com a mesma enquanto mitigando efeitos colaterais compreendendo: gerar linfócitos deficientes em HPRT a partir de uma amostra de doador; selecionar positivamente os linfócitos deficientes em HPRT *ex vivo* para prover uma população de linfócitos modificados; administrar um enxerto de HSC ao paciente; administrar a população de linfócitos modificados ao paciente seguindo a administração do enxerto de HSC; e opcionalmente administrar MTX se os efeitos colaterais surgirem.

[13] Em algumas modalidades, os linfócitos deficientes em HPRT são gerados através de redução da expressão do gene da HPRT. Em algumas modalidades, os linfócitos deficientes em HPRT são gerados através de inativação do gene da HPRT. Em algumas modalidades, a seleção positiva compreende contato dos linfócitos deficientes em HPRT gerados com um análogo de purina (por exemplo, 6-tioguanina (6TG), 6-mercaptopurina (6-MP) ou azatiopurina (AZA)). Em algumas modalidades, a seleção positiva compreende contato dos linfócitos deficientes em HPRT gerados com um análogo de purina e um segundo agente. Em algumas modalidades, o análogo de purina é 6TG. Em algumas modalidades, uma quantidade de 6TG é entre cerca de 1 a cerca de 15 µg/mL. Em algumas modalidades, o enxerto de HSC é administrado ao paciente seguindo condicionamento mieloablativo. Em algumas modalidades, os linfócitos modificados são administrados como um bolo único. Em algumas modalidades, os linfócitos modificados são administrados como doses múltiplas. Em algumas

modalidades, cada dose compreende entre cerca de $0,1 \times 10^6$ células/kg a cerca de 240×10^6 células/kg. Em algumas modalidades, uma dosagem total de linfócitos modificados compreende entre cerca de $0,1 \times 10^6$ células/kg a cerca de 730×10^6 células/kg. Em algumas modalidades, a administração dos linfócitos modificados ocorre 1 a 14 dias após administração do enxerto de HSC. Em algumas modalidades, a administração dos linfócitos modificados ocorre 2 a 4 semanas após a administração do enxerto de HSC. Em algumas modalidades, a administração dos linfócitos modificados acontece contemporaneamente com a administração do enxerto de HSC. Em algumas modalidades, o MTX é opcionalmente administrado quando do diagnóstico de GVHD. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de $2 \text{ mg/m}^2/\text{infusão}$ a cerca de $8 \text{ mg/m}^2/\text{infusão}$. Em algumas modalidades, o MTX é administrado em doses tituladas.

[14] Em um outro aspecto da presente invenção está um método de tratamento de câncer (por exemplo, um câncer hematológico) em um paciente com necessidade de tratamento com o mesmo compreendendo: gerar linfócitos deficientes em HPRT a partir de uma amostra de doador; selecionar positivamente os linfócitos deficientes em HPRT *ex vivo* para prover uma população de linfócitos modificados; induzir pelo menos um efeito de enxerto-versus-malignidade parcial através da administração de um enxerto de HSC ao paciente; administrar a população de linfócitos modificados ao paciente seguindo detecção de doença residual ou recorrência de doença; e opcionalmente administrar pelo menos uma dose de MTX para suprimir pelo menos um sintoma de GVHD. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de $2 \text{ mg/m}^2/\text{infusão}$ a cerca de $8 \text{ mg/m}^2/\text{infusão}$. Em algumas modalidades, o MTX é administrado em uma quantidade para manter pelo menos

um pouco do efeito do GVM.

[15] Em um outro aspecto da presente invenção está um método de tratamento de câncer em um paciente com necessidade de tratamento com o mesmo compreendendo: gerar células T CAR que incluem um receptor quimérico antitumor e que são deficientes em HPRT; selecionar positivamente as células T CAR deficientes em HPRT *ex vivo* para prover uma população de células T CAR para administração; administrar a população de células T CAR ao paciente; e opcionalmente administrar pelo menos uma dose de MTX para suprimir pelo menos um sintoma de GVHD ou síndrome de liberação de citocina. Em algumas modalidades, as células T CAR deficientes em HPRT são geradas através de redução da expressão do gene de HPRT. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 8 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2,5 mg/m²/infusão a cerca de 7,5 mg/m²/infusão.

[16] Em um outro aspecto da presente invenção está um método de tratamento de câncer em um paciente com necessidade de tratamento com o mesmo compreendendo: gerar células T específicas de antígeno de tumor que são deficientes em HPRT; selecionar positivamente as células T específicas de antígeno de tumor deficientes em HPRT *ex vivo* para prover uma população de células T específicas de antígeno de tumor para administração; administrar a população de células T específicas de antígeno de tumor modificadas ao paciente; e opcionalmente administrar pelo menos uma dose de MTX para suprimir pelo menos um sintoma de GVHD.

[17] Em um outro aspecto da presente invenção está um método de provisão de benefícios de uma infusão de linfócito enquanto mitigando efeitos colaterais em um paciente compreendendo (i) adminis-

trar células T modificadas que são deficientes em HPRT ao paciente (tal como seguindo enxerto de HSC); e (ii) administração de MTX ao paciente quando do início de efeitos colaterais. Em algumas modalidades, os efeitos colaterais são selecionados do grupo consistindo em aGVHD e cGVHD. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas em uma dose única. Em algumas modalidades, uma quantidade de células T modificadas administradas na dose única varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $730 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas em doses múltiplas. Em algumas modalidades, uma quantidade de células T modificadas administradas por dose varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $240 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. Em algumas modalidades, o MTX é administrado como uma dose única. Em algumas modalidades, doses múltiplas do MTX são administradas. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de $2 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$ a cerca de $8 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$. Em algumas modalidades, a quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de $2,5 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$ a cerca de $7,5 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$.

[18] Em um outro aspecto da presente invenção está um método de indução de um efeito de enxerto-versus-malignidade em um paciente seguindo transplante de célula-tronco compreendendo (i) administrar células T modificadas que são deficientes em HPRT ao paciente (tal como seguindo um enxerto de HSC); e (ii) monitorar o paciente quanto a um início de efeitos colaterais. Em algumas modalidades, os efeitos colaterais são selecionados do grupo consistindo em aGVHD ou cGVHD. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar MTX ao paciente quando do início dos efeitos colaterais. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas em uma dose única. Em algumas modalidades, uma quantidade de

células T modificadas administradas na dose única varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $730 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas em doses múltiplas. Em algumas modalidades, uma quantidade de células T modificadas administradas por dose varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $240 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. Em algumas modalidades, o MTX é administrado como uma dose única. Em algumas modalidades, doses múltiplas do MTX são administradas. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de $2 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$ a cerca de $8 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$. Em algumas modalidades, a quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de $2,5 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$ a cerca de $7,5 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$.

[19] Em um outro aspecto da presente invenção está um método de tratamento de câncer compreendendo (i) administrar uma imunoterapia adotiva modificada com gene que é deficiente em HPRT a um indivíduo com necessidade da mesma; (ii) monitorar o indivíduo quanto a um início de efeitos colaterais; e (iii) administrar MTX quando do início dos efeitos colaterais. Em algumas modalidades, a imunoterapia adotiva modificada por gene é selecionada do grupo consistindo em células modificadas com CAR, células modificadas com CAR autólogas e alogênicas, células com TCR modificado autólogas e células com TCR modificado alogênicas.

[20] Em um outro aspecto da presente invenção está um método de tratamento de câncer compreendendo (i) administrar células T CAR que são deficientes em HPRT a um indivíduo com necessidade do mesmo; e (ii) monitorar o indivíduo quanto a um início de efeitos colaterais. Em algumas modalidades, os efeitos colaterais são selecionados do grupo consistindo em aGVHD ou cGVHD. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar MTX quando do

início dos efeitos colaterais. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas em uma dose única. Em algumas modalidades, uma quantidade de células T modificadas administradas na dose única varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $730 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas em doses múltiplas. Em algumas modalidades, uma quantidade de células T modificadas administradas por dose varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $240 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. Em algumas modalidades, o MTX é administrado como uma dose única. Em algumas modalidades, doses múltiplas do MTX são administradas. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de $2 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$ a cerca de $8 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$. Em algumas modalidades, a quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de $2,5 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$ a cerca de $7,5 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$.

[21] Em um outro aspecto da presente invenção está um método de tratamento de câncer compreendendo (i) administrar células T com TCR modificado que são deficientes em HPRT a um indivíduo com necessidade do mesmo; e (ii) monitorar o indivíduo quanto a um início de efeitos colaterais. Em algumas modalidades, os efeitos colaterais são selecionados do grupo consistindo em aGVHD ou cGVHD. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar MTX quando do início dos efeitos colaterais. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas em uma dose única. Em algumas modalidades, uma quantidade de células T modificadas administradas na dose única varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $730 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas em doses múltiplas. Em algumas modalidades, uma quantidade de células T modificadas administradas por dose varia de a partir de cerca de $0,1 \times$

$10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $240 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. Em algumas modalidades, o MTX é administrado como uma dose única. Em algumas modalidades, doses múltiplas do MTX são administradas. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de $2 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$ a cerca de $8 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$. Em algumas modalidades, a quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de $2,5 \text{ m}/\text{m}^2/\text{infusão}$ a cerca de $7,5 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusão}$.

[22] Em um outro aspecto da presente invenção está um método de preservação de um efeito de enxerto-versus-malignidade enquanto mitigando doença enxerto-versus-hospedeiro em um indivíduo através da administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de células T modificadas e administração de MTX quando do início de GVHD. Em algumas modalidades, o efeito enxerto-versus-malignidade é um efeito enxerto-versus-leucemia.

[23] Em um outro aspecto da presente invenção está um método de tratamento de um paciente com câncer que recebeu um transplante de célula hematopoiética alogeneico compreendendo administrar ao paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz de células T modificadas (por exemplo, aquelas que são deficientes em HPRT), as células T modificadas sendo deficientes em HPRT; monitorar quando a um início de efeitos colaterais resultantes da administração das células T modificadas; e administrar MTX para suprimir, reduzir ou controlar o efeito colateral enquanto mantendo uma reação de enxerto-versus-malignidade eficaz para eliminar ou reduzir o número de células cancerosas no paciente. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um corticosteroide. Em algumas modalidades, uma “quantidade eficaz” é uma quantidade que reduz ou elimina um ou mais sintomas indesejáveis associados com doença enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) que surge como uma consequência de DLI. Em algumas modalidades, as células

T modificadas são administradas como uma transfusão de bolo. Em outras modalidades, administrações múltiplas das células T modificadas são providas, isto é, transfusões múltiplas são administradas. Em algumas modalidades, as células T modificadas são produzidas de acordo com os métodos descritos aqui, tal como ilustrado na Figura 1. Em algumas modalidades, uma dosagem única de MTX é administrada. Em outras modalidades, a quantidade de MTX administrada depende da severidade do início de GVHD e, com relação a isso, a dose (ou dosagens) de MTX pode ser titulada para obter uma redução desejada em sintomas de GVHD e/ou um nível desejado do efeito de GVM.

[24] Em um outro aspecto da presente invenção está um método de tratamento de câncer compreendendo (i) administrar a um paciente tendo câncer uma quantidade terapeuticamente eficaz de células T modificadas substancialmente purificadas, as células T modificadas sendo deficientes em HPRT; e (ii) monitorar o paciente quanto à presença de câncer e quanto ao início de GVHD. Em algumas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz de MTX é administrada quando do início de GVHD.

[25] A requerente constatou que uma população de célula T heterogênea modificada com gene pode prover uma reconstituição imunológica mais completa para pacientes de transplante imunocomprometidos (por exemplo, aqueles tendo doença de Crohn severa, síndrome do intestino irritável ou anemia aplástica). Ainda, devido ao fato da especificidade a antígeno das células efetoras de GVM não ser completamente clara, o uso do repertório de célula T inteiro é acreditado ser a melhor opção para obtenção de um efeito de GVM.

[26] Além disso, em comparação com outros métodos de “interruptor desligar”, células tratadas de acordo com os métodos revelados não precisam expressar um “gene suicida”. (Vide, por exemplo, Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C,

Straathof K, Liu E, Durett AG, Grilley B, Liu H, Cruz CR, Savoldo B, Gee AP, Schindler J, Krance RA, Heslop HE, Spencer DM, Rooney CM, Brenner MK. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*. 2011 Nov 3;365(18):1673-83; Xu K, Zhu F, Du B, Gao F, Cheng H, Pan X. Prophylaxis of graft-versus-host disease by lentiviral-mediated expression of herpes simplex virus-thymidine kinase and ganciclovir treatment. *Transplant Proc*. 2008 Oct;40(8):2665-9; e Philip B, Kokalaki E, Mekkaoui L, Thomas S, Straathof K, Flutter B, Marin V, Marafioti T, Chakraverty R, Linch D, Quezada SA, Peggs KS, Pule M. A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy. *Blood*. 2014 Ag 21;124(8):1277-87, cujas descrições são aqui incorporadas a título de referência em suas totalidades). Ao contrário, o método revelado provê redução de expressão ou inativação de um gene endógeno que não causa quaisquer efeitos indesejados em células hematológicas e, no geral, resultados superiores. A requerente alega que devido à quimiosseleção de 6TG *ex vivo* de células modificadas por gene, existe uma pureza muito alta de células engenheiradas para permitir a eliminação quantitativa de células *in vivo* através de dosagem de MTX. Ainda, tratamento de acordo com os métodos revelados provê doses potencialmente maiores e uma terapia mais agressiva de células T doadoras do que terapia onde um “interruptor assassino” não é incorporado. Ainda, o uso de MTX para regular o número de células T modificadas é clinicamente compatível com métodos existentes de tratamento de GVHD, isto é, onde MTX é usado para ajudar a aliviar sintomas de GVHD em pacientes não recebendo as células T modificadas reveladas.

[27] Finalmente, a Requerente alega que em comparação com linfócitos doadores transduzidos com o gene da timidina cinase de herpes simplex, tratamento de acordo com os métodos revelados miti-

ga limitações incluindo imunogenicidade resultando na eliminação das células e precludindo a possibilidade de infusões futuras. (Vide Zhou X, Brenner MK. Improving the safety of T-Cell therapies using an inducible caspase-9 gene. *Exp Hematol.* 2016 Nov;44(11):1013-1019, cuja descrição é aqui incorporada a título de referência em sua totalidade). Também, os presentes métodos permitem uso de ganciclovir para condições clínicas concomitantes que não GVHD sem resultar em eliminação indesejada de linfócitos doadores de HSV-tk (por exemplo, ganciclovir não seria impedido de ser administrado para controlar infecções por CMV, que são comuns no ambiente de alo-HSCT, quando os métodos aqui descritos são utilizados).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[28] A Figura 1 é um fluxograma ilustrando as etapas de preparação de células T modificadas e administração dessas células T modificadas a um paciente com necessidade das mesmas.

[29] A Figura 2 é um fluxograma ilustrando as etapas de preparação de células T modificadas e administração dessas células T modificadas a um paciente seguindo um enxerto de célula-tronco, de modo que o sistema imune do paciente pode ser pelo menos parcialmente reconstituído.

[30] A Figura 3 é um fluxograma ilustrando as etapas de preparação de células T modificadas e administração dessas células T modificadas a um paciente seguindo um enxerto de célula-tronco, de modo que as células T modificadas auxiliam na indução do efeito de GMV.

[31] A Figura 4 é um fluxograma ilustrando as etapas de preparação de células T modificadas (células T CAR que são deficientes em HRPT) e administração dessas células T modificadas a um paciente com necessidade das mesmas.

[32] A Figura 5 ilustra a via de recuperação de purinas.

[33] A Figura 6 ilustra a via *de novo* para a síntese de dTTP.

[34] A Figura 7 ilustra a seleção de células deficientes em HPRT na presença de 6TG.

[35] A Figura 8 ilustra sh734 (SEQ ID NO: 1) conduzido por um promotor 7sk.

[36] As Figuras 9A e 9B ilustram o efeito de seleção positiva com 6TG (*ex vivo*) em células K562.

[37] As Figuras 10A e 10B ilustram o efeito de seleção positiva com 6TG (*ex vivo*) sobre células CEM.

[38] As Figuras 11A e 11B ilustram o efeito de seleção negativa com MTX sobre células K562.

[39] As Figuras 12A e 12B ilustram o efeito de seleção negativa com MTX sobre células CEM.

[40] A Figura 13 ilustra o efeito de seleção negativa com MTX sobre células K562.

[41] A Figura 14 ilustra a formação de metabolitos tóxicos a partir de 6TG.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[42] A sequência de ácido nucleico provida aqui é mostrada usando abreviações de letra padrão para bases de nucleotídeo como definido em 27 C.F.R. 1.822. A listagem de sequência é apresentada como um arquivo de texto ASCII, nomeado "2018-07-13_Calimmune-036WO_ST25.txt" criado em 13 de julho de 2018, menos de 1KB, que é aqui incorporado a título de referência.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[43] Os métodos revelados são geralmente direcionados à prevenção, tratamento, supressão, controle ou de outra maneira mitigação de efeitos colaterais de terapia com célula T, a terapia com célula T planejada para acelerar reconstituição imune, induzir um efeito de GVM e/ou se direcionar a células tumorais.

Definições

[44] Como aqui usado, os termos singulares “um”, “uma”, e “o”, “a” incluem referentes no plural a menos que o contexto indique claramente o contrário. Similarmente, a palavra “ou” pretende incluir “e” a menos que o contexto indique claramente o contrário de outro modo. Portanto, por exemplo, referência a “uma célula” inclui uma pluralidade de tais células e uma referência à “proteína” inclui referência a uma ou mais proteínas e equivalentes das mesmas conhecidos daqueles de habilidade na técnica e assim por diante. Todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como comumente compreendido por um versado de habilidade comum na técnica à qual a presente invenção pertence a menos que claramente de outro modo indicado.

[45] Como usado aqui no relatório e nas reivindicações, a expressão “pelo menos um”, em referência a uma lista de um ou mais elementos, deve ser compreendida significar pelo menos um elemento selecionado de qualquer um ou mais dos elementos na lista de elementos, mas não incluindo necessariamente pelo menos um de cada um e todo elemento especificamente listado na lista de elementos e não excluindo quaisquer combinações de elementos na lista de elementos. Essa definição também permite que elementos possam opcionalmente estar presentes que não os elementos especificamente identificados na lista de elementos à qual a expressão “pelo menos um” se refere, sejam relacionados ou não relacionados àqueles elementos especificamente identificados. Portanto, como um exemplo não limitante, “pelo menos um de A e B” (ou, equivalentemente, “pelo menos um de A ou B”, ou, equivalentemente, “pelo menos um de A e/ou B”) pode se referir, em uma modalidade, a pelo menos um, incluindo opcionalmente mais de um, A, sem nenhum B presente (e opcionalmente incluindo elementos que não B); em uma outra modalidade,

a pelo menos um, opcionalmente incluindo mais de um, B, sem nenhum A presente (e opcionalmente incluindo elementos que não A); em ainda uma outra modalidade, a pelo menos um, opcionalmente incluindo mais de um A, e pelo menos um, opcionalmente incluindo mais de um, B (e opcionalmente incluindo outros elementos); etc.

[46] Os termos “compreendendo”, “incluindo”, “tendo” e similar são usados intercomutavelmente e têm o mesmo significado. Similarmente, “compreende”, “inclui”, “tem” e similar são usados intercomutavelmente e têm o mesmo significado. Especificamente, cada um dos termos é definido de acordo com a definição de lei de patente dos Estados Unidos comum de “compreendendo” e é, portanto, interpretado ser um termo aberto significando “pelo menos o que segue”, e é também interpretado não excluir elementos, limitações, aspectos, adicionais, etc. Portanto, por exemplo, “um dispositivo tendo componentes a, b e c” significa que o dispositivo inclui pelo menos componentes a, b e c. Similarmente, a expressão: “um método envolvendo etapas a, b e c” significa que o método inclui pelo menos etapas a, b e c. Além disso, embora as etapas e processos possam ser descritos aqui em uma ordem particular, o versado reconhecerá que as etapas de ordenação e processos podem variar.

[47] Como aqui usado no relatório e nas reivindicações, “ou” deve ser compreendido ter o mesmo significado que “e/ou” como acima definido. Por exemplo, quando separando itens em uma lista, “ou” ou “e/ou” deve ser interpretado como sendo inclusivo, isto é, a inclusão de pelo menos um, mas também incluindo mais de um, de vários ou lista de elementos e, opcionalmente, itens não listados adicionais. Apenas termos claramente indicados o contrário, tal como “apenas um de” ou “exatamente um de” ou, quando usados nas reivindicações, “consistindo em”, se referirão à inclusão de exatamente um elemento de vários ou lista de elementos. Em geral, o termo “ou” como usado aqui deve

ser apenas interpretado como indicando alternativas exclusivas (isto é, “um ou o outro, mas não ambos”) quando precedido por termos de exclusividade, tal como “ou”, “um de”, “apenas um de” ou “exatamente um de”. “Consistindo essencialmente em”, quando usado nas reivindicações, deve ter seu significado comum como usado no campo de lei de patentes.

[48] Como aqui usado, o termo “administração” como ele se aplica a um sujeito ou paciente, um sujeito de placebo, um sujeito de pesquisa, um sujeito experimental, uma célula, um tecido, um órgão ou um fluido biológico, se refere, sem limitação, a contato de um ligante exógeno, reagente, placebo, molécula pequena, agente farmacêutico, agente terapêutico, agente de diagnóstico ou composição com o sujeito, célula, tecido, órgão ou fluido biológico e similar. “Administração” pode se referir a, por exemplo, métodos terapêuticos, farmacocinéticos, de diagnóstico, pesquisa, placebo e experimentais. Tratamento de uma célula compreende contato de um reagente com a célula, bem como contato de um reagente com um fluido, em que o fluido está em contato com a célula. “Administração” também compreende tratamentos *in vitro* e *ex vivo*, por exemplo, de uma célula, por uma composição reagente, de diagnóstico, ligação ou por uma outra célula.

[49] “Célula T alogeneica” se refere a uma célula T de um doador tendo um tipo HLA de tecido que é compatível com o recipiente. Tipicamente, compatibilidade é realizada com base em variabilidade em três ou mais *loci* do gene de HLA, e uma compatibilidade perfeita nesses *loci* é preferida. Em alguns casos, doadores de transplante alogeneico podem ser parentes (geralmente um irmão com HLA com compatibilidade alta), singeneicos (um gêmeo ‘idêntico’ monozigótico do paciente) ou não parentes (doador que não é parente e constatado ter grau muito alto de compatibilidade de HLA). Os genes de HLA se encaixam em duas categorias (Tipo I e Tipo II). Em geral, incompatibi-

lidades de genes do Tipo I (isto é, HLA-A, HLA-B ou HLA-C) aumentam o risco de rejeição de transplante. Uma incompatibilidade de um gene do Tipo II de HLA (isto é, HLA-DR ou HLA-DQB1) aumenta o risco de doença enxerto-versus-hospedeiro.

[50] Como aqui usado, o termo “T CAR” ou “células T-CAR” se refere a uma célula T ou população das mesmas, que foi modificada através de métodos para expressar um receptor de antígeno quimérico (CAR) sobre a superfície da célula T. O CAR é um polipeptídeo tendo uma especificidade de ligação predefinida para um alvo desejado expresso operavelmente conectado (por exemplo, como uma fusão, cadeias separadas ligadas por uma ou mais ligações dissulfeto, etc.) à parte intracelular de um domínio de ativação de célula T.

[51] Como aqui usado, o termo “quantidade eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” compreende, sem limitação, uma quantidade que pode melhorar, suprimir, controlar, reverter, mitigar, prevenir ou diagnosticar um sintoma ou sinal de uma condição ou distúrbio médico. A menos que de outro modo ditado, explicitamente ou pelo contexto, uma “quantidade eficaz” não é limitada a uma quantidade mínima suficiente para melhorar, suprimir, controlar ou reverter uma condição.

[52] Como aqui usado, o termo “transplante de célula hematopoiética” se refere a transplante de medula óssea, transplante de célula-tronco de sangue periférico, transplante de sangue da veia umbilical ou qualquer outra fonte de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes. Da mesma maneira, o termo “transplante de célula-tronco” ou “transplante” se refere a uma composição compreendendo células-tronco que estão em contato com (por exemplo, suspensas em) um veículo farmacologicamente aceitável. Tais composições são capazes de ser administradas a um indivíduo através de um cateter.

[53] Como aqui usado, “HPRT” é uma enzima envolvida em me-

tabolismo de purina codificada pelo gene HPRT1. HPRT1 está localizado no cromossomo X, e então está presente em cópia única em indivíduos do sexo masculino. HPRT1 codifica a transferase que catalisa a conversão de hipoxantina em monofosfato de inosina e guanina em monofosfato de guanosina através da transferência do grupo 5-fosforobosila de 1-pirofosfato de 5-fosforribosila para a purina. A enzima funciona principalmente para resgatar purinas de DNA degradado para uso em síntese de purina renovada (vide Figura 5).

[54] Como aqui usado, o termo “redução” quando usado em referência a um efeito de RNAi sobre expressão de gene significa que o nível de expressão de gene é inibido ou é reduzido para um nível abaixo do que é geralmente observado quando examinado sob substancialmente as mesmas condições, mas na ausência de RNAi.

[55] Como aqui usado, o termo “inativação” se refere a uma supressão parcial ou completa da expressão de um gene endógeno. Isso é geralmente obtido através da deleção de uma porção do gene ou através da substituição de uma porção com uma segunda sequência, mas também pode ser causado por outras modificações no gene tal como a introdução de códons de parada, a mutação de aminoácidos críticos, a remoção de uma junção de íntron, etc. Portanto, um construto de “inativação” é uma sequência de ácido nucleico, tal como um construto de DNA, que, quando introduzida em uma célula, resulta em supressão (parcial ou completa) de expressão de um polipeptídeo ou proteína codificado por DNA endógeno na célula. Em algumas modalidades, uma “inativação” inclui mutações tal como uma mutação por ponto, uma inserção, uma deleção, uma mudança de estrutura ou uma mutação sem sentido.

[56] Como aqui usado, o termo “vetor lentiviral” é usado para denotar qualquer forma de um ácido nucleico derivado de um lentivírus e usado para transferir material genético em uma célula através de

transdução. O termo compreende ácidos nucleicos de vetor lentiviral, tais como DNA e RNA, formas encapsuladas desses ácidos nucleicos, e partículas virais em que os ácidos nucleicos de vetor viral foram empacotados.

[57] Como aqui usado, o termo “indivíduo” ou “paciente” se refere a um animal vertebrado, incluindo um mamífero. Um humano, *homo sapiens*, é considerado um indivíduo ou paciente.

[58] Como aqui usado, o termo “receptor de células T” ou “TCR” se refere a um complexo de proteínas de membrana que participam na ativação de células T em resposta à apresentação de antígeno. O TCR é acreditado ser responsável pelo reconhecimento de antígenos ligados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal. TCR é composto de um heterodímero de uma cadeia alfa (α) e beta (β), embora em algumas células o TCR consista em cadeias gama e delta (γ/δ). TCRs podem existir em formas alfa/beta e gama/delta, que são estruturalmente similares, mas têm localizações anatômicas e funções distintas. Cada cadeia é composta de dois domínios extracelulares, um domínio variável e um constante. Em algumas modalidades, o TCR pode ser modificado em qualquer célula compreendendo um TCR, incluindo, por exemplo, uma célula T auxiliar, uma célula T citotóxica, uma célula T de memória, célula T reguladora, célula T assassina natural e célula T gama delta.

[59] Como aqui usado, o termo “célula T modificada com TCR” ou “células T TCTTCR modificadas” significa células T que compreendem especificidade alterada ou que carecem de expressão de um TCR funcional. Em algumas modalidades, as células T com TCR modificado são modificadas de modo que elas possuem atividade de morte de tumor aumentada, isto é, elas são modificadas de modo que elas reconhecem eficientemente células de tumor carregando antígeno.

[60] Como aqui usado, o termo “titulação” se refere ao ajuste

contínuo de uma dose com base em resposta do paciente. Por exemplo, as dosagens podem ser ajustadas até que um efeito clínico desejado seja observado ou obtido.

[61] Como aqui usado, o termo “transduzir” ou “transdução” se refere à distribuição de um gene(s) usando um vetor viral ou retroviral por meio de infecção ou invés de através de transfecção. Por exemplo, um gene anti-HIV carregado por um vetor retroviral (um retrovírus modificado usado como um vetor para introdução de ácido nucleico em células) pode ser transduzido em uma célula através de infecção e integração de provírus. Portanto, um “gene transduzido” é um gene que foi introduzido na célula através de infecção lentiviral ou de vetor e integração de provírus. Vetores virais (por exemplo, “vetores de transdução”) transduzem genes em “células-alvo” ou células hospedeiras.

[62] Como aqui usado, o termo “tratamento”, “tratando” ou “tratar”, com relação a uma condição específica, se refere à obtenção de um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser profilático em termos de prevenir completamente ou parcialmente uma doença ou sintoma da mesma e/ou pode ser terapêutico em termos de uma cura parcial ou completa para uma doença e/ou efeito adverso atribuível à doença. “Tratamento”, como aqui usado, compreende qualquer tratamento de uma doença em um indivíduo, particularmente em um humano, e inclui: (a) prevenir que a doença ocorra em um indivíduo que pode ser predisposto à doença, mas que não foi ainda diagnosticado como tendo a mesma; (b) inibir a doença, isto é, parar seu desenvolvimento; e (c) aliviar a doença, isto é, causar a regressão da doença e/ou aliviar um ou mais sintomas da doença. “Tratamento” pode também compreender administração de um agente ou administração de uma terapia a fim e prover um efeito farmacológico, mesmo na ausência de uma doença ou condição. O termo “tratamento” é usado em algumas modalidades para se referir à administração de um com-

posto da presente invenção para mitigar uma doença ou um distúrbio em um hospedeiro, preferivelmente em um sujeito mamífero, mais preferivelmente em humanos. Portanto, o termo “tratamento” pode incluir: prevenir um distúrbio de ocorrer em um hospedeiro, particularmente quando o hospedeiro é predisposto à aquisição da doença, mas não foi ainda diagnosticado com a doença; inibir o distúrbio; e/ou aliviar ou reverter o distúrbio. Visto que os métodos da presente invenção se referem à prevenção de distúrbios, é compreendido que o termo “prevenir” não requer que o estado da doença seja completamente frustrado. Ao contrário, como usado aqui, o termo prevenir se refere à habilidade do versado na técnica em identificar uma população que é suscetível a distúrbios, de modo que administração dos compostos da presente descrição pode ocorrer antes do início de uma doença. O termo não significa que o estado de doença deva ser completamente evitado.

[63] Como aqui usado, o termo “vetor” se refere a uma molécula de ácido nucleico capaz de mediar entrada, por exemplo, transferência, transporte, etc., de uma outra molécula de ácido nucleico em uma célula. O ácido nucleico transferido é geralmente ligado a, por exemplo, inserido na, molécula de ácido nucleico do vetor. Um vetor pode incluir sequências que direcionam a replicação autônoma ou pode incluir sequências suficientes para permitir integração em DNA de célula hospedeira. Como será evidente a um versado comum na técnica, vetores virais podem incluir vários componentes virais em adição a ácido(s) nucleico(s) que fazem a mediação de entrada do ácido nucleico transferido. Vários vetores são conhecidos na técnica incluindo, mas não limitado a, polinucleotídeos lineares, polinucleotídeos associados com compostos iônicos ou anfifílicos, plasmídeos e vetores virais. Exemplos de vetores virais incluem, mas não estão limitados a, vetores adenovirais, vetores de vírus adenoassociado, vetores retrovirais (incluindo vetores lentivirais) e similar.

Preparação de Células T Deficientes em HPRT (“Células T Modificadas”)

[64] Em um aspecto da presente invenção está um método de produção de células T deficientes em HPRT (também referidas aqui como “células T modificadas”). Com referência à Figura 1, células, a saber linfócitos (células T), são primeiro coletadas de um doador (etapa 110). Em modalidades onde células-tronco hematopoiéticas (HSC) são também coletadas de um doador, as células T podem ser coletadas do mesmo doador do qual o enxerto de HSC é coletado ou de um doador diferente. Nessas modalidades, as células podem ser coletadas no mesmo momento ou em um momento diferente que as células para o enxerto de HSC. Em algumas modalidades, as células são coletadas da mesma coleta de HSC de sangue periférico mobilizado. Em algumas modalidades, isso poderia ser uma fração negativa para CD34 (células positivas para CD34 coletadas de acordo com padrão de cuidado para enxerto de doador), ou uma porção do enxerto de HSC positivo para CD34 se um enxerto de célula T progenitora for pretendido.

[65] O versado na técnica compreenderá que as células podem ser coletadas através de qualquer meio. Por exemplo, as células podem ser coletadas através de aferese, leucaferese ou apenas através de uma simples coleta de sangue venoso. Em modalidades onde o enxerto de HSC é coletado contemporaneamente com as células para modificação, o enxerto de HSC é criopreservado de modo a dar tempo para manipulação e teste das células T coletadas.

[66] Seguindo coleta das células, células T são isoladas (etapa 120). As células T podem ser isoladas do agregado de células coletadas através de qualquer meio conhecido daqueles de habilidade na técnica. Por exemplo, células CD3+ podem ser isoladas das células

coletadas através de microesferas de CD3 e o sistema de separação MACS (Miltenyi Biotec). É acreditado que o marcador de CD3 é expresso em todas as células T e está associado com o receptor de célula T. É acreditado que cerca de 70 a cerca de 80% de linfócitos de sangue periférico humano e cerca de 65-85% de linfócitos sejam CD3+. Em algumas modalidades, as células CD3+ são magneticamente marcadas com MicroBeads CD3. Então a suspensão celular é carregada em uma Coluna MACS que é posta no campo magnético de um Separador MACS. As células CD3+ magneticamente marcadas são retidas na coluna. As células não marcadas passam e essa fração celular é depletada de células CD3+. Após remoção da coluna do campo magnético, as células CD3+ magneticamente retidas podem ser eluídas como a fração celular positivamente selecionada.

[67] Alternativamente, células T CD62L+ podem ser isoladas das células coletadas através de um IBA life sciences CD62L Fab Streptamer Isolation Kit. Isolamento de células T CD62L humanas é realizado através de seleção positiva. PBMCs são marcadas com Estreptâmeros Fab CD62L magnéticos. As células marcadas são isoladas em um ímã forte onde elas migram em direção à parede do tubo no lado do ímã. Essa fração celular positiva para CD62L é coletada e as células são liberadas de todos os reagentes de marcação através da adição de biotina em um ímã forte. Estreptâmeros magnéticos migram em direção à parede do tubo e as células livres de marcador permanecem no sobrenadante. Biotina é removida através de lavagem. A preparação celular resultante é altamente enriquecida com células T CD62L com uma pureza de mais de 90%. Quaisquer etapas de depleção e quaisquer colunas são necessárias.

[68] Em modalidades alternativas, células T não são isoladas na etapa 120, mas ao contrário os agregados de células coletados na etapa 110 são usados para modificação subsequente. Enquanto em

algumas modalidades o agregado de células pode ser usado para modificação subsequente, em alguns casos o método de modificação pode ser específico para uma população de célula particular dentro do agregado total de células. Isso poderia ser feito de várias maneiras: por exemplo, direcionando a modificação genética para um tipo de célula particular através do direcionamento da administração do vetor de gene, ou direcionamento da expressão de, por exemplo, um shRNA para HPRT, para um tipo de célula particular, isto é, células T.

[69] Seguindo isolamento das células T, as células T são tratadas para diminuir atividade de HPRT (etapa 130), isto é, para diminuir a expressão do gene de HPRT. As células T podem ser modificadas de acordo com vários métodos. Em algumas modalidades, as células T podem ser modificadas utilizando uma técnica de interferência de RNA. Interferência de RNA (RNAi) se tornou recentemente uma abordagem genética importante para silenciamento pós-transcricional de expressão de gene através do disparo da degradação de transcritos homólogos através de um processo enzimático de múltiplas etapas complexo envolvendo RNA de interferência pequeno (siRNA) de filamento duplo específico de sequência. Em algumas modalidades, células T podem ser modificadas através de transdução com um vetor, por exemplo, um vetor lentiviral, codificando um shRNA direcionado ao gene de HPRT. Em algumas modalidades o shRNA pode ser incrustado dentro de uma estrutura principal de miRNA (amiRNA), em outras modalidades o shRNA pode ser do projeto Ago-shRNA independente de Dicer. Aqui, os construtos de shRNA precursores são processados intracelularmente para gerar dúplexes de siRNA. Vetores lentivirais emergiram como ferramentas potentes e versáteis para esse propósito uma vez que eles oferecem a habilidade de infectar eficientemente uma ampla variedade de tipos de células primárias, sejam de divisão ou não divisão, e podem obter integração de vetor estável no

genoma da célula-alvo, desta maneira permitindo modificação a longo prazo do fenótipo celular. Em algumas modalidades, o vetor lentiviral é um vetor lentiviral autoinativador. Métodos de preparação de um vetor lentiviral adequado são descritos por Hacke, K. e outros, Genetic modification of mouse bone marrow by lentiviral vector-mediated delivery of hypoxanthine-Guanine phosphoribosyltransferase short hairpin RNA confers chemoprotection against 6-thioguanine cytotoxicity, Transplant Proc. 2013 Jun;45(5):2040-4, cuja descrição é aqui incorporada a título de referência em sua totalidade. Em modalidades alternativas, células T podem ser modificadas através de transdução com vetores lentivirais de não integração ou outros vetores virais (vetores AAV).

[70] Em algumas modalidades, o shRNA tem uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade com aquela de SEQ ID NO: 1. Em outras modalidades, o shRNA tem uma sequência tendo pelo menos 90% de identidade com aquela de SEQ ID NO: 1. Em ainda outras modalidades, o shRNA tem uma sequência tendo pelo menos 95% de identidade com aquela de SEQ ID NO: 1. Em modalidades adicionais, o shRNA tem uma sequência tendo pelo menos 97% de identidade com aquela de SEQ ID NO: 1. Em ainda mais modalidades, o shRNA tem uma sequência tendo pelo menos 98% de identidade com aquela de SEQ ID NO: 1. Em ainda outras modalidades, o shRNA tem uma sequência tendo pelo menos 99% de identidade com aquela de SEQ ID NO: 1. Outras moléculas de shRNA adequadas são descritas na Publicação PCT No. WO/2017/143266, cuja descrição é aqui incorporada a título de referência em sua totalidade.

[71] Em outras modalidades, uma abordagem de edição de gene pode ser usada para inativar HPRT. Por exemplo, células isoladas podem ser tratadas com RNP CRISPR/Cas9 direcionado a HPRT. Em algumas modalidades, o RNP CRISPR/Cas9 direcionado a HPRT pode ser formulado dentro de uma nanocápsula. Maeder, M.L. e outros, Ge-

nome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy, Mol Ther. 2016 Mar;24(3):430-46), descreve várias técnicas de edição de gene, incluindo métodos mediados por nuclease CRISPR/Cas9, e essas descrições são aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade. Ferramentas de edição de gene podem ser também administradas através de qualquer método conhecido daqueles de habilidade comum na técnica incluindo por meio de vetores AAV, vetores lentivirais transcritos de não integração e não reversos e outros métodos de administração físicos (por exemplo, eletroporação, deformação celular, sonoporação, etc.). Métodos de transfecção incluindo fosfato de cálcio, lipofectamina, fugeno, dendrímeros, lipossomos (geralmente lipossomos catiônicos) e outros polímeros catiônicos (por exemplo, DEAE ou PEI) podem também ser utilizados. Existem também outros métodos baseados em partícula incluindo sistemas de administração de nanopartícula, que podem ser biologicamente ou quimicamente funcionalizados para aumentar a administração ou podem ser usados em métodos físicos de administração, por exemplo, magnofecção, ou bombardeamento de partícula.

[72] Em algumas modalidades, eletroporação é usada para introduzir ácidos nucleicos em células eucarióticas, tal como através da abertura de poros transientes na membrana celular para permitir a absorção de material. Eletroporação é um método através do qual DNA (ou RNA) é introduzido em células através da passagem de uma corrente elétrica através da membrana celular.

[73] Outras técnicas de edição de gene usando certas nucleases são descritas nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 8.895.264 e 9.22.105, cujas descrições são aqui incorporadas a título de referência em suas totalidades. Em algumas modalidades, uma proteína dedo-de-zinco (ZFP) que se liga a um sítio-alvo em um gene de HPRT em um genoma pode ser utilizada, em que a ZFP compreende um ou mais

domínios de ligação de dedo-de-zinco engenheirados. Em algumas modalidades, ZFPs são usadas como um par de nucleases dedo-de-zinco (ZFNs) que dimerizam e então clivam uma região genômica-alvo de interesse, em que as ZFNs compreendem um ou mais domínios de ligação de dedo-de-zinco engenheirados e um domínio de clivagem de nuclease ou meio-domínio de clivagem. Em algumas modalidades, uma proteína TALE (Efetor do tipo ativador de transcrição) que se liga ao sítio-alvo em um gene de HPRT em um genoma pode ser utilizada, em que a TALE compreende um ou mais domínios de ligação de DNA de TALE engenheirados. Em algumas modalidades, a TALE é uma nuclease (TALEN) que cliva uma região genômica-alvo de interesse, em que a TALEN compreende um ou mais domínios de ligação de DNA de TALE engenheirados e um domínio de clivagem de nuclease ou meio domínio de clivagem. Domínios de clivagem e meios-domínios de clivagem de ZFNs e/ou TALENs podem ser obtidos, por exemplo, a partir de várias endonucleases de restrição e/ou endonucleases de retorno. Em algumas modalidades, os meios-domínios de clivagem são derivados de uma endonuclease de restrição do Tipo IIS (por exemplo, Fok I).

[74] Após as células T serem modificadas na etapa 130, a população de células T deficientes em HPRT é selecionada e/ou expandida (etapa 140). Em algumas modalidades, a cultura pode concomitantemente selecionar e expandir células com capacidade aumentada para enxerto (por exemplo, fenótipo de célula de memória central ou tronco T). Em algumas modalidades, o período de cultura é menos de 14 dias. Em algumas modalidades, o período de cultura é menos de 7 dias.

[75] Em algumas modalidades, a etapa de seleção e expansão de células compreende tratamento da população de células T deficientes em HPRT *ex vivo* com um antimetabolito análogo de guanossina (tal como 6-tioguanina (6TG), 6-mercaptopurina (6-MP) ou azatiopurina

(AZA). Em algumas modalidades, as células T são cultivadas na presença de 6-tioguanina ("6TG"), desta maneira matando células que não foram modificadas na etapa 130. 6TG é um análogo de guanina que pode interferir com biossíntese de dGTP na célula. Tio-dG pode ser incorporado a DNA durante replicação no lugar de guanina e, quando incorporado, frequentemente se torna metilado. Essa metilação pode interferir com reparo de DNA de incompatibilidade apropriado e pode resultar em parada de ciclo celular e/ou iniciar apoptose. 6TG tem sido usada clinicamente para tratar pacientes com certos tipos de malignidades devido à sua toxidez para células de divisão rápida. Na presença de 6TG, HPRT é a enzima responsável pela integração de 6TG a DNA e RNA na célula, resultando em bloqueio de síntese de polinucleotídeo e metabolismo apropriados (vide Figura 7). Por outro lado, a via de resgate é bloqueada em células deficientes em HPRT (vide Figura 7). As células então usam a via *de novo* para síntese de purina (vide Figura 6). No entanto, em células do tipo selvagem de HPRT, as células usam a via de resgate e 6TG é convertida em 6TGMP na presença de HPRT. 6TGMP é convertida através de fosforilação em difosfato de tioguanina (TGDP) e trifosfato de tioguanina (TGTP). Simultaneamente análogos de desoxirribosila são formados, através da enzima ribonucleotídeo redutase. Dado que 6TG é altamente citotóxica, ela pode ser usada como um agente de seleção para matar células com uma enzima HPRT funcional.

[76] As células deficientes em HPRT geradas são então contactadas com um análogo de purina *ex vivo*. Para a abordagem de inativação, é acreditado que possa ainda haver HPRT residual nas células e que células com HPRT inativado possam tolerar uma gama de análogo de purina, mas serão mortas nas dosagens/quantidades altas. Nessa situação, a concentração de análogos de purina usados para seleção *ex vivo* varia de a partir de cerca de 10 nM a cerca de 5 µM.

Em algumas modalidades, a concentração varia de a partir de cerca de 100 nM a cerca de 2,5 μ M. Em outras modalidades, a concentração varia de a partir de cerca de 200 nM a cerca de 2 μ M. Em ainda outras modalidades, a concentração varia de a partir de cerca de 200 nM a cerca de 1 μ M.

[77] Para a abordagem de inativação, é acreditado que HPRT possa ser totalmente eliminado ou quase que totalmente eliminado de células com HPRT inativado e as células deficientes em HPRT geradas serão altamente tolerantes a análogos de purina. A concentração de análogos de purina usados para seleção *ex vivo* nesse caso varia de a partir de cerca de 10 nM a cerca de 100 μ M. Em algumas modalidades, a concentração varia de a partir de cerca de 10 nM a cerca de 80 μ M. Em outras modalidades, a concentração varia de a partir de cerca de 10 nM a cerca de 60 μ M. Em ainda outras modalidades, a concentração varia de a partir de cerca de 20 nM a cerca de 40 μ M.

[78] Em outras modalidades, modificação das células (por exemplo, através de redução ou inativação de HPRT) pode ser eficiente o suficiente de modo que seleção *ex vivo* de células deficientes em HPRT não é necessária, isto é, seleção com 6TG ou outro composto similar não é requerida.

[79] Em algumas modalidades, as células deficientes em HPRT geradas são contatadas com ambos um análogo de purina e com allopurinol, que é um inibidor de xantina oxidase (XO). Através da inibição de XO, 6TG mais disponível para ser metabolizada por HPRT. Quando 6TG é metabolizada por HPRT ela forma 6TGNs que são os metabólitos tóxicos para as células (6TGN compreende monofosfato (6TGMP), difosfato (6-TGDP) e trifosfato de 6-TG (6TGTP)). (Vide Figura 14). (Vide, por exemplo, Curkovic e outros, Low allopurinol doses are sufficient to optimize azathioprine therapy in inflammatory bowel disease patients with inadequate thiopurine metabolite concentrations. Eur J

Clin Pharmacol. 2013 Aug;69(8):1521-31; Gardiner e outros. Allopurinol might improve response to azathioprine and 6-mercaptopurine by correcting an unfavorable metabolite ratio. J Gastroenterol Hepatol. 2011 Jan;26(1):49-54; Seinen e outros. The effect of allopurinol and low-dose thiopurine combination therapy on the activity of three pivotal thiopurine metabolizing enzymes: results from a prospective pharmacological study. J Crohns Colitis. 2013 Nov;7(10):812-9; e Wall e outros. Addition of Allopurinol for Altering Thiopurine Metabolism to Optimize Therapy in Patients with Inflammatory Bowel Disease. Pharmacotherapy. 2018 Feb;38(2):259-270, cujas descrições de cada um são aqui incorporadas a título de referência em suas totalidades).

[80] Em algumas modalidades, alopurinol é introduzido nas células deficientes em HPRT geradas antes da introdução do análogo de purina. Em outras modalidades, alopurinol é introduzido nas células deficientes em HPRT geradas simultaneamente com a introdução do análogo de purina. Em ainda outras modalidades, alopurinol é introduzido nas células deficientes em HPRT geradas seguindo a introdução do análogo de purina.

[81] Seguindo seleção e expansão, o produto de célula T modificado é testado. Em algumas modalidades, o produto de célula T modificado é testado de acordo com teste de liberação padrão (por exemplo, atividade, micoplasma, viabilidade, estabilidade, fenótipo, etc., vide Molecular Therapy: Methods & Clinical Development Vol. 4 de março de 2017 92-101, cuja descrição é aqui incorporada a título de referência em sua totalidade).

[82] Em outras modalidades, o produto de célula T modificado é testado quanto à sensibilidade a MTX ou ácido micofenólico (MPA). Ambos MTX e MPA inibem síntese *de novo* de purinas, mas têm mecanismos de ação diferentes. É acreditado que MTX inibe competitivamente di-hidrofolato redutase (DHFR), uma enzima que participa em

síntese de tetraidrofolato (THF). DHFR catalisa a conversão de diidrofolato em tetraidrofolato ativo. Ácido fólico é necessário para a síntese *de novo* da nucleosídeo timidina, necessária para síntese de DNA. Também, folato é essencial para biossíntese à base de purina e pirimidina, de modo que síntese será inibida. Ácido micofenólico (MPA) é um inibidor potente, reversível, não competitivo, de inosina-5'-monofosfato desidrogenase (IMPDH), uma enzima essencial para a síntese *de novo* de guanosina-5'-monofosfato (GMP) a partir de inosina-5'-monofosfato (IMP).

[83] MTX ou MPA, portanto, inibe a síntese de DNA, RNA, timidilatos e proteínas, MTX ou MPA bloqueia a via *de novo* através da inibição de DHFR. Em célula HPRT *-/-*, não há nenhuma via de resgate ou *de novo* funcional, levando a nenhuma síntese de purina e, portanto, as células morrem. No entanto, as células do tipo selvagem de HPRT têm uma via de resgate funcional, sua síntese de purina ocorre e as células sobrevivem. Em algumas modalidades, as células T modificadas são deficientes em HPRT. Em algumas modalidades, pelo menos 85% da população de células T modificadas são sensíveis a MTX ou MPA. Em outras modalidades, pelo menos 90% da população de células T modificadas são sensíveis a MTX ou MPA. Em ainda outras modalidades, pelo menos 95% da população de células T modificadas são sensíveis a MTX ou MPA.

[84] Dada a sensibilidade das células T modificadas produzidas de acordo com as etapas 110 até 140 a MTX ou MPA, MTX ou MPA pode ser usado para eliminar seletivamente células deficientes em HPRT, como descrito aqui.

Tratamento com Células T Modificadas

[85] Em algumas modalidades, as células T modificadas preparadas de acordo com as etapas 110 a 140 são administradas a um paciente (etapa 150). Em algumas modalidades, as células T modifica-

das (ou células T CAR ou células T TCR como descrito aqui) são fornecidas ao paciente em uma administração única (por exemplo, um bolo único, ou administração durante um período de tempo determinado, por exemplo, e infusão durante cerca de 1 a 4 horas ou mais). Em outras modalidades, administrações múltiplas das células T modificadas são feitas. Se doses múltiplas das células T modificadas forem administradas, cada dose pode ser igual ou diferente (por exemplo, doses crescentes, doses decrescentes).

[86] Em algumas modalidades, uma quantidade da dose de células T modificadas é determinada com base no teor/kg de célula T positiva para CD3 do peso corporal do indivíduo. Em algumas modalidades, a dose total de células T modificadas varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $730 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. Em outras modalidades, a dose total de células T modificadas varia de a partir de cerca de $1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $500 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. Em ainda outras modalidades, a dose total de células T modificadas varia de a partir de cerca de $1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $400 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. Em modalidades adicionais, a dose total de células T modificadas varia de a partir de cerca de $1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $300 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. Em modalidades ainda adicionais, a dose total de células T modificadas varia de a partir de cerca de $1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $200 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal.

[87] Onde doses múltiplas são providas, a frequência de dosagem pode variar de a partir de cerca de 1 semana a cerca de 36 semanas. Da mesma maneira, onde doses múltiplas são providas, cada dose de células T modificadas varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $240 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. Em outras modalidades, cada dose de células T modificadas varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a cerca de $180 \times$

10^6 /kg de peso corporal. Em outras modalidades, cada dose de células T modificadas varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6$ /kg de peso corporal a cerca de 140×10^6 /kg de peso corporal. Em outras modalidades, cada dose de células T modificadas varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6$ /kg de peso corporal a cerca de 100×10^6 /kg de peso corporal a cerca de 60×10^6 /kg de peso corporal. Outras estratégias de dosagem são descritas por Gozdzik, J. e outros, Adoptive therapy with donor lymphocyte infusion after allogenic hematopoietic SCT in pediatric patients, Bone Marrow Transplant, 2015 Jan;50(1):51-5), cuja descrição é aqui incorporada a título de referência em sua totalidade.

[88] As células T modificadas podem ser administradas sozinhas ou como parte de uma estratégia de tratamento global. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas seguindo um transplante de HSC, tal como cerca de 2 a cerca de 4 semanas após o transplante de HSC. Por exemplo, em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas após administração de um transplante de HSC para ajudar a prevenir ou mitigar imunodeficiência pós-transplante. É acreditado que as células T modificadas podem prover uma reconstituição e/ou proteção imune a curto prazo (por exemplo, cerca de 3 a cerca de 9 meses). Como um outro exemplo, e em outras modalidades, as células T modificadas são administradas como parte de terapia para câncer para ajudar a induzir um efeito de enxerto-versus-malignidade (GVM) ou um efeito enxerto-versus-tumor (GVT). Como um exemplo adicional, as células T modificadas são células T CAR ou células T com TCR modificado que são deficientes em HPRT e que são administradas como parte de uma estratégia de tratamento para câncer. Administração das células T modificadas de acordo com cada um desses caminhos de tratamento é descrita em mais detalhes aqui. Com certeza, o versado compreenderá que outros tratamentos para qualquer condição subjacente podem ocorrer antes

da, subsequente à ou concomitantemente com administração das células T modificadas.

Supressão, Controle ou Mitigação de Efeitos Colaterais de Terapia de Célula T

[89] Administração de células T a um paciente pode resultar em efeitos colaterais indesejados, incluindo aqueles mencionados aqui. Por exemplo, doença enxerto-versus-hospedeiro pode ocorrer após um paciente ser tratado com células T, incluindo células T modificadas (por exemplo, através de ativação de HPRT). Em alguns aspectos da presente descrição, seguindo administração das células T modificadas na etapa 150, o paciente é monitorado quanto ao início de quaisquer efeitos colaterais, incluindo, mas não limitado a, GVHD. Se surgirem quaisquer efeitos colaterais, tal como GVHD (ou sintomas de GVHD), MTX ou MPA é administrado ao paciente (*in vivo*) na etapa 160 para remover pelo menos uma porção das células T modificadas em um esforço para suprimir, reduzir, controlar ou de outro modo mitigar efeitos colaterais, por exemplo, GVHD. Em algumas modalidades, MTX ou MPA é administrado em uma dose única. Em outras modalidades, doses múltiplas de MTX e/ou MPA são administradas.

[90] É acreditado que as células T modificadas da presente invenção (uma vez selecionadas *ex vivo* e administradas ao paciente ou sujeito mamífero) possam servir como um interruptor “liga”/“desliga” dada sua sensibilidade a MTX (ou MPA). O interruptor modulável permite regulação de reconstituição do sistema imune matando seletivamente pelo menos uma porção das células T modificadas *in vivo* através da administração de MTX ao paciente se quaisquer efeitos colaterais ocorrerem. Esse interruptor modulável pode ser ainda regulado pela administração de mais células T modificadas ao paciente seguindo administração de MTX para permitir mais reconstituição do sistema imune após efeitos colaterais terem sido reduzidos ou de outro modo

mitigados. Da mesma maneira, o interruptor modulável permite regulação de um efeito de enxerto-versus-malignidade ao matar seletivamente pelo menos uma porção das células T modificadas *in vivo* através da administração de MTX se quaisquer efeitos colaterais ocorrerem. Novamente, o efeito de GVM pode ser afinado através de dosagem subsequente de alíquotas adicionais de células T modificadas ao paciente uma vez os efeitos colaterais sendo reduzidos ou de outra maneira mitigados. Esse mesmo princípio se aplica à terapia com célula T CAR ou terapia com células T modificadas com TCR, onde novamente as células T CAR ou células T com TCR modificado podem ser seletivamente ligadas/desligadas através da administração de MTX. Em vista disso, o versado de habilidade comum na técnica compreenderá que qualquer profissional médico orientando tratamento de um paciente pode equilibrar reconstituição do sistema imune e/ou o efeito de GVM enquanto mantendo efeitos colaterais afastados ou dentro de faixas toleráveis ou aceitáveis. Em virtude do acima, tratamento do paciente pode ser melhorado enquanto mitigando efeitos adversos.

[91] Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 100 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 90 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 80 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 70 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 60 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 50 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX

administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 40 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 30 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 20 mg/m²/infusão a cerca de 20 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 10 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 8 mg/m²/infusão. Em outras modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2,5 mg/m²/infusão a cerca de 7,5 mg/m²/infusão. Em ainda outras modalidades, uma quantidade de MTX administrada é cerca de 5 mg/m²/infusão. Em ainda modalidades adicionais, uma quantidade de MTX administrada é cerca de 7,5 mg/m²/infusão.

[92] Em algumas modalidades, entre 2 e 6 infusões são feitas, e as infusões podem compreender, cada uma, a mesma dosagem ou dosagens diferentes (por exemplo, dosagens crescentes, dosagens decrescentes, etc.). Em algumas modalidades, as administrações podem ser feitas em uma base semanal ou em uma base quinzenal.

[93] Em ainda outras modalidades, a quantidade de MTX administrada é titulada de modo que efeitos colaterais não controlados, por exemplo, GVHD, são melhorados, enquanto preservando pelo menos algumas células T modificadas e seus efeitos concomitantes sobre reconstituição do sistema imune, direcionamento a câncer ou indução do efeito de GVM. Com relação a isso, é acreditado que pelo menos um pouco do benefício das células T modificadas pode ser ainda reconhecido enquanto melhorando os efeitos colaterais, por exemplo, GVHD. Em algumas modalidades, células T modificadas adicionais são administradas seguindo tratamento com MTX, isto é, seguindo melhora,

supressão ou controle dos efeitos colaterais, por exemplo, GVHD.

[94] Em algumas modalidades, o sujeito recebe doses de MTX antes da administração das células T modificadas, de modo a controlar ou prevenir efeitos colaterais após transplante de HSC. Em algumas modalidades, tratamento existente com MTX é interrompido antes da administração das células T modificadas, e então retomado, na mesma dosagem ou diferente (e usando um programa de dosagem igual ou diferente), quando do início de efeitos colaterais seguindo tratamento com as células T modificadas. Com relação a isso, o versado pode administrar MTX em uma base conforme necessário e consistente com os padrões de cuidado conhecidos na indústria médica.

[95] Em algumas modalidades, um agente alternativo pode ser usado no lugar ou de MTX ou MPA, incluindo, mas não limitado a, ribavirina (inibidor de IMPDH); VX-497 (inibidor de IMPDH) (vide Jain J, VX-497: a novel, selective IMPDH inhibitor and immunosuppressive agent, J Pharm Sci. 2001 May;90(5):625-37); lometrexol (DDATHF, LY249543) (inibidor de GAR e/ou AICAR); análogo de tiofeno (LY254155) (inibidor de GAR e/ou AICAR), análogo de furano (LY222306) (inibidor de GAR e/ou AICAR) (vide Habeck e outros, A Novel Class of Monoglutamated Antifolates Exhibits Tight-binding Inhibition of Human Glycinamide Ribonucleotide Formyltransferase and Potent Activity against Solid Tumors, Cancer Research 54, 1021-2026, Fev. 1994); DACTHF (inibidor de GAR e/ou AICAR) (vide Cheng e outros, Design, synthesis, and biological evaluation of 10-methanesulfonyl-DDACTHF, 10-methanesulfonyl-5-DACTHF, and 10-methylthio-DDACTHF as potent inhibitors of GAR Tfase and the *de novo* purine biosynthetic pathway; Bioorg Med Chem. 2005 Maio 16;13(10):3577-85); AG2034 (inibidor de GAR e/ou AICAR) (vide Boritzki e outros, AG2034: a novel inhibitor of glycinamide ribonucleotide formyltransferase, Invest New Drugs. 1996;14(3):295-303); LY309887

(inibidor de GAR e/ou AICAR) ácido ((2S)-2-[[5-[2-[(6R)-2-amino-4-oxo-5,6,7,8-tetraidro-1H-pirido[2,3-d]pirimidin-6-il]etil]tiofeno-2-carbonil]amino]pentanodioico); alimta (LY231514) (inibidor de GAR e/ou AICAR) (vide Shih e outros, LY231514, a pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-based antifolate that inhibits multiple folate-requiring enzymes, Cancer Res. 1997 Mar 15;57(6):1116-23); dmAMT (inibidor de GAR e/ou AICAR), AG2009 (inibidor de GAR e/ou AICAR); forodesina (Imucilina H, BCX-1777; marcas registradas Mundesine e Fodosine) (inibidor de purina nucleosídeo fosforilase [PNP]) (vide Kicska e outros, Immucillin H, a powerful transition-state analog inhibitor of purine nucleoside phosphorylase, selectively inhibits human T lymphocytes, PNAS Abril 10, 2001. 98 (8) 4593-4598); e imucilina-G (inibidor de purina nucleosídeo fosforilase [PNP]).

Prevenção de Imunodeficiência Pós-transplante

[96] Embora transplante de célula-tronco hematopoiética a partir de irmãos com compatibilidade de antígeno leucocitário humano (HLA) tenha se tornado uma modalidade de tratamento padrão para muitas doenças hematológicas (malignas e não malignas), transplante de HSC alogeneico (alo-HSCT) permanece a única terapia curativa provada para leucemia mieloide crônica. As células-tronco hematopoiéticas pluripotentes requeridas para esse procedimento são geralmente obtidas da medula óssea ou sangue periférico de um doador parente ou não parente. Historicamente, os melhores resultados de HCT alogeneico foram obtidos quando o doador da célula tronco é um irmão compatível HLA. No entanto, qualquer dado par de irmãos tem apenas cerca de 25% de chance de herdar os mesmos haplotipos de HPLA de seus pais. Isso significa que apenas cerca de 30% de pacientes terão tal compatibilidade. Consequentemente, atenção foi focada em outras fontes de células-tronco. Para pacientes que não têm um irmão com compatibilidade HLA, fontes alternativas de enxertos doadores incluem

doadores não parentes adultos adequadamente com compatibilidade HLA, células-tronco de sangue do cordão umbilical e doadores parentes com incompatibilidade HLA parcial ou HLA-haploidênticos. A decisão de qual fonte doadora utilizar depende, em grande parte, da situação clínica e das abordagens empregadas no centro de transplante individual. No entanto, é acreditado que quase todos os pacientes têm pelo menos um membro na família incompatível HLA-haploidêntico (pai, filho ou irmão), que está imediatamente disponível como doador.

[97] O principal desafio de HSCT HLA-haploidêntico é alorreatividade bidirecional intensa levando a altas incidências de rejeição de enxerto e GVHD. Avanços em engenharia de enxerto e em profilaxia farmacológica de GVHD reduziram os riscos de falha de enxerto e GVHD após HCT HLA-haploidêntico, e fizeram dessa fonte de célula-tronco uma alternativa viável para pacientes sem irmão compatível HLA. No entanto, é acreditado que ambas as abordagens possam levar a períodos de imunodeficiência pós-transplante tornando o recipiente suscetível à infecção, que é a causa primária de mortalidade não relacionada à falha de enxerto. É acreditado que linfócitos doadores possam desempenhar um papel terapêutico central na indução de reconstituição imune, especialmente no subconjunto de transplantes compatíveis com célula T depletada e no contexto de transplante parcialmente incompatível. Na verdade, é acreditado que DLI pode ser usada após transplante de célula-tronco para prevenir ou mitigar infecções e estabelecer quimerismo de doador integral. A adição de células T maduras que exibem um repertório amplo de imunidade de célula T contra infecções virais, fúngicas e outras oportunistas proveria um benefício clínico (vide, por exemplo, Loren, A.W., Porter, D.L. Donor leukocyte infusions after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Oncol*. 2006 Mar;18(2):107-14; e Zhou, X. e outros. Long-term outcome after haploidentical stem cell transplant and

infusion of T-cells expressing the inducible caspase 9 safety transgene. Blood. 2014 Jun 19;123(25):3895-905, cujas descrições são aqui incorporadas a título de referência, cada uma em sua totalidade).

[98] Como observado aqui, GVDH pode ocorrer após um paciente ser tratado com um transplante de célula-tronco. Para combater isso, a presente invenção provê um método de prevenção ou mitigação de imunodeficiência pós-transplante e uma abordagem farmacológica para reduzir, suprimir ou controlar GVHD se ela surgir. É acreditado que a abordagem revelada integre com a prática de HSCT HLA-haploidêntico descrita acima. Em algumas modalidades, o método utiliza uma infusão de células T modificadas deficientes em HPRT em pacientes HSCT pós-alogênicos para acelerar reconstituição imune e prover pelo menos alguma imunidade para o hospedeiro enquanto sendo capaz de concomitantemente suprimir ou controlar GVHD através de dosagem com MTX.

[99] A Figura 2 ilustra um método de redução, supressão ou controle de GVHD quando do início dos sintomas. Inicialmente, as células são coletadas de um doador na etapa 210. As células podem ser coletadas do mesmo doador que provê a HSC para enxerto (vide etapa 260) ou de um doador diferente. Linfócitos são então isolados das células coletadas (etapa 220) e tratados de modo que eles se tornam deficientes em HPRT (etapa 230). Métodos de tratamento das células isoladas são mostrados aqui. Para se chegar a uma população de células T modificadas que são deficientes em HPRT, as células tratadas são positivamente selecionadas e expandidas (etapa 240), tal como descrito aqui. As células T modificadas são então armazenadas para uso posterior.

[100] Antes de receber o enxerto de HSC (etapa 260), os pacientes são tratados com condicionamento mieloablativo de acordo com padrão de cuidado (etapa 250) (por exemplo, radiação de condiciona-

mento de dose alta, quimioterapia e/ou tratamento com um análogo de purina; ou radiação de condicionamento de dose baixa, quimioterapia e/ou tratamento com um análogo de purina).

[101] Em algumas modalidades, o paciente é tratado com o enxerto de HSC (etapa 260) entre cerca de 24 e cerca de 96 horas seguindo tratamento com o regime de condicionamento. Em outras modalidades, o paciente é tratado com o enxerto de HSC entre cerca de 24 e cerca de 72 horas seguindo tratamento com o regime de condicionamento. Em ainda outras modalidades, o paciente é tratado com o enxerto de HSC entre cerca de 24 horas e cerca de 48 horas seguindo tratamento com o regime de condicionamento. Em algumas modalidades, o enxerto de HSC compreende um mínimo de 2×10^6 células CD34+/kg, com um alvo de mais de 6×10^6 células CD24+/kg.

[102] Seguindo enxerto de HSC, as células T modificadas da etapa 240 são administradas ao paciente de acordo com protocolos de transfusão padrão (etapa 270). Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas entre cerca de 2 a cerca de 8 semanas após o enxerto de HSC. Em outras modalidades, as células T modificadas são administradas entre cerca de 2 a cerca de 6 semanas após o enxerto de HSC. Em ainda outras modalidades, as células T modificadas são administradas entre cerca de 2 a cerca de 4 semanas após o enxerto de HSC. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas entre cerca de 1 dia e cerca de 21 dias após o enxerto de HSC. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas entre cerca de 1 dia e cerca de 14 dias após o enxerto de HSC. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas entre cerca de 1 dia e cerca de 7 dias após o enxerto de HSC. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas entre cerca de 2 dias e cerca de 4 dias após o enxerto de HSC. Em algumas modalidades, as células T modificadas são admi-

nistradas contemporaneamente com o enxerto de HSC ou dentro de algumas horas do enxerto de HSC (por exemplo, 1, 2, 3 ou 4 horas após o enxerto de HSC).

[103] As células T modificadas podem ser transfundidas em uma administração única. Alternativamente, as células T modificadas podem ser transfundidas durante um curso de administrações múltiplas. Em modalidades onde administrações múltiplas de células T modificadas são feitas, as mesmas quantidades ou quantidades diferentes de células T modificadas podem ser transfundidas em cada administração, tal como aqui descrito.

[104] Seguindo administração das células T modificadas, o paciente é monitorado quanto ao início de GVHD. Surgindo os sintomas, MTX pode ser administrado (etapa 280) para reverter, suprimir ou controlar GVHD. MTX pode ser administrado em uma dose única ou em doses múltiplas. Se administrações de MTX múltiplas forem feitas, a dosagem pode ser titulada de modo a equilibrar GVHD enquanto mantendo algumas das proteções proporcionadas ao sistema imune pelas células T modificadas.

[105] Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 100 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 90 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 80 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 70 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 60 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de

50 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 40 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 30 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 20 mg/m²/infusão a cerca de 20 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 10 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 8 mg/m²/infusão. Em outras modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2,5 mg/m²/infusão a cerca de 7,5 mg/m²/infusão. Em ainda outras modalidades, uma quantidade de MTX administrada é cerca de 5 mg/m²/infusão. Em modalidades ainda adicionais, uma quantidade de MTX administrada é cerca de 7,5 mg/m²/infusão.

[106] Em algumas modalidades, entre 2 e 6 infusões são feitas, e as infusões podem compreender, cada uma, a mesma dosagem ou dosagens diferentes (por exemplo, doses crescentes, doses decrescentes, etc.). Em outras modalidades, entre 2 e 4 infusões são feitas. Em algumas modalidades, as administrações podem ser feitas em uma base semanal ou em uma base quinzenal.

Indução de Enxerto-versus-Malignidade em Doença Residual ou Recorrente

[107] Tratamento de males hematológicos, incluindo leucemia, linfoma e mieloma, geralmente envolve uma ou mais formas de quimioterapia e/ou terapia de radiação. Esses tratamentos destroem as células malignas, mas também destroem as células sanguíneas saudáveis do corpo. Transplante de medula óssea alogeneico (BMT) é uma terapia eficaz útil no tratamento de muitos males hematológicos. Em

BMT alogeneico, a medula óssea (ou, em alguns casos, sangue periférico) de um doador não parente ou parente (mas não gêmeo idêntico) é usada para substituir as células sanguíneas saudáveis no paciente com câncer. A medula óssea (ou sangue periférico) contém células-tronco, que são os precursores para todos os tipos de célula diferentes (por exemplo, hemácias, fagócitos, plaquetas e linfócitos) encontrados no sangue. É acreditado que BMT alogeneico tenha ambos um efeito restaurador e um efeito curativo. O efeito restaurador surge da habilidade das células-tronco em repopular os componentes celulares do sangue. As propriedades curativas de BMT alogeneico derivam em grande parte de um efeito de enxerto-versus-malignidade (GVM) (também referido como efeito de enxerto-versus-tumor (GVT)). As células hematopoiéticas do doador (especificamente, os linfócitos T) são acreditadas atacar as células cancerosas, aumentando os efeitos supressores das outras formas de tratamento. Essencialmente, o efeito de GVM compreende um ataque às células de tumor residuais pelas células sanguíneas derivadas do BMT, tornando menos provável que a malignidade retorne após transplante.

[108] A eficácia de transplante de célula-tronco hematopoiética alogeneico para males hematológicos é limitada pela dificuldade em suprimir doença enxerto-versus-hospedeiro sem comprometer efeitos de enxerto-versus-malignidade. DLI tem sido usada após alotransplante para tratar doença relapsada ou residual, para converter quimerismo misto em doador integral, para restaurar função imune integral como um acréscimo 'add-back' após transplantes depletados em célula T e para profilaxia contra relapso como terapia preemptiva. Na verdade, infusão de linfócito doador proveu um exemplo drástico da potência de GVM, que pode induzir remissões completas e sustentadas em muitos pacientes mesmo quando toda terapia citotóxica falhou. Enquanto DLI pode ser uma opção alternativa muito mais segura do que segundo

HSCT alogeneico, GVHD é uma complicação comum resultando em morbidez e mortalidade significantes (vide Porter D, Levine JE. Graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after donor leukocyte infusion. *Semin Hematol.* 2006 Jan;43:53-61; Ciceri F, Bordignon C. Suicide-gene-Transduced donor T-cells for controlled graft-versus-host disease and graft-versus-tumor. *Int J Hematol.* 2002 Nov;76:305-9). Infelizmente, e como aqui observado, GVHD aguda contribuiu para morte em quase 10% dos pacientes. Na verdade, em alguns casos GVHD induzida por DLI pode ser bastante grave e, é acreditado que entre cerca de 20% a cerca de 35% de recipientes de DLI possam desenvolver GVHD aguda de grau III a IV. Dessa maneira, pode ser dito que controle do efeito de GVM impede aumento do efeito de GVM para GVHD. Portanto, gerenciamento do risco de GVHD enquanto maximizando o efeito de GVM benéfico ampliaria o escopo e utilidade de procedimentos BMT alogênicos.

[109] Como observado aqui, métodos convencionais de redução de GVHD compreendem controle do número de células T administradas durante infusão de linfócito doador. Esse método, no entanto, pode não apenas resultar em um efeito de GVM menor e uma recuperação imune mais lenta, mas pode também causar taxas aumentadas de rejeição de enxerto. Para combater isso, em alguns aspectos da presente descrição estão métodos de tratamento de câncer através do estímulo ou encorajamento de um efeito de GVM através da administração de linfócitos ao paciente que foram modificados de modo a serem pelo menos parcialmente deficientes em HPRT, e então monitoramento do início de GVHD. No início de GVHD, uma ou mais doses terapêuticamente eficazes de MTX podem ser administradas para suprimir, reduzir, controlar ou de outro modo mitigar GVHD. Em algumas modalidades, uma dosagem única de MTX é administrada. Em outras modalidades, a quantidade de MTX administrada depende da severi-

dade do início de GVHD e, com relação a isso, a dose (ou dosagem) de MTX pode ser titulada para obter uma redução desejada em sintomas de GVHD (novamente, com a intenção de equilibrar qualquer efeito de GVM). Em algumas modalidades, a GVM é um efeito de enxerto-versus-leucemia (GVL). Em algumas modalidades, as células T modificadas são providas durante uma administração única. Em outras modalidades, administrações múltiplas das células T modificadas são providas. Em algumas modalidades, as células T modificadas são produzidas de acordo com os métodos (etapas 110 até 140) descritos aqui, tal como ilustrado na Figura 1.

[110] A Figura 3 ilustra um método de redução, supressão ou controle de GVHD quando do início dos sintomas. Inicialmente, as células são coletadas de um doador na etapa 310. As células podem ser coletadas do mesmo doador que proveu as HSC para enxerto (vide etapa 335) ou de um doador diferente. Linfócitos são então isolados das células coletadas (etapa 320) e tratados de modo que eles se tornem deficientes em HPRT (etapa 330). Métodos de tratamento das células isoladas são mostrados aqui. Para se chegar a uma população de células T modificadas que são deficientes em HPRT, as células tratadas são selecionadas e expandidas (etapa 340), tal como aqui descrito. As células T modificadas são então armazenadas para uso posterior.

[111] Um paciente tendo câncer, por exemplo, um câncer hematológico, pode ser tratado de acordo com o padrão de cuidado disponível para o paciente no momento da apresentação e estadiamento do câncer (por exemplo, radiação e/ou quimioterapia, incluindo biológicos) (etapa 315). O paciente pode ser também um candidato para transplante de HSC e, se realmente, um regime de condicionamento (etapa 325) é implementado (por exemplo, através de radiação ou quimioterapia de condicionamento de dose alta). É acreditado que para malig-

nidade, é desejado “limpar” o sistema sanguíneo completamente, ou o mais próximo possível de completamente, desta maneira para matar o máximo possível de células malignas. Os objetivos de tal regime de condicionamento sendo tratar as células de câncer intensivamente, desta maneira tornando uma recorrência de câncer menos provável, inativar o sistema imune para reduzir a chance de uma rejeição de enxerto de célula-tronco e permitir que as células doadoras viajem para a medula. Em algumas modalidades, condicionamento inclui administração de um ou mais de ciclofosfamida, citarabina (AraC), etoposídeo. Melfalano, bussulfano ou irradiação do corpo todo com dose alta. O paciente é então tratado com um enxerto de HSC alogênico (etapa 335). Em algumas modalidades, o enxerto de HSC alogênico induz pelo menos um efeito de GVM, GVT ou GVL parcial.

[112] Seguindo enxerto, o paciente é monitorado (etapa 350) quanto à doença residual ou recorrente. Se tal doença residual ou recorrente se apresentar, as células T modificadas (produzir na etapa 340) são administradas ao paciente (etapa 360) de modo que um efeito de GVM, GVT ou **GVT** pode ser induzido. As células T modificadas podem ser infundidas em uma administração única durante um curso de várias administrações. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas entre cerca de 1 dia e cerca de 21 dias após o enxerto de HSC. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas entre cerca de 1 dia e cerca de 14 dias após o enxerto de HSC. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas entre cerca de 1 dia e cerca de 7 dias após o enxerto de HSC. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas entre cerca de 2 dias e cerca de 4 dias após o enxerto de HSC. Em algumas modalidades, as células T modificadas são administradas contemporaneamente com o enxerto de HSC ou dentro de algumas horas do enxerto de HSC (por exemplo, 1, 2, 3 ou 4 horas

após o enxerto de HSC).

[113] Surgindo os sintomas de GHVD, MTX é administrado ao paciente, ou em uma dose única ou em doses múltiplas. Em algumas modalidades, a quantidade de MTX administrada depende da severidade do início de GVHD e, com relação a isso, a dose (ou dosagens) de MTX pode ser titulada para obter uma redução desejada em sintomas de GVHD e/ou um nível desejado do efeito de GVM, GVT ou GVL.

[114] Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 100 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 90 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 80 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 70 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 60 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 50 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 40 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 30 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 20 mg/m²/infusão a cerca de 20 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 10 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de

8 mg/m²/infusão. Em outras modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2,5 mg/m²/infusão a cerca de 7,5 mg/m²/infusão. Em ainda outras modalidades, uma quantidade de MTX administrada é cerca de 5 mg/m²/infusão. Em modalidades ainda adicionais, uma quantidade de MTX administrada é cerca de 7,5 mg/m²/infusão.

[115] Em algumas modalidades, entre 2 e 6 infusões são feitas, e as infusões podem compreender, cada uma, a mesma dosagem ou dosagens diferentes (por exemplo, dosagens crescentes, dosagens decrescentes, etc.). Em algumas modalidades, as administrações podem ser feitas em uma base semanal ou uma base quinzenal.

Um Interruptor Modulável para Uso em Seleção e Desmarcação de Células T Modificadas por Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)

[116] Receptores de antígeno quiméricos (CARs) são projetados para imunoterapia adotiva através da conexão de um domínio de ligação a antígeno extracelular a um domínio de transmembrana e um domínio de sinalização intracelular (endodomínio). Ela é uma abordagem antitumor útil para erradicar células de tumor através de transferência adotiva de células T expressando receptores de antígeno quiméricos para reconhecer antígenos específicos apresentados em células de tumor e células T ativadas para especificamente lisar essas células de tumor. Um aspecto crítico dessa estratégia de CAR é a seleção de epítomos-alvo que são especificamente ou seletivamente expressos em tumores, estão presentes em todas as células de tumor e são epítomos de membrana não propensos a derramar ou modular a partir da superfície celular. No entanto, idealmente as células T CAR seriam capazes de ser usadas como um reagente ou fármaco universal adequado para qualquer recipiente mamífero (tal como humano). Para empregar as células de tal maneira, deve ser prevenida sua rejeição em uma resposta enxerto-versus-hospedeiro sem comprometer

funções efetoras dependentes de CAR.

[117] Um inconveniente para o uso de células T CAR em indivíduos tem sido o início da Síndrome de Liberação de Citocina (CRS) em alguns recipientes. Toxidez associada à citocina, também referida como uma “tempestade de citocina” ou mais recentemente como síndrome de liberação de citocina (CRS), é uma complicação comum e potencialmente letal de terapia com célula T CAR. CRS é uma toxidez específica não antígeno que pode ocorrer como um resultado dos níveis altos de expansão de célula T CAR e ativação imune tipicamente requerida para mediar benefício clínico usando imunoterapia moderna tal como transferência de célula T CAR. Momento do início dos sintomas e severidade de CRS dependem do agente de indução e da magnitude de ativação de célula imune. Início dos sintomas tipicamente ocorre dias a ocasionalmente semanas após infusão de célula T, coincidindo com expansão de célula T *in vivo* máxima. Nos últimos relatos de CRS seguindo terapia de célula T adotiva para câncer, a incidência e severidade da síndrome são maiores quando pacientes têm cargas de tumor grandes, devido à expressão de produção de citocinas pró-inflamatórias tal como TNF-cc pelas populações de célula T CAR adotivamente transferidas, em expansão e ativadas. CRS associada com terapias de célula T adotiva tem sido consistentemente associada com níveis de IFN γ , IL-6 e TNF α elevados e aumentos em IL-2, fator de estimulação de colônia de granulócitos macrófago (GM-CSF), IL-10, IL-8, IL-5 e fractalcina foram também relatados.

[118] Em um outro aspecto da presente invenção está um método de tratamento de um paciente tendo câncer através da administração de células T CAR modificadas a um paciente com necessidade do mesmo, as células T CAR modificadas sendo deficientes em HPRT. A Figura 4 ilustra um método de tratamento de um paciente tendo câncer e subsequentemente redução, supressão ou controle de efeitos colate-

rais prejudiciais. Inicialmente, as células são coletadas de um doador na etapa 410. Linfócitos são então isolados das células coletadas (etapa 420) e modificados para prover células T CAR que são deficientes em HPRT.

[119] Modificação genética para introdução do construto de CAR em células T pode ser realizada através de transdução (ou de outra maneira administração) de uma composição de célula T com um construto de DNA ou RNA recombinante, tal como, por exemplo, um vetor. A sequência de DNA apropriada pode ser inserida no vetor através de uma variedade de procedimentos mas, em geral, a sequência de DNA é inserida em um sítio(s) de endonuclease de restrição apropriado através de procedimentos conhecidos na técnica. Em adição à introdução do construto de CAR, o shRNA para inativar o gene de HPRT pode ser também incluído (tal como aqui descrito) como outros métodos que podem ser usados para inativar concomitantemente atividade de HPRT.

[120] Como descrito nas Pat. U.S. Nos. 5.359.046, 5.686.281 e 6.103.521 (cujas descrições são aqui incorporadas a título de referência em suas totalidades), o domínio extracelular do receptor quimérico pode ser obtido a partir de qualquer um da ampla variedade de domínios extracelulares ou proteínas secretadas associadas com ligação de ligante e/ou transdução de sinal. O domínio extracelular pode ser parte de uma proteína que é monomérica, homodimérica, heterodimérica ou associada com um número maior de proteínas em um complexo não covalente. Em particular, o domínio extracelular pode consistir em uma cadeia pesada de Ig que pode, por sua vez, ser covalentemente associada com cadeia leve de Ig em virtude da presença de CHI e regiões de dobra, ou pode ser tornar covalentemente associada com outros complexos de cadeia pesada/leve de Ig em virtude da presença de domínios de dobra, CH2 e CH3. No último caso, o complexo

de cadeia pesada/leve que se uniu ao construto quimérico pode constituir um anticorpo com uma especificidade distinta da especificidade de anticorpo do construto quimérico. Dependendo da função do anticorpo, da estrutura desejada e da transdução de sinal, a cadeia inteira pode ser usada ou uma cadeia truncada pode ser usada, onde todo ou uma parte dos domínios CH1, CH2 ou CH3 pode ser removida ou toda ou parte da região de dobra pode ser removida.

[121] Os domínios extracelulares de CARs são frequentemente derivados de imunoglobulinas. O termo “anticorpo” como aqui usado se refere a um peptídeo ou polipeptídeo derivado de, modelado após ou substancialmente codificado por um gene da imunoglobulina ou genes da imunoglobulina, ou fragmentos do mesmo, capazes de especificamente ligar um antígeno ou epítipo. Vide, por exemplo, *Fundamental Immunology*, 3a Edição, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994; *J. Immunol. Methods* 175:267-273; Yarmush (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* 25:85-97. O termo anticorpo inclui porções de ligação a antígeno, isto é, “sítios de ligação a antígeno” (por exemplo, fragmentos, subsequências, regiões de determinação de complementaridade (CDRs)) que retêm a capacidade de ligar antígeno, incluindo (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo nos domínios VL, VH, CL e CH1, (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobra; (iii) um fragmento Fd consistindo nos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo nos domínios VL e VH de um braço único de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward e outros, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste em um domínio VH; e (vi) uma região de determinação de complementaridade (CDR) isolada. Anticorpos de cadeia simples são também incluídos a título de referência no termo “anticorpo”.

[122] Quando um receptor quimérico antitumor é utilizado, o tu-

mor pode ser de qualquer tipo contanto que ele tenha um antígeno de superfície celular que possa ser reconhecido pelo receptor quimérico. Em uma modalidade específica, o receptor quimérico pode ser para qualquer câncer para o qual um anticorpo monoclonal específico existe ou é capaz de ser gerado. Em particular, cânceres tais como neuroblastoma, câncer de pulmão de célula pequena, melanoma, câncer ovariano, carcinoma de célula renal, câncer de cólon, linfoma de Hodgkin e leucemia linfoblástica aguda (por exemplo, leucemia linfoblástica aguda da infância) têm antígenos que podem ser direcionados pelos receptores quiméricos. As composições e métodos disso podem ser usados em imunoterapia no tratamento de câncer, em particular o tratamento de câncer de pulmão, melanoma, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de cólon, carcinoma de célula renal, câncer ovariano, neuroblastoma, rabdomiossarcoma, leucemia e linfoma. As composições e métodos descritos no presente podem ser utilizados em conjunto com outros tipos de terapia para câncer, tais como quimioterapia, cirurgia, radiação, terapia de gene, e outros, como descrito abaixo.

[123] Para se chegar a uma população de células T CAR modificadas que são deficientes em HPRT, as células tratadas são selecionadas e expandidas (etapa 440), tal como descrito aqui. As células T CAR modificadas que são deficientes em HPRT podem ser administradas (etapa 450) ao paciente de modo a se direcionar a certas células de tumor. Se quaisquer efeitos colaterais de terapia T CAR surgirem, MTX pode ser administrado ao paciente (460) para suprimir, reduzir ou controlar os efeitos colaterais. Em algumas modalidades, a quantidade de MTX administrada depende do tipo e/ou severidade dos efeitos colaterais e, com relação a isso, a dose (ou dosagens) de MTX pode ser titulada para obter uma redução desejada nos efeitos colaterais apresentados.

[124] Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 100 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 90 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 80 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 70 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 60 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 50 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 40 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 30 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 20 mg/m²/infusão a cerca de 20 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 10 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 8 mg/m²/infusão. Em outras modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2,5 mg/m²/infusão a cerca de 7,5 mg/m²/infusão. Em ainda outras modalidades, uma quantidade de MTX administrada é cerca de 5 mg/m²/infusão. Em modalidades ainda adicionais, uma quantidade de MTX administrada é cerca de 7,5 mg/m²/infusão.

[125] Em algumas modalidades, entre 2 e 6 infusões são feitas, e as infusões podem compreender, cada uma, a mesma dosagem ou

dosagens diferentes (por exemplo, dosagens crescentes, dosagens decrescentes, etc.). Em algumas modalidades, as administrações podem ser feitas em uma base semanal ou em uma base quinzenal.

Um Interruptor Modulável para Uso em Seleção e Desmarcação de Células T Modificadas com Receptor de Célula T (TCR)

[126] A presente invenção refere-se também a métodos de redução ou melhora, ou prevenção ou tratamento, de doenças e distúrbios usando células T com TCR modificado que são também deficientes em HPRT. Inicialmente, as células são coletadas de um doador. Linfócitos são então isolados das células coletadas e modificados para prover células T com TCR modificado que são deficientes em HPRT. Se quaisquer efeitos colaterais de terapia com célula T com TCR modificado surgirem, MTX pode ser administrado ao paciente para suprimir, reduzir ou controlar efeitos colaterais.

[127] Células T (também conhecidas como linfócitos T) são encontradas amplamente distribuídas dentro de tecidos e no ambiente do tumor. Elas desempenham um papel central em imunidade mediada por célula e podem mediar respostas de memória de vida longa, específicas de antígeno, efectoras e imunes. Células T são distinguidas de outros linfócitos pela presença de receptores de célula T (TCRs) sobre a superfície da célula. O TCR é um complexo de transmembrana de subunidades múltiplas que faz mediação da ativação específica de antígeno de células T. O TCR é composto de duas cadeias de polipeptídeo diferentes, as cadeias α e β de TCR. Ambas as cadeias têm uma região variável N-terminal e uma região constante. As cadeias são ligadas por uma ligação dissulfeto, com cada receptor provendo um sítio de ligação de antígeno. Estimulação do TCR é disparada por moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (proteínas que controlam respostas imunes, codificadas por um *locus* genético compreendendo uma família de genes altamente polimórficos) em cé-

lulas apresentando antígeno que apresentam peptídeos de antígeno para as células T e se ligam aos complexos de TCR para induzir uma série de cascatas de sinalização intracelular.

[128] Mais especificamente, o TCR é geralmente composto de seis cadeias ligadas à membrana diferentes que formam o heterodímero de TCR responsável por reconhecimento de ligante. TCRs existem em formas alfa/beta e gama/delta, que são estruturalmente similares, mas têm locais anatômicos e funções distintos. Em uma modalidade, o TCR compreende uma cadeia alfa e beta de TCR, de modo que o ácido nucleico codificando o TCR compreende um ácido nucleico codificando uma cadeia alfa de TCR e uma beta de TCR. Em uma outra modalidade, uma cadeia alfa ou beta ou ambas compreendem pelo menos uma N-desglicosilação. Cada cadeia é composta de dois domínios extracelulares, um domínio variável e um constante. Em uma modalidade, o TCR compreende pelo menos uma região constante de murino. O domínio constante está próximo da membrana celular, seguido por um domínio de transmembrana e uma cauda citoplásmica curta. Em uma modalidade, o domínio de sinalização coestimulador é um domínio de sinalização coestimulador 4-1BB. Os domínios variáveis contribuem para a determinação do antígeno particular e molécula do MHC que o TCR tem especificidade de ligação. Por sua vez, a especificidade de uma célula T para um complexo de antígeno-MHC único reside no TCR particular expresso pela célula T. Cada um dos domínios constantes e variáveis pode incluir uma ligação dissulfeto intracadeia. Os domínios variáveis incluem as alças altamente polimórficas análogas às regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de anticorpos. A diversidade de sequências de TCR é gerada através de rearranjo somático de genes variáveis (V), de diversidade (D), união (J) e constantes ligados. Polipeptídeos de cadeias alfa e gama funcionais são formados por regiões V-J-C rearranjadas, enquanto cadei-

as beta e delta consistem em regiões V-D-J-C. O domínio constante extracelular inclui uma região de membrana proximal e uma região de imunoglobulina.

[129] O TCR confere especificidade antigênica à célula T, através de reconhecimento de um ligante de antígeno compreendendo uma sequência de aminoácido contígua de uma proteína que é apresentada sobre a célula-alvo por uma molécula do complexo de histocompatibilidade principal. Moléculas de adesão acessório expressas por células T, tal como CD4 para classe II do MHC e CD8 para classe I do MHC, estão também envolvidas. O TCR interage com esse ligante ao fazer contatos com ambos a molécula de MHC e o peptídeo antigênico. Transdução de sinal é através do complexo invariante associado CD3, que é composto de quatro proteínas CD3 diferentes que formam dois heterodímeros (CD3 $\delta\epsilon$ e CD3 $\gamma\epsilon$) e um homodímero (CD3 $\zeta\zeta$).

[130] Seguindo contato com seus peptídeos cognatos apresentados por moléculas de classe I do MHC, células T citotóxicas CD8⁺ puras proliferam vigorosamente e adquirem propriedades fenotípicas e funcionais que permitem que elas ajam como células T efetoras; essas eliminam células expressando o antígeno, através de ligantes de indução de apoptose ou liberação de grânulos líticos. Ainda, células T de memória de duração longa são geradas, as quais podem se autorrenovar, permitindo expansão rápida na presença do antígeno-alvo e provisão de uma resposta sustentada e durável a ele quando da reexposição. A função de células T como orquestradores e efetores da resposta imune adaptativa é direcionada pela especificidade do TCR.

[131] Células T internalizam, classificam e degradam todo o receptor de célula T como um complexo, com uma meia-vida de cerca de 10 horas em células T em repouso e 3 horas em células T estimuladas (von Essen, M. e outros, 2004, J. Immunol. 173:384-393). Funcionamento apropriado do complexo de TCR requer a razão estequio-

métrica apropriada das proteínas que compõem o complexo de TCR. Funcionamento de TCR também requer duas proteínas zeta de TCR funcionais com motivos ITAM. A ativação do TCR quando da participação de seu ligante de MHC-peptídeo requer a participação de vários TCRs na mesma célula T, todos devem sinalizar apropriadamente. Portanto, se um complexo de TCR for desestabilizado com proteínas que não associam apropriadamente ou não podem sinalizar otimamente, a célula T não se tornará ativada suficientemente para começar uma resposta celular.

[132] Terapias com TCR geneticamente modificado são baseadas em alteração de especificidade de célula T através da expressão de cadeias α e β de TCR, que fazem a mediação do processo de reconhecimento de antígeno. As cadeias α e β de TCR específicas de tumor são identificadas, isoladas e clonadas em vetores de transdução e transdução de células T cria células T específicas de antígeno de tumor. Em algumas modalidades, expressão de TCR é modificada usando shRNAs que se direcionam a ácidos nucleicos codificando TCRs específicos (por exemplo, TCR- α e TCR- β) e/ou cadeias CD3 em células T primárias. Através do bloqueio de expressão de uma ou mais dessas proteínas, a célula T não produzirá mais um ou mais dos componentes-chave do complexo de TCR. Expressão de shRNAs em células T primárias pode ser obtida usando qualquer sistema de expressão convencional, por exemplo, um sistema de expressão lentiviral. mRNAs TCR-alfa, TCR-beta, TCR-gama, TCR-delta, CD3-gama, CD3-delta, CD3-epsilon ou CD3-zeta podem ser direcionados separadamente ou juntos usando uma variedade de shRNAs de direcionamento. Em algumas modalidades, as células T com TCR geneticamente modificado são tornadas deficientes em HPRT, tal como através da inativação do gene de HPRT com um shRNA anti-HPRT como aqui descrito.

[133] Em outras modalidades, para gerar um TCR específico de tumor bem-sucedido, uma sequência-alvo apropriada é primeiro identificada. Essa seria isolada de uma célula T reativa a tumor rara ou, onde isso não for possível, tecnologias alternativas podem ser empregadas para gerar antígenos de célula T antitumor altamente ativos. Uma abordagem é imunizar camundongos transgênicos que expressam o sistema de antígeno leucocitário humano (HLA) com proteínas de tumor humanas para gerar células T expressando TCRs contra antígenos humanos (Stanislawski e outros, 2001). Uma abordagem alternativa é transferência de gene de TCR alogênica, em que células T específicas de tumor são isoladas de um paciente tendo remissão de tumor e as sequências de TCR reativas são transferidas para células T de um outro paciente que compartilha a doença, mas não é responsivo (Gao e outros, 2000; de Witte e outros, 2006). Finalmente, tecnologias *in vitro* podem ser empregadas para alterar a sequência do TCR, aumentando sua atividade de morte de tumor através do aumento da resistência da interação (avidez) de um TCR específico de tumor fracamente reativo (com antígeno-alvo (Robbins e outros, 2008; Schmidt e outros, 2010).

[134] Seguindo geração das células T com TCR geneticamente modificado, as células modificadas são administradas a um paciente com necessidade de tratamento. Se efeitos colaterais surgirem a partir do tratamento, MTX pode ser administrado para diminuir ou erradicar tais efeitos colaterais (por exemplo, GVHD ou sintomas de GVHD). Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 100 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 90 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 80 mg/m²/infusão.

Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 70 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 60 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 50 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 40 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 30 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 20 mg/m²/infusão a cerca de 20 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 10 mg/m²/infusão. Em algumas modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 8 mg/m²/infusão. Em outras modalidades, uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2,5 mg/m²/infusão a cerca de 7,5 mg/m²/infusão. Em ainda outras modalidades, uma quantidade de MTX administrada é cerca de 5 mg/m²/infusão. Em modalidades ainda adicionais, uma quantidade de MTX administrada é cerca de 7,5 mg/m²/infusão.

[135] Em algumas modalidades, entre 2 e 6 infusões são feitas, e as infusões podem compreender, cada uma, a mesma dosagem ou dosagens diferentes (por exemplo, dosagens crescentes, dosagens decrescentes, etc.). Em algumas modalidades, as administrações podem ser feitas em uma base semanal ou uma base quinzenal.

EXEMPLOS

Exemplo 1

[136] As células T CAR são produzidas infectando as células com

o construto de CAR em tandem com o shRNA para HPRT. Esse é um vetor lentiviral único com o CAR e shRNA direcionados por promotores diferentes (Pol II e Pol III, respectivamente). É acreditado que se shRNA se direcionando a HPRT estiver dentro de uma estrutura principal de miRNA, ele poderia ser expresso a partir de um promotor Pol II (pode ser até mesmo o mesmo promotor).

[137] As células shHPRT T CAR transduzidas são então infundidas em um paciente leucêmico e resposta antileucemia monitorada enquanto, se necessário, expandido as células shHPRT T CAR com 6TG. Uma vez o efeito sendo impactante, uma estratégia de desligamento usando metotrexato para matar as células shHPRT T CAR transduzidas pode ser compreendida. Essa estratégia de morte-desligamento é posta em prática se uma resposta inflamatória ou proliferação clonal indevida das células shHPRT T CAR for vista. Deve ser observado que alguns antígenos antileucemia estão também presentes em células saudáveis normais e podem dar origem a um efeito indevido. Portanto, aplicação desta estratégia de seleção/suicida aumenta o perfil de eficácia/segurança.

Exemplo 2

[138] Em transplante de medula óssea alogênico para malignidade hematológica, células T doadoras são incluídas com transplante de medula óssea para efeito antitumor. Isso é importante para eliminar doença residual seguindo condicionamento pré-transplante. Neste exemplo, as células T doadoras são transduzidas com um vetor lentiviral contendo shRNA para HPRT antes da infusão e uma vez infundida o impacto da célula T doadora é avaliado. Uma vez que o efeito de Enxerto vs Leucemia (GVL) é monitorado, se houver doença Enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) consequente, isso pode ser melhorado usando o interruptor de “morte” com metotrexato. Isso permite GVL sem GVHD consequente.

Exemplo 3

[139] Em transplante de medula óssea alogeneico há uma recuperação imune retardada com um risco de infecção por agente adventício. Para se proteger contra isso e manter atividade de célula T, são dadas células T doadoras que foram transduzidas com um vetor lentiviral contendo HPRT. Com o tempo isso proverá controle auxiliar sobre infecções potenciais até que células T derivadas da célula-tronco transplantada da medula óssea reconstituam o sistema hematopoiético. Se houver resposta inflamatória indevida ou qualquer outro AE relacionado à célula T doadora, eles serão eliminados usando metotrexato. Isso permite controle imune anti-infecção sem GVHD.

Exemplo 4

[140] Um paciente tem leucemia. Suas próprias células T alogênicas ou compatíveis são pegas e cultivadas em cultura de tecido com citocinas de apoio, por exemplo, IL2 ou IL7, tempo durante o qual elas são transduzidas (infectadas levando à expressão de transgene) com um vetor lentiviral autoinativador que contém três elementos, isto é, direcionamento a tumor, maquinário de lise celular e um vetor incluindo componentes para inativar HPRT. Essas células modificadas com gene a 1×10^6 a 2×10^8 células/metro² são infundidas no paciente após uma dose de Cytosan IV, por exemplo, a 500 mg/metro² IV (para criar espaço para as células T CAR introduzidas). Neste exemplo, as células T CAR modificadas com gene têm algum efeito sobre leucemia. A carga de célula leucêmica é monitorada, por exemplo, através de contagens sanguíneas diferenciais, e se o médico desejar mais morte de célula de tumor, 0,4 mg/kg de 6TG é dado ao paciente IV para aumentar o número relativo de células T CAR direcionadas a tumor através da seleção dessas células. Se as células T CAR exercerem seu efeito antileucemia positivo mas houve uma “ativação excessiva” levando a, por exemplo, tempestade de citocina inflamatória, então o reverso po-

de ocorrer em que as células T CAR são mortas usando infusão IV de metotrexato, por exemplo, a 100 mg de dose total.

Exemplo 5 – Redução versus Inativação de HPRT com Seleção de 6TG

[141] Células K562 foram transduzidas com um vetor incluindo uma sequência de ácido nucleico projetada para reduzir a expressão de HPRT e uma sequência de ácido nucleico codificando a proteína verde fluorescente (GFP) (MOI=1/2/5); ou foram transfectadas com uma nanocápsula incluindo CRISPR/Cas9 e um sgRNA para HPRT (100 ng/5x10⁴ células) no dia zero (0). 6-TG foi adicionada ao meio a partir do dia 3 até o dia 14. O meio foi renovado a cada 3 a 4 dias. GFP foi analisado em máquina de fluxo e InDel% conforme analisado com ensaio T7E1. A Figura 9A ilustra que a população de GFP+ de células K562 transduzidas aumentou do dia 3 até o dia 14 sob tratamento de 6TG; enquanto a população de GFP+ era quase estável sem tratamento com 6-TG. A Figura 9B ilustra que população com HPRT inativada de células K562 aumentou do dia 3 até o dia 14 sob tratamento de 6TG e dosagens maiores (900 nM) de 6TG levaram à seleção mais rápida comparado com uma dosagem de 300/600 nM de 6TG. Deve ser notado que processo de seleção de 6TG ocorreu muito mais rápido em células com HPRT inativa comparado com as células com redução na expressão de HPRT (MOI=1) na mesma concentração de 300 nM de 6TG a partir do dia 3 até o dia 14. A diferença entre redução e inativação poderia ser explicada por algum nível de HPRT residual através da abordagem de redução de RNAi comparado com a eliminação completa de HPRT pela abordagem de inativação. Portanto, células com HPRT inativada foram acreditadas ter uma tolerância muito maior contra 6TG e são acreditadas crescer muito mais rápido em dosagens maiores de 6TG (900 nM) comparado com células com redução na expressão de HPRT.

[142] Células CEM foram transduzidas com um vetor incluindo uma sequência de ácido nucleico projetada para reduzir a expressão de HPRT e uma sequência de ácido nucleico codificando a proteína verde fluorescente ou transfectada com uma nanocápsula incluindo CRISPR/Cas9 e um sgRNA para HPRT no dia 0. 6-TG foi adicionada ao meio a partir do dia 3 até o dia 17. O meio foi renovado a cada 3 a 4 dias. GFP foi analisado em máquina de fluxo e InDel% é analisado através do ensaio T7E1. A Figura 10A ilustra que a população de GFP+ de células K562 transduzidas aumentou do dia 3 até o dia 17 sob tratamento de 6TG enquanto população de GFP+ era quase estável sem 6TG. A Figura 10B mostra que população com inativação de HPRT de células CEM aumentou do dia 3 até o dia 17 sob tratamento de 6TG e que uma dosagem maior (900 nM) de 6TG leva a uma seleção mais rápida comparado com uma dosagem de 300/600 nM de 6TG. Deve ser notado que processo de seleção de 6TG ocorreu mais rápido em células de inativação de HPRT ao invés de células de redução de expressão de HPRT (MOI=1) na mesma concentração de 6TG a partir do dia 3 até o dia 17.

Exemplo 6 – Seleção Negativa com MTX ou MPA

[143] Células K562 transduzidas ou transfectadas (tais como aquelas do Exemplo 6) foram cultivadas com ou sem MTX a partir do dia 0 até o dia 14. O meio foi renovado a cada 3 a 4 dias. GFP foi analisado em máquina de fluxo e InDel% foi analisado através do ensaio T7E1. A Figura 11A mostra que a população GFP- de células K562 transduzidas diminuiu sob o tratamento de 0,3 uM de MTX enquanto a população de célula era estável sem MTX. A Figura 11B ilustra que as células K562 transfectadas foram eliminadas sob tratamento com 0,3 uM de MTX em um passo mais rápido comparado com a população de HPRT-KD.

[144] Células CEM transduzidas ou transfectadas (tais como

aquelas do Exemplo 6) foram cultivadas com ou sem MTX a partir do dia 0 até o dia 14. O meio foi renovado a cada 3 a 4 dias. GFP foi analisado em máquina de fluxo e InDel% foi analisado através do ensaio T7E1. A Figura 121A mostra que a população GFP- de K562 transduzida diminuiu sob o tratamento de 1 μ M de MPA ou 0,3 μ M de MTX ou 10 μ M de MPA enquanto a população de células era estável para o grupo não tratado. A Figura 12B ilustra que a população de inativação de HPRT de células CEM foi eliminada em um passo mais rápido sob o tratamento de 1 μ M de MPA ou 0,3 μ M de MTX ou 10 μ M de MPA.

Exemplo 7 – Seleção Negativa com MTX para Células K562

[145] Células K562 foram transduzidas ou com sopa de vírus TL20cw-GFP em fator de diluição de 16, sopa de vírus TL20cw-Ubc/GFP-7SK/sh734 (um GFP de codificação sequencial e um shRNA projetado para reduzir a expressão de HPRT) em fator de diluição de 16 e sopa de vírus TL20cw-7SK/sh734-UBC/GFP (uma codificando sequencialmente um shRNA projetado para reduzir a expressão de HPRT e GFP) em fator de diluição de 16, respectivamente (vide Figura 13). Todas as células foram cultivadas com meio contendo 0,3 μ M de MTX 3 dias depois. São também mostradas na Figura 13 células K562 que foram transduzidas por sopa de vírus TL20cw-7SK/sh734-UBC/GFP (uma codificando um ácido nucleico codificando um shRNA projetado para reduzir a expressão de HPRT) em fator de diluição de 1024 um mês antes e onde células transduzidas com GFP-sh734 foram positivamente selecionadas com 300 nM de 6TG 6-TG foi seleção durante esse momento para obter mais de 90% de população de GFP+. Como ilustrado na Figura 13, partindo de >90% de população de GFP+, células transduzidas com GFP ou GFP-sh734 não mostraram uma redução na população de GFP+ enquanto as células transduzidas com sh734-GFP em níveis de diluição alto e diluição baixo mostraram desmarcação da população de GFP+. A expressão de

sh734 relativa para VCN para células transduzidas com sh734-GFP e células transduzidas com GFP-sh73 foi medida. Os resultados sugerem que metotrexato poderia apenas desmarcar células transduzidas com vetor lentiviral de expressão alta sh734 (TL20cw-7SK/sh734-UBC/GFP) e não com o vetor lentiviral de expressão baixa sh734 (TL20cw-UBC/GFP-7SK/sh734). Esse exemplo demonstra que projetos de vetor diferentes (mesmo aqueles tendo o mesmo shRNA) tinham um impacto sobre expressão do grampo-de-cabelo de shRNA e poderiam determinar se células transduzidas poderiam ser desmarcadas ou não por MTX.

DECLARAÇÃO DE APLICABILIDADE INDUSTRIAL

[146] A presente descrição tem aplicabilidade industrial no campo de Medicina, por exemplo, terapia de gene.

MODALIDADES ADICIONAIS

[147] Modalidade 1 Adicional. Um método de provisão de benefícios de uma infusão de linfócito enquanto mitigando efeitos colaterais em um paciente compreendendo (i) administrar células T modificadas que são deficientes em HPRT ao paciente; e (ii) administrar MTX ao paciente quando do início de efeitos colaterais.

[148] Modalidade 2 Adicional. O método da modalidade 1 adicional, em que os efeitos colaterais são selecionados do grupo consistindo em aGVHD ou cGVHD.

[149] Modalidade 3 Adicional. O método da modalidade 1 adicional, em que as células T modificadas são administradas em uma dose única.

[150] Modalidade 4 Adicional. O método da modalidade 3 adicional, em que uma quantidade de células T modificadas administradas na dose única varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6$ células/kg de peso corporal a cerca de 730×10^6 células/kg de peso corporal.

[151] Modalidade 5 Adicional. O método da modalidade 1 adicional,

nal, em que as células T modificadas são administradas em doses múltiplas.

[152] Modalidade 6 Adicional. O método da modalidade 5 adicional, em que uma quantidade de células T modificadas por dose varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6$ células/kg de peso corporal a cerca de 120×10^6 células/kg de peso corporal.

[153] Modalidade 7 Adicional. O método da modalidade 1 adicional, em que o MTX é administrado como uma dose única.

[154] Modalidade 8 Adicional. O método da modalidade 1 adicional, em que doses múltiplas do MTX são administradas.

[155] Modalidade 9 Adicional. O método da modalidade 1 adicional, em que uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 8 mg/m²/infusão.

[156] Modalidade 10 Adicional. O método da modalidade 9 adicional, em que a quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2,5 mg/m²/infusão a cerca de 7,5 mg/m²/infusão.

[157] Modalidade 11 Adicional. O método da modalidade 1 adicional compreendendo ainda (i) monitorar uma redução nos efeitos colaterais e (ii) administrar células T modificadas adicionais que são deficientes em HPRT ao paciente.

[158] Modalidade 12 Adicional. Um método de indução de um efeito enxerto-versus-malignidade em um paciente seguindo transplante de célula tronco compreendendo (i) administrar células T modificadas que são deficientes em HPRT ao paciente; (ii) monitorar o paciente quanto a um início de efeitos colaterais; e (iii) administrar MTX ao paciente quando do início dos efeitos colaterais.

[159] Modalidade 13 Adicional. O método da modalidade 12 adicional, em que os efeitos colaterais são selecionados do grupo consistindo em aGVHD ou cGVHD.

[160] Modalidade 14 Adicional. O método da modalidade 12 adi-

cional, em que as células T modificadas são administradas em uma dose única.

[161] Modalidade 15 Adicional. O método da modalidade 14 adicional, em que uma quantidade de células T modificadas administradas na dose única varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6$ células/kg de peso corporal a cerca de 730×10^6 células/kg de peso corporal.

[162] Modalidade 16 Adicional. O método da modalidade 12 adicional, em que as células T modificadas são administradas em doses múltiplas.

[163] Modalidade 17 Adicional. O método da modalidade 16 adicional, em que uma quantidade de células T modificadas administradas por dose varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6$ células/kg de peso corporal a cerca de 240×10^6 células/kg de peso corporal.

[164] Modalidade 18 Adicional. O método da modalidade 12 adicional, em que o MTX é administrado como uma dose única.

[165] Modalidade 19 Adicional. O método da modalidade 12 adicional, em que doses múltiplas do MTX são administradas.

[166] Modalidade 20 Adicional. O método da modalidade 12 adicional, em que uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de $2 \text{ mg/m}^2/\text{infusão}$ a cerca de $8 \text{ mg/m}^2/\text{infusão}$.

[167] Modalidade 21 Adicional. O método da modalidade 20 adicional, em que a quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de $2,5 \text{ mg/m}^2/\text{infusão}$ a cerca de $7,5 \text{ mg/m}^2/\text{infusão}$.

[168] Modalidade 22 Adicional. Um método de preservação de um efeito enxerto-versus-malignidade enquanto mitigando doença enxerto-versus-hospedeiro em um indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de células T modificadas seguindo um transplante de célula-tronco, monitorar o paciente quanto ao início de GVHD e administrar MTX quando do início de GVHD.

[169] Modalidade 23 Adicional. O método da modalidade 22 adicional, em que o efeito enxerto-versus-malignidade é um efeito de enxerto-versus-leucemia.

[170] Modalidade 24 Adicional. Um método de tratamento de câncer compreendendo (i) administrar uma imunoterapia adotiva modificada por gene que é deficiente em HPRT a um indivíduo com necessidade do mesmo; (ii) monitorar o sujeito quando a um início de efeitos colaterais; e (iii) administrar MTX quando do início de efeitos colaterais.

[171] Modalidade 25 Adicional. O método da modalidade 24 adicional, em que os efeitos colaterais são selecionados do grupo consistindo em aGVHD ou cGVHD.

[172] Modalidade 26 Adicional. O método da modalidade 24 adicional, em que as células T modificadas são administradas em uma dose única.

[173] Modalidade 27 Adicional. O método da modalidade 26 adicional, em que uma quantidade de células T modificadas administradas na dose única varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6$ células/kg de peso corporal a cerca de 730×10^6 células/kg de peso corporal.

[174] Modalidade 28 Adicional. O método da modalidade 24 adicional, em que as células T modificadas são administradas em doses múltiplas.

[175] Modalidade 29 Adicional. O método da modalidade 28 adicional, em que uma quantidade de células T modificadas administradas por dose varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6$ células/kg de peso corporal a cerca de 240×10^6 células/kg de peso corporal.

[176] Modalidade 30 Adicional. O método da modalidade 24 adicional, em que o MTX é administrado como uma dose única.

[177] Modalidade 31 Adicional. O método da modalidade 24 adicional, em que doses múltiplas do MTX são administradas.

[178] Modalidade 32 Adicional. O método da modalidade 24 adicional, em que uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 8 mg/m²/infusão.

[179] Modalidade 33 Adicional. O método da modalidade 32 adicional, em que a quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2,5 mg/m²/infusão a cerca de 7,5 mg/m²/infusão.

[180] Modalidade 34 Adicional. O método da modalidade 24 adicional, em que a imunoterapia adotiva modificada com gene é selecionada do grupo consistindo em células modificadas com CAR, células modificadas com CAR autólogas e alogênicas, células modificadas com CAR autólogas e células modificadas com TCR alogênicas.

[181] Modalidade 35 Adicional. Um método de tratamento de um paciente com câncer que recebeu um transplante de célula hematopoiética alogeneico compreendendo administrar ao dito paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz de células T modificadas, as células T modificadas sendo deficientes em HPRT; monitorar quanto a um início de efeitos colaterais resultantes da administração das células T modificadas; e administrar MTX para suprimir, reduzir ou controlar o efeito colateral enquanto mantendo uma reação enxerto-versus-malignidade eficaz para eliminar ou reduzir o número de células de câncer no paciente.

[182] Modalidade 36 Adicional. O método da modalidade 35 adicional compreendendo ainda administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um corticosteroide.

[183] Modalidade 37 Adicional. Um método de tratamento de câncer compreendendo (i) administrar a um paciente tendo câncer uma quantidade terapeuticamente eficaz de células T modificadas substancialmente purificadas, as células T modificadas sendo deficientes em HPRT; e (ii) monitorar o paciente quanto à presença de câncer e quanto ao início de GVHD, em que uma quantidade terapeuticamen-

te eficaz de MTX é administrada quando do início de GVHD.

[184] Modalidade 38 Adicional. Um método de prevenção ou mitigação de imunodeficiência pós-transplante em um paciente seguindo um transplante de célula-tronco, compreendendo (i) administrar células T modificadas que são deficientes em HPRT ao paciente; (ii) monitorar o paciente quanto a um início de efeitos colaterais; e (ii) administrar MTX ao paciente quando do início de efeitos colaterais, em que uma quantidade do MTX administrado varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 8 mg/m²/infusão.

[185] Modalidade 39 Adicional. O método da modalidade 38 adicional, em que o MTX é administrado em uma dose única.

[186] Modalidade 40 Adicional. O método da modalidade 38 adicional, em que doses múltiplas de MTX são administradas.

[187] Modalidade 41 Adicional. O método da modalidade 40 adicional, em que as doses de MTX são tituladas.

[188] Modalidade 42 Adicional. O método da modalidade 38 compreendendo ainda administrar células T modificadas adicionais seguindo tratamento com MTX.

[189] Modalidade 43 Adicional. O método da modalidade 42 adicional, em que uma quantidade das células T modificadas adicionais administradas seguindo tratamento com MTX varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6$ células/kg de peso corporal a cerca de 240×10^6 células/kg de peso corporal.

[190] Modalidade 44 Adicional. Um método de aumento da segurança de (i) reconstituição do sistema imune de um paciente ou (ii) indução ou manutenção de um efeito de GVM, ambos seguindo tradução de célula-tronco, compreendendo (a) administrar células T modificadas ao paciente que são sensíveis a MTX; (b) monitorar o paciente quanto a um início de efeitos colaterais e (c) administrar MTX ao paciente quando do início dos efeitos colaterais.

[191] Modalidade 45 Adicional. O método da modalidade 44 adicional, em que as células T modificadas que são sensíveis a MTX são produzidas através de (i) isolamento de linfócitos de células coletadas a partir de um doador, (ii) conferência de quimioproteção contra citotoxicidade por 6-tioguanina a pelo menos uma porção dos linfócitos isolados; (iii) seleção e expansão da porção dos linfócitos isolados tendo quimioproteção contra 6-tioguanina através de contato dos linfócitos isolados com 6TG.

[192] Modalidade 46 Adicional. Células T modificadas produzidas através de: (i) isolamento de linfócitos a partir de células coletadas de um doador; (ii) tratamento dos linfócitos isolados para prover pelo menos uma população de células deficientes em HPRT dentro da população total de linfócitos isolados; e (iii) seleção e expansão da população de células deficientes em HPRT através de contato da população total de linfócitos isolados com 6TG.

[193] Modalidade 47 Adicional. As células T modificadas da modalidade 46 adicional, em que a etapa de tratamento dos linfócitos isolados compreende contato dos linfócitos isolados com um vetor lentiviral autoinativador codificando uma sequência de ácido nucleico tendo pelo menos 80% de identidade de sequência com aquela da SEQ ID NO: 1.

[194] Modalidade 48 Adicional. As células T modificadas da modalidade 46 adicional, em que a etapa de tratamento dos linfócitos isolados compreende contato dos linfócitos isolados com uma ferramenta de edição de gene selecionada do grupo consistindo em CRISPR/Cas9 RNP, uma proteína dedo-de-zinco, TALONS e ARUCS.

[195] Modalidade 49 Adicional. Um método de provisão de benefícios de uma infusão de linfócito enquanto mitigando efeitos colaterais em um paciente compreendendo: realizar uma seleção *ex vivo*, em que a seleção *ex vivo* compreende tratar uma população de células T

geneticamente modificadas com 6TG, as células T geneticamente modificadas sendo deficientes em HPRT; administrar as células T modificadas selecionadas *ex vivo* a um paciente com necessidade das mesmas; e realizar uma seleção *in vivo*, em que a seleção *in vivo* compreende administrar MTX ao paciente.

[196] Modalidade 50 Adicional. O método da modalidade 49 adicional, em que as células T geneticamente modificadas são preparadas através de tratamento de linfócitos isolados com um vetor lentiviral autoinativador codificando uma sequência de ácido nucleico tendo pelo menos 80% de identidade de sequência com aquela de SEQ ID NO: 1.

[197] Modalidade 51 Adicional. O método da modalidade 49 adicional, em que as células T geneticamente modificadas são preparadas através de tratamento dos linfócitos isolados com uma ferramenta de edição de gene selecionada do grupo consistindo em CRISPR/Cas9 RNP ou uma proteína dedo-de-zinco.

[198] Modalidade 52 Adicional. O método da modalidade 49 adicional, em que o MTX é administrado ao paciente seguindo o início de efeitos colaterais a partir do tratamento com as células T modificadas selecionadas *ex vivo*.

[199] Modalidade 53 Adicional. O método da modalidade 49 adicional compreendendo ainda a etapa de administração de pelo menos uma dose adicional de células T modificadas selecionadas *ex vivo* seguindo tratamento com MTX.

[200] Modalidade Adicional 54. Um método de prevenção ou mitigação de imunodeficiência pós-transplante em um paciente seguindo um transplante de célula-tronco compreendendo (i) administrar células T modificadas que são deficientes em HPRT ao paciente, em que uma quantidade das células T modificadas varia de a partir de cerca de $0,1 \times 10^6$ células/kg de peso corporal a cerca de 730×10^6 células/kg de

peso corporal, (ii) monitorar o paciente quanto a um início de efeitos colaterais; e (ii) administrar MTX ao paciente quando do início de efeitos colaterais, em que uma quantidade do MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 8 mg/m²/infusão.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de provisão de benefícios de uma infusão de linfócito a um paciente com necessidade de tratamento com o mesmo enquanto mitigando efeitos colaterais caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) gerar linfócitos deficientes em HPRT a partir de uma amostra de doador;
- (b) selecionar positivamente os linfócitos deficientes em HPRT *ex vivo* para prover uma população de linfócitos modificados;
- (c) administrar um enxerto de HSC ao paciente;
- (d) administrar a população de linfócitos modificados ao paciente seguindo a administração do enxerto de HSC; e
- (e) opcionalmente administrar MTX se os efeitos colaterais surgirem.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os linfócitos deficientes em HPRT são gerados através de redução da expressão do gene de HPRT.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os linfócitos deficientes em HPRT são gerados através de inativação do gene de HPRT.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a seleção positiva compreende contato dos linfócitos deficientes em HPRT gerados com um análogo de purina.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o análogo de purina é 6TG.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que uma quantidade de 6TG é entre cerca de 1 a cerca de 15 µg/mL.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a seleção positiva compreende contato dos linfócitos

deficientes em HPRT gerados com ambos análogo de purina e alopurinol.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o enxerto de HSC é administrado ao paciente seguindo condicionamento mieloablativo.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os linfócitos modificados são administrados como um bolo único.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que doses múltiplas dos linfócitos modificados são administradas.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que cada dose compreende entre cerca de $0,1 \times 10^6$ células/kg a cerca de 240×10^6 células/kg.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que uma dosagem total de linfócitos modificados compreende entre cerca de $0,1 \times 10^6$ células/kg a cerca de 730×10^6 células/kg.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a administração dos linfócitos modificados acontece 2 a 4 semanas após a administração do enxerto de HSC.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o MTX é administrado quando do diagnóstico de GVHD.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de $2 \text{ mg/m}^2/\text{infusão}$ a cerca de $100 \text{ mg/m}^2/\text{infusão}$.

16. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o MTX é administrado em doses tituladas.

17. Método de provisão de benefícios de infusão de linfócito

a um paciente com necessidade de tratamento do mesmo enquanto mitigando efeitos colaterais caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) gerar linfócitos deficientes em HPRT a partir de uma amostra de doador;
- (b) selecionar positivamente os linfócitos deficientes em HPRT *ex vivo* para prover uma população de linfócitos modificados; e
- (c) administrar a população de linfócitos modificados ao paciente contemporaneamente com ou após uma administração de um enxerto de HSC.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que compreende ainda administrar MTX se os efeitos colaterais surgirem.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 100 mg/m²/infusão.

20. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 8 mg/m²/infusão.

21. Método de tratamento de um câncer hematológico em um paciente com necessidade de tratamento do mesmo caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) gerar linfócitos deficientes em HPRT a partir de uma amostra de doador;
- (b) selecionar positivamente os linfócitos deficientes em HPRT *ex vivo* para prover uma população de linfócitos modificados;
- (c) induzir pelo menos um efeito parcial enxerto-versus-malignidade através da administração de um enxerto de HSC ao paciente; e
- (d) administrar a população de linfócitos modificados ao paciente seguindo a detecção de doença residual ou recorrência de doença.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar uma ou mais doses de MTX.

23. Método de tratamento de câncer em um paciente com necessidade de tratamento do mesmo caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) gerar células T CAR que incluem um receptor antitumor quimérico e que são deficientes em HPRT;
- (b) selecionar positivamente as células T CAR deficientes em HPRT *ex vivo* para prover uma população de células T CAR para administração; e
- (c) administrar a população de células T CAR ao paciente.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que compreende ainda administrar pelo menos uma dose de MTX para suprimir pelo menos um sintoma de GVHD ou CRS.

25. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que as células T CAR deficientes em HPRT são geradas através de redução de expressão do gene de HPRT.

26. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2 mg/m²/infusão a cerca de 100 mg/m²/infusão.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que uma quantidade de MTX administrada varia de a partir de cerca de 2,5 mg/m²/infusão a cerca de 7,5 mg/m²/infusão.

28. Método de tratamento de câncer em um paciente com necessidade de tratamento do mesmo caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) gerar células T específicas de antígeno de tumor que são deficientes em HPRT;
- (b) selecionar positivamente células T específicas de antígeno de

tumor deficientes em HPRT *ex vivo* para prover uma população de células T específicas de antígeno de tumor para administração; e

(c) administrar a população de células T específicas de antígeno de tumor ao paciente.

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que compreende ainda administrar pelo menos uma dose de MTX para suprimir pelo menos um sintoma de GVHD.

30. Método de provisão de benefícios de uma infusão de linfócito enquanto mitigando efeitos colaterais em um paciente caracterizado pelo fato de que compreende (i) administrar células T modificadas que são deficientes em HPRT ao paciente; e (ii) administrar MTX ao paciente quando de um início de efeitos colaterais.

31. População de linfócitos que são deficientes em HPRT e que incluem um receptor quimérico antitumor caracterizada pelo fato de que a população de linfócitos é suscetível à seleção negativa na presença de MTX e/ou MPA.

32. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende a população de linfócitos como definida na reivindicação 31 e um carreador farmaceuticamente aceitável.

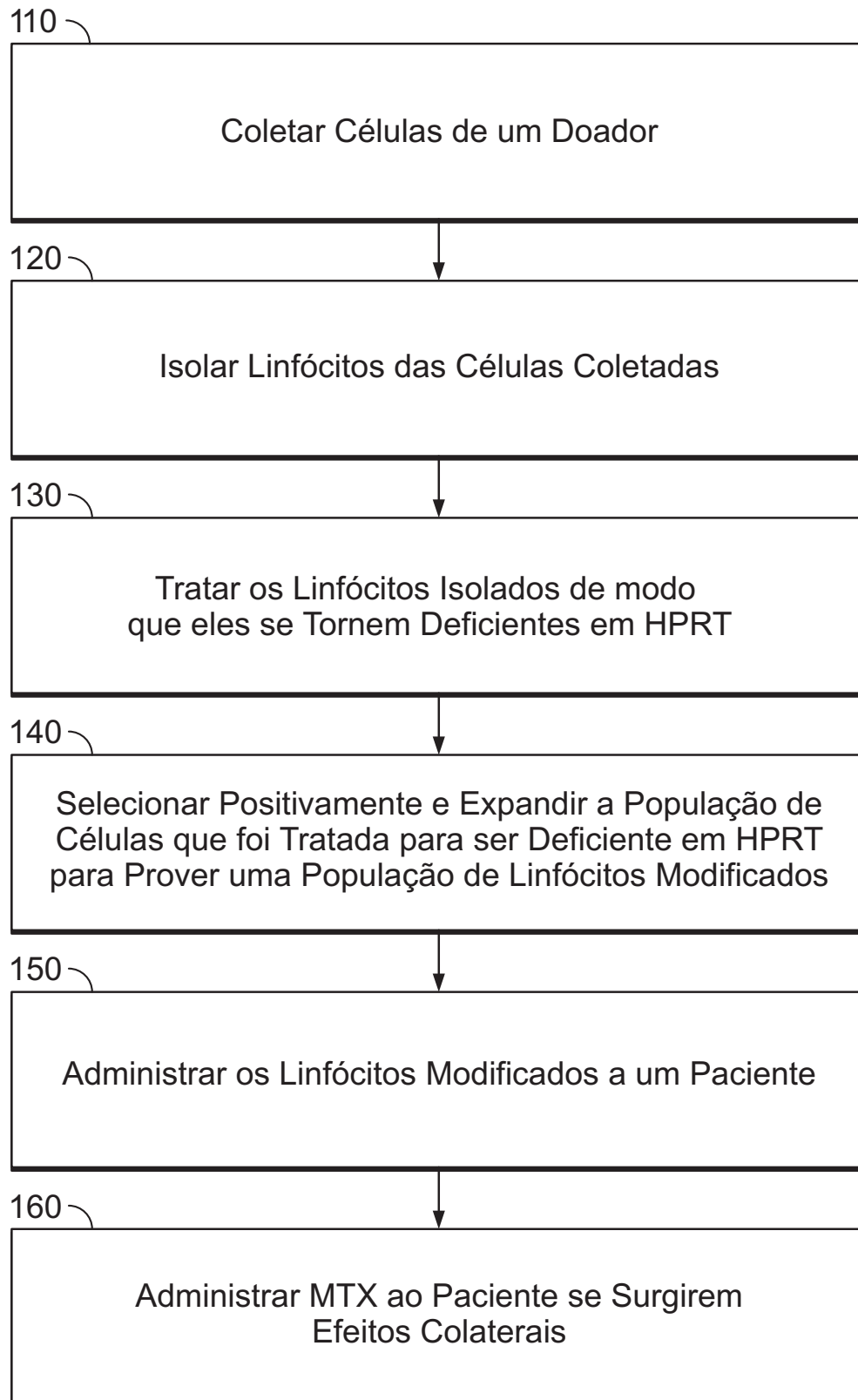


FIG. 1

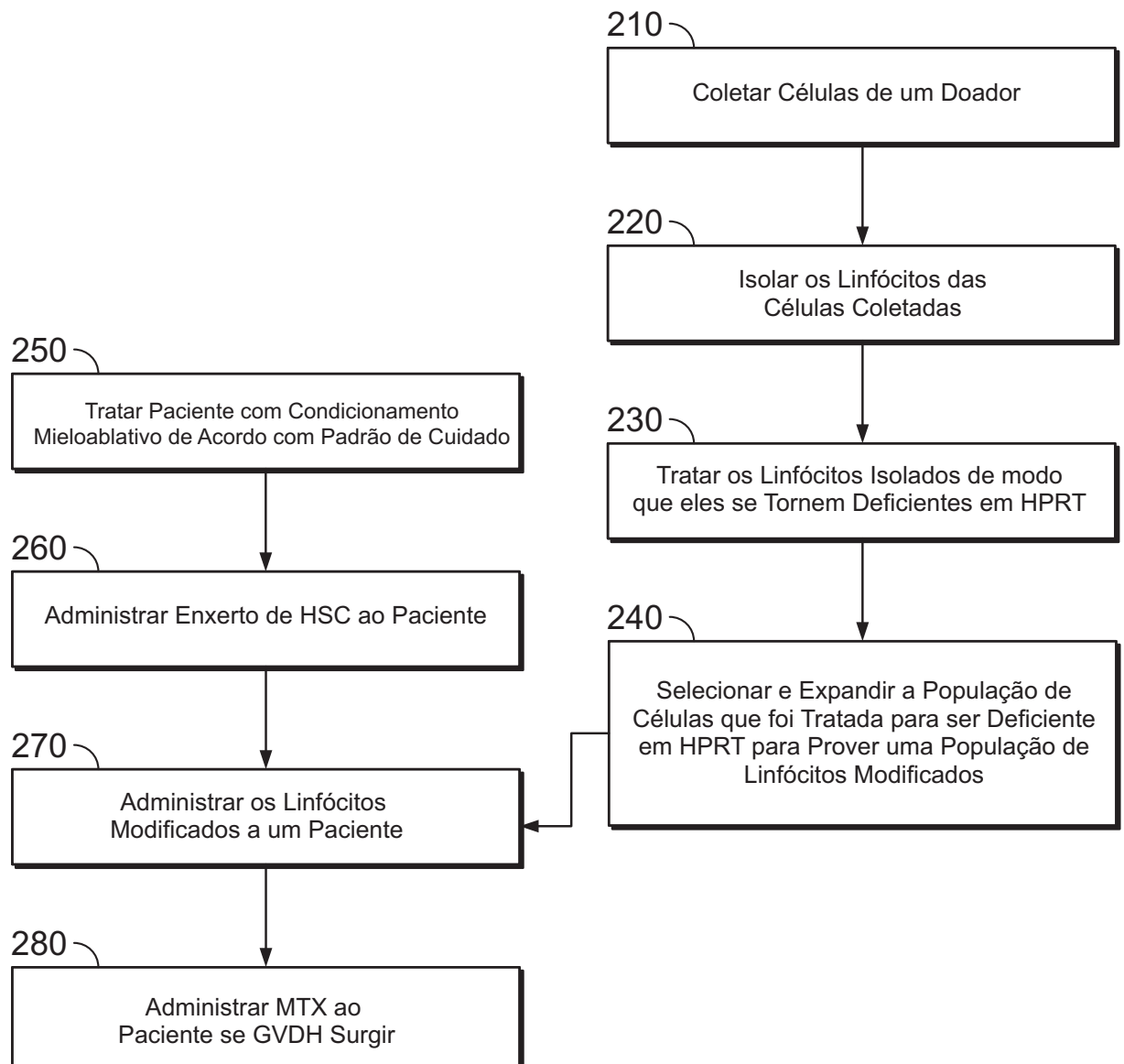


FIG. 2

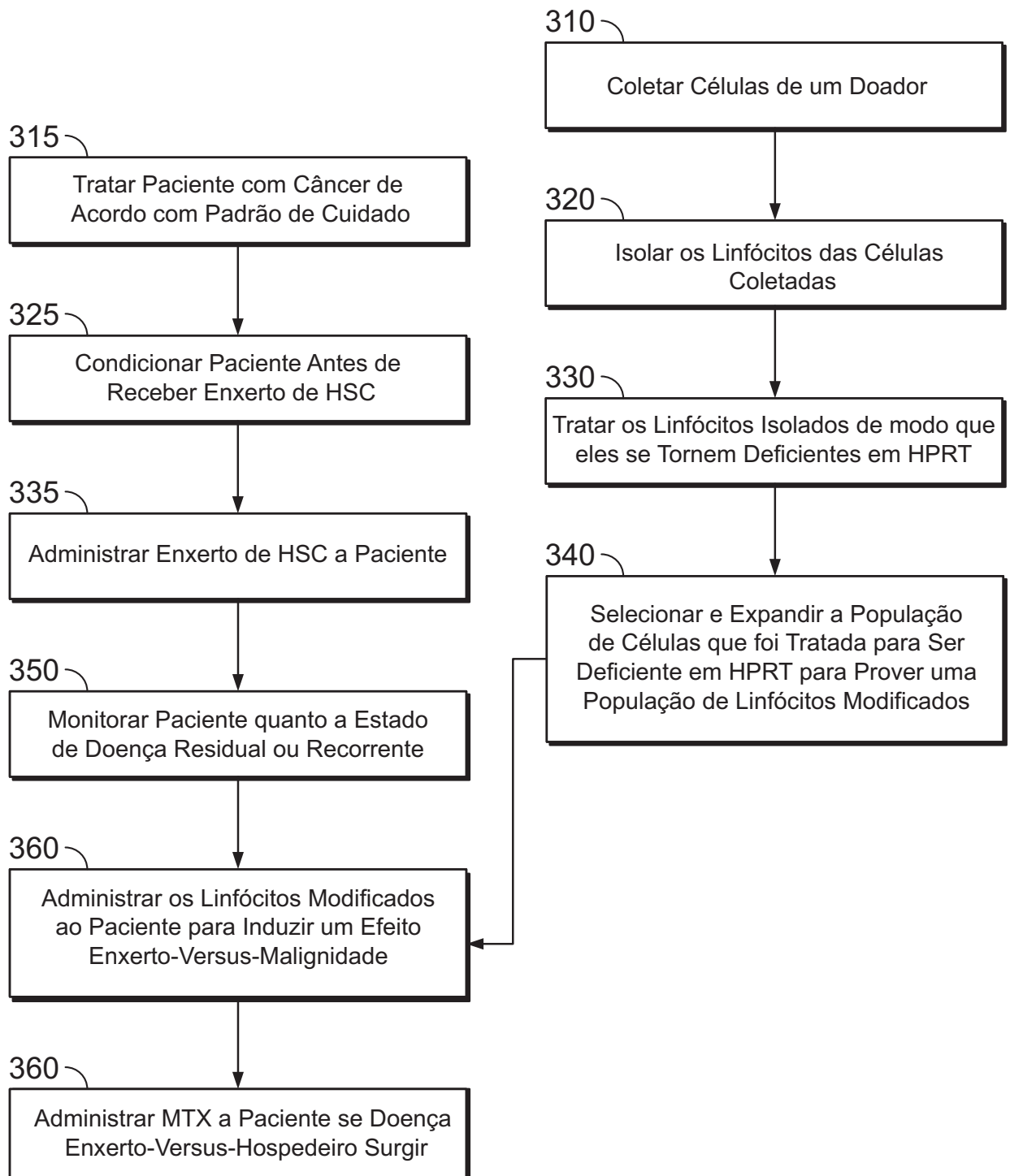


FIG. 3

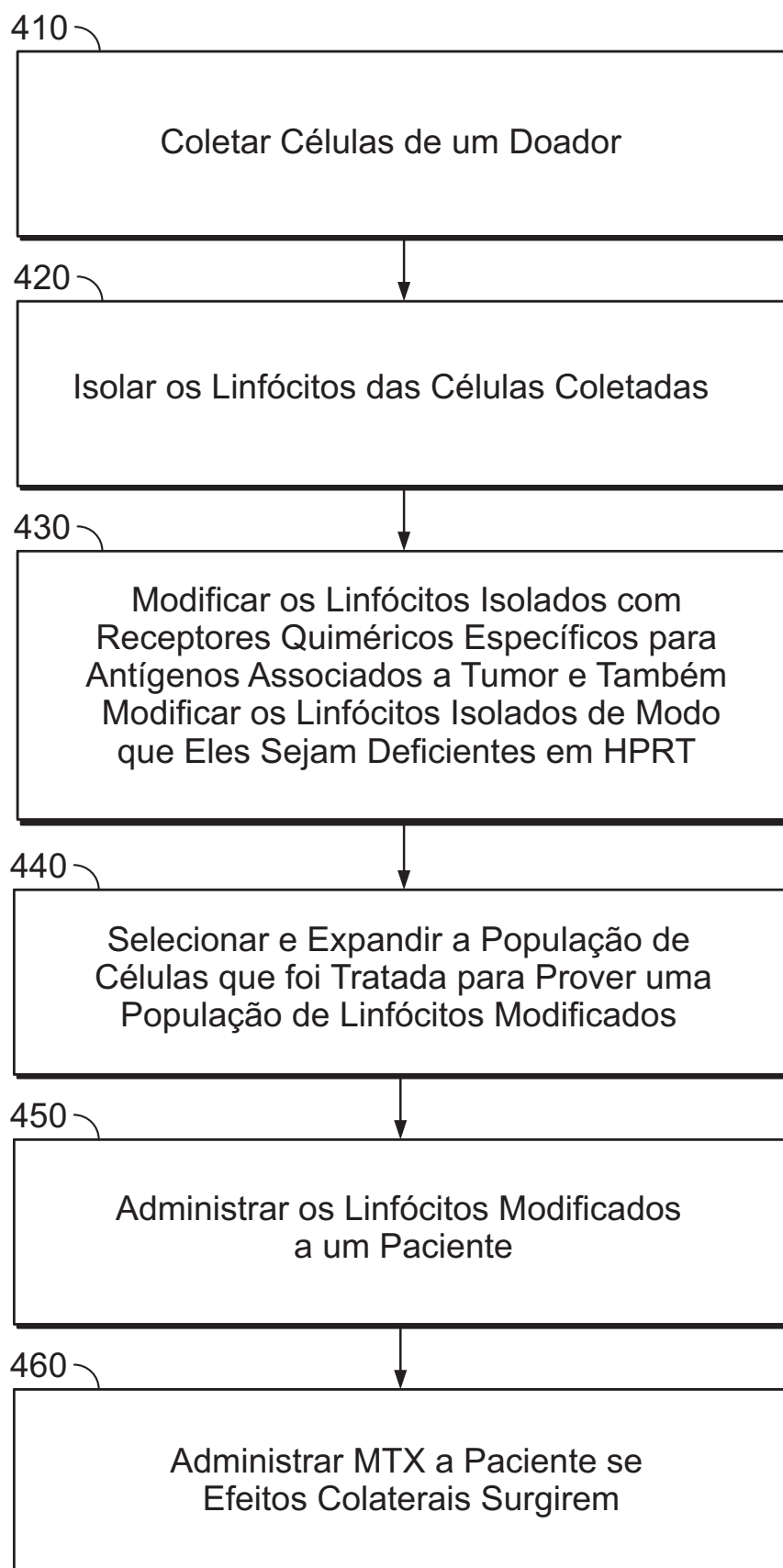


FIG. 4

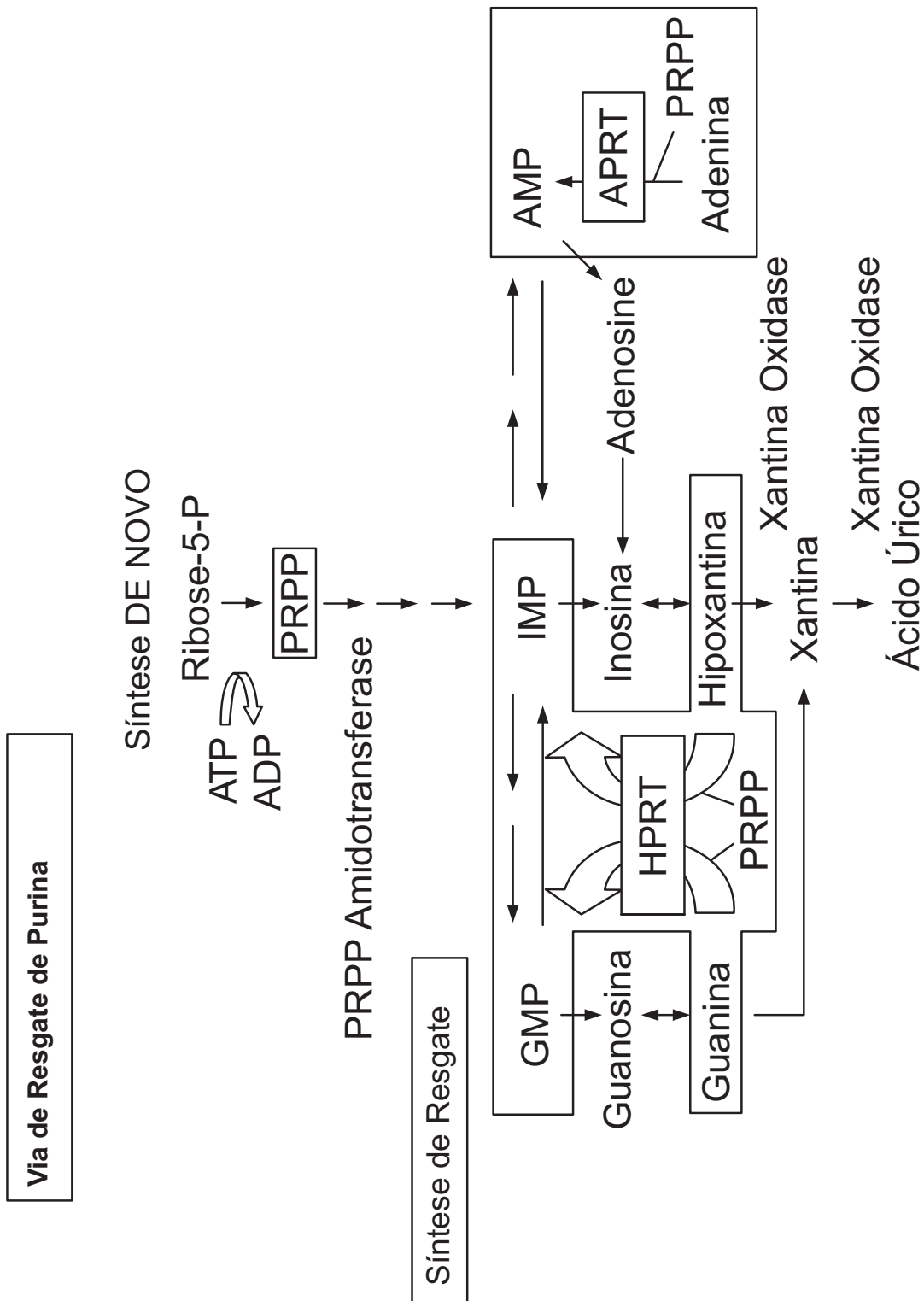
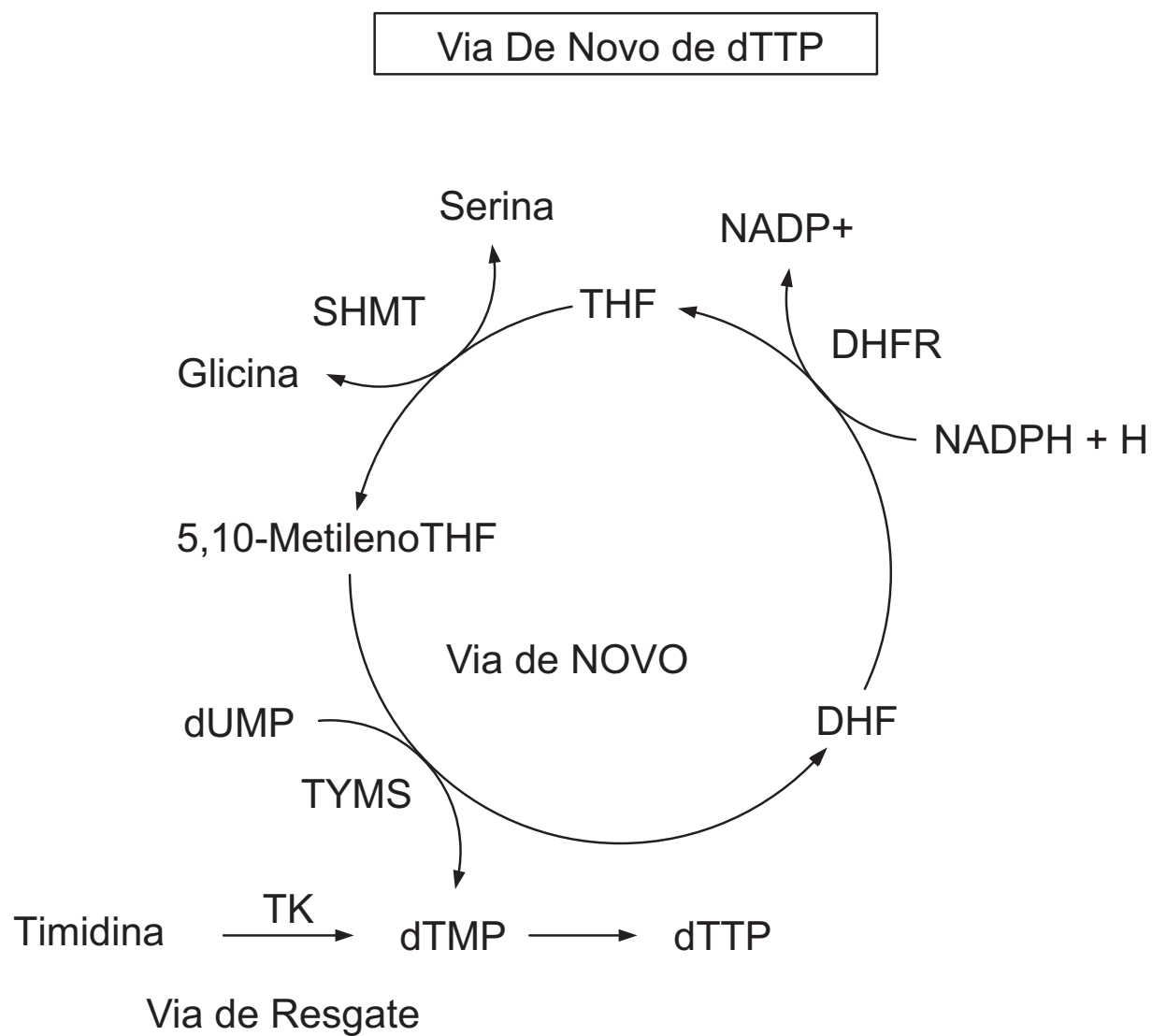


FIG. 5

**FIG. 6**

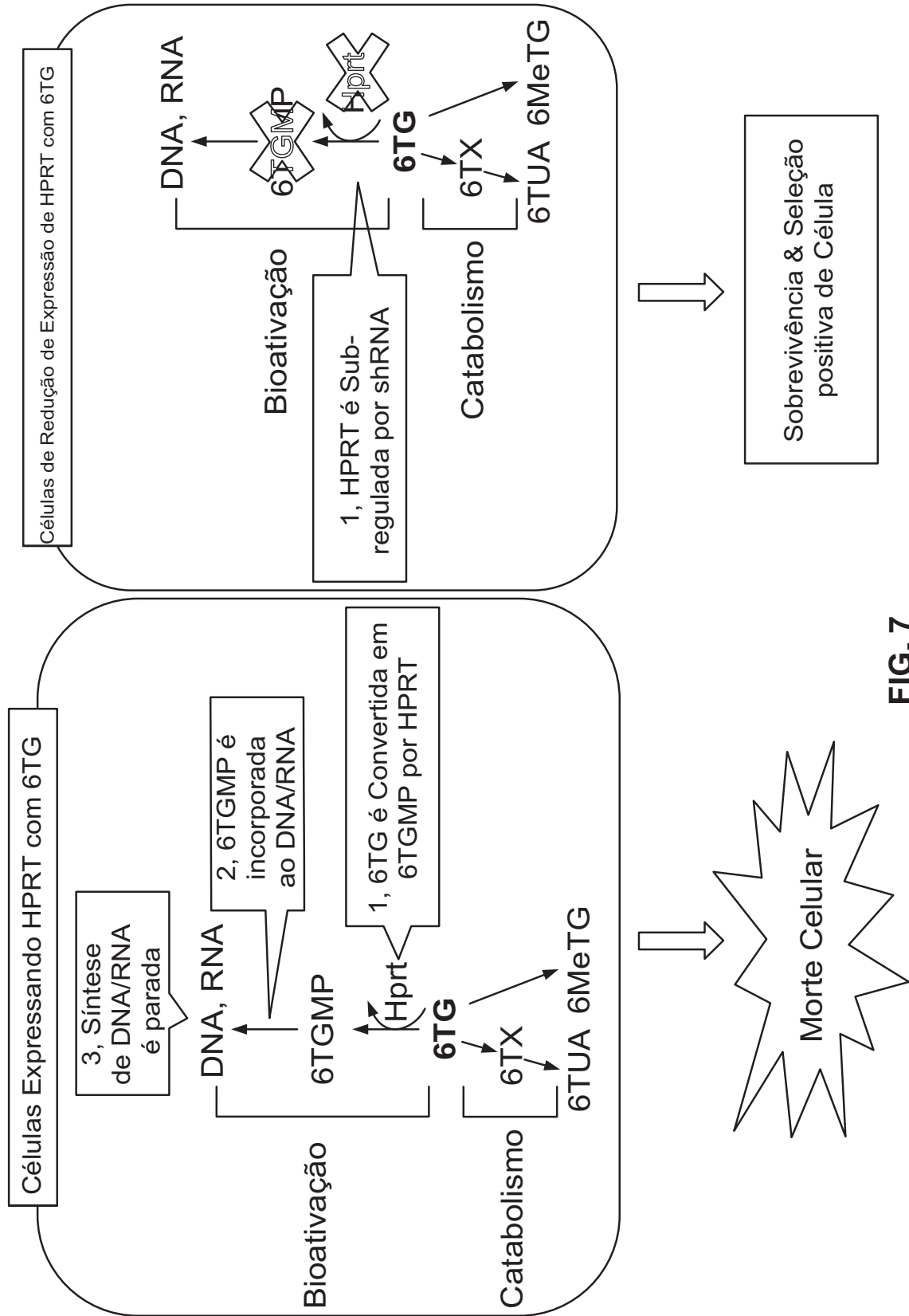


FIG. 7

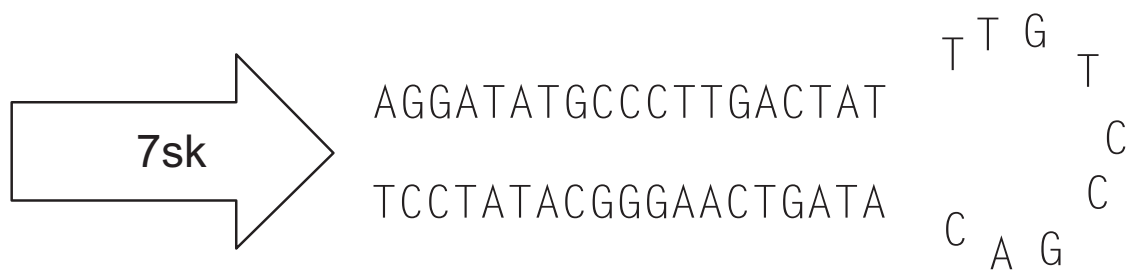
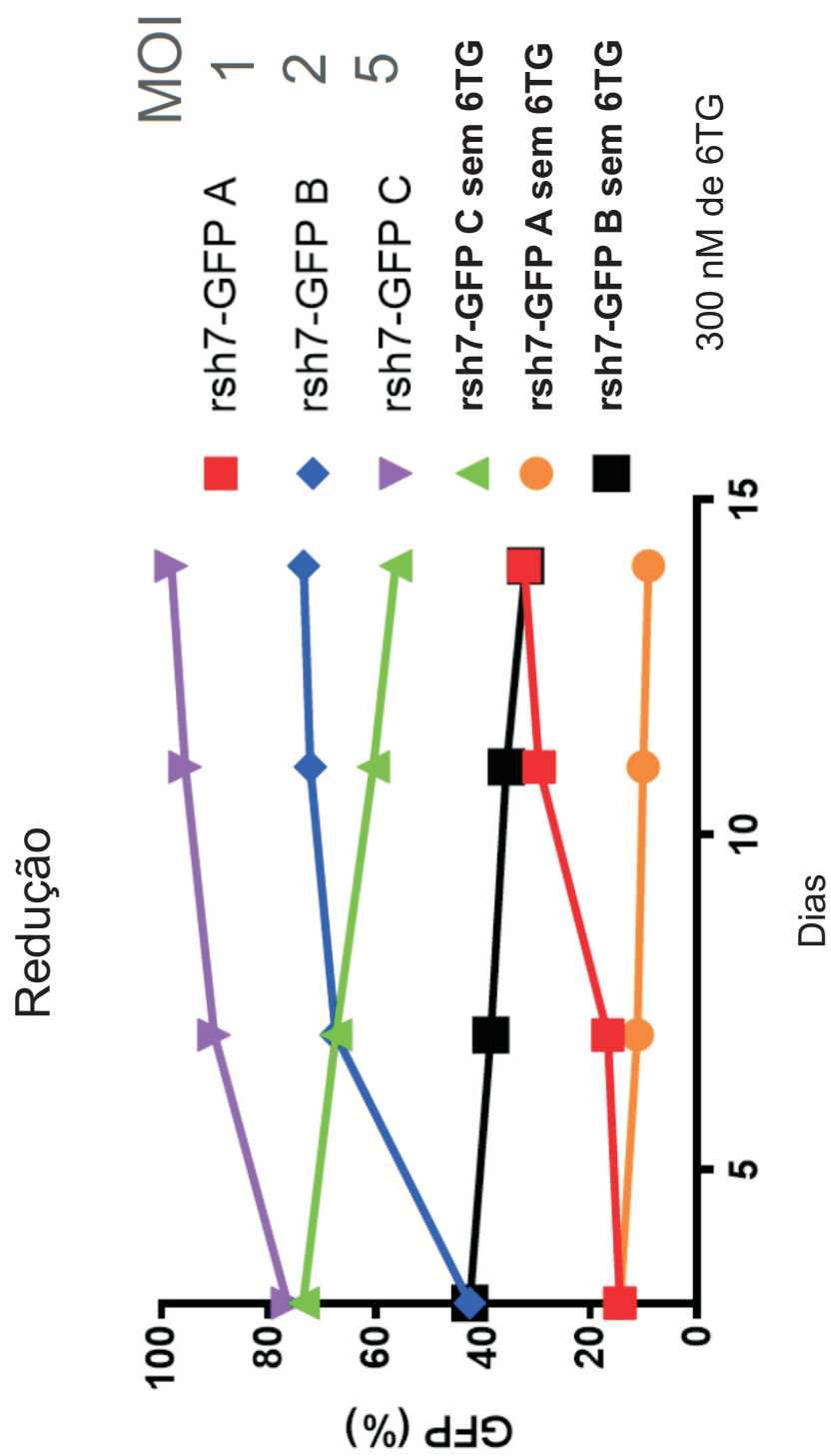


FIG. 8

**FIG. 9A**

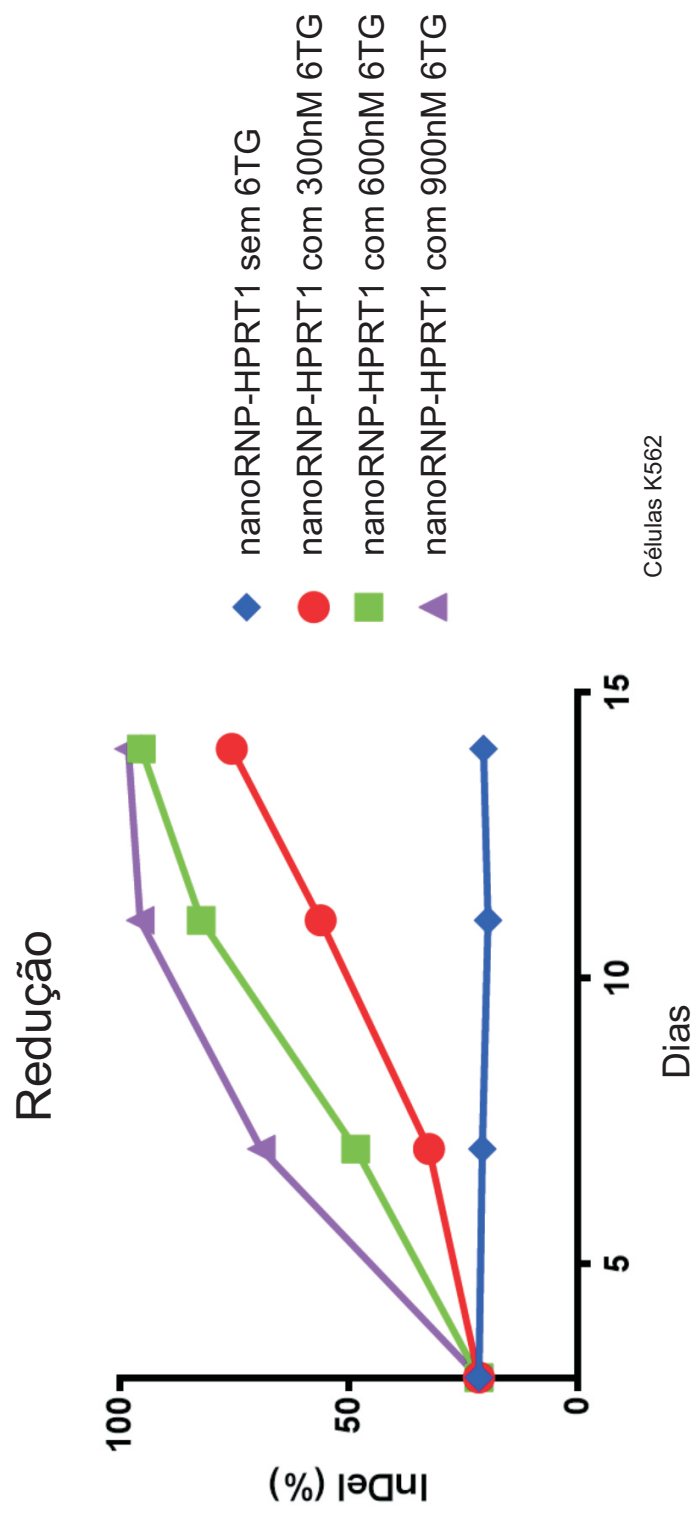


FIG. 9B

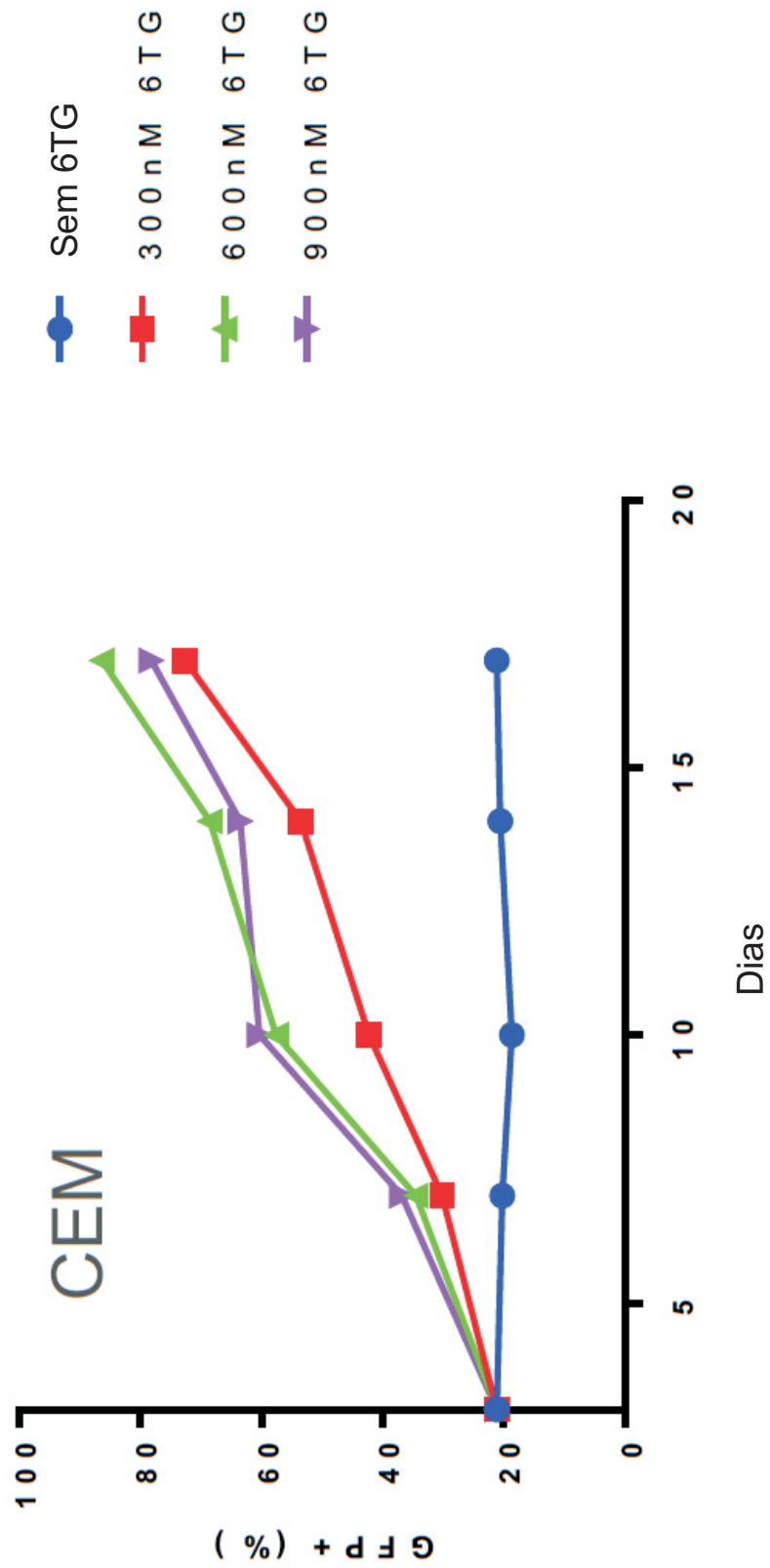


FIG. 10A

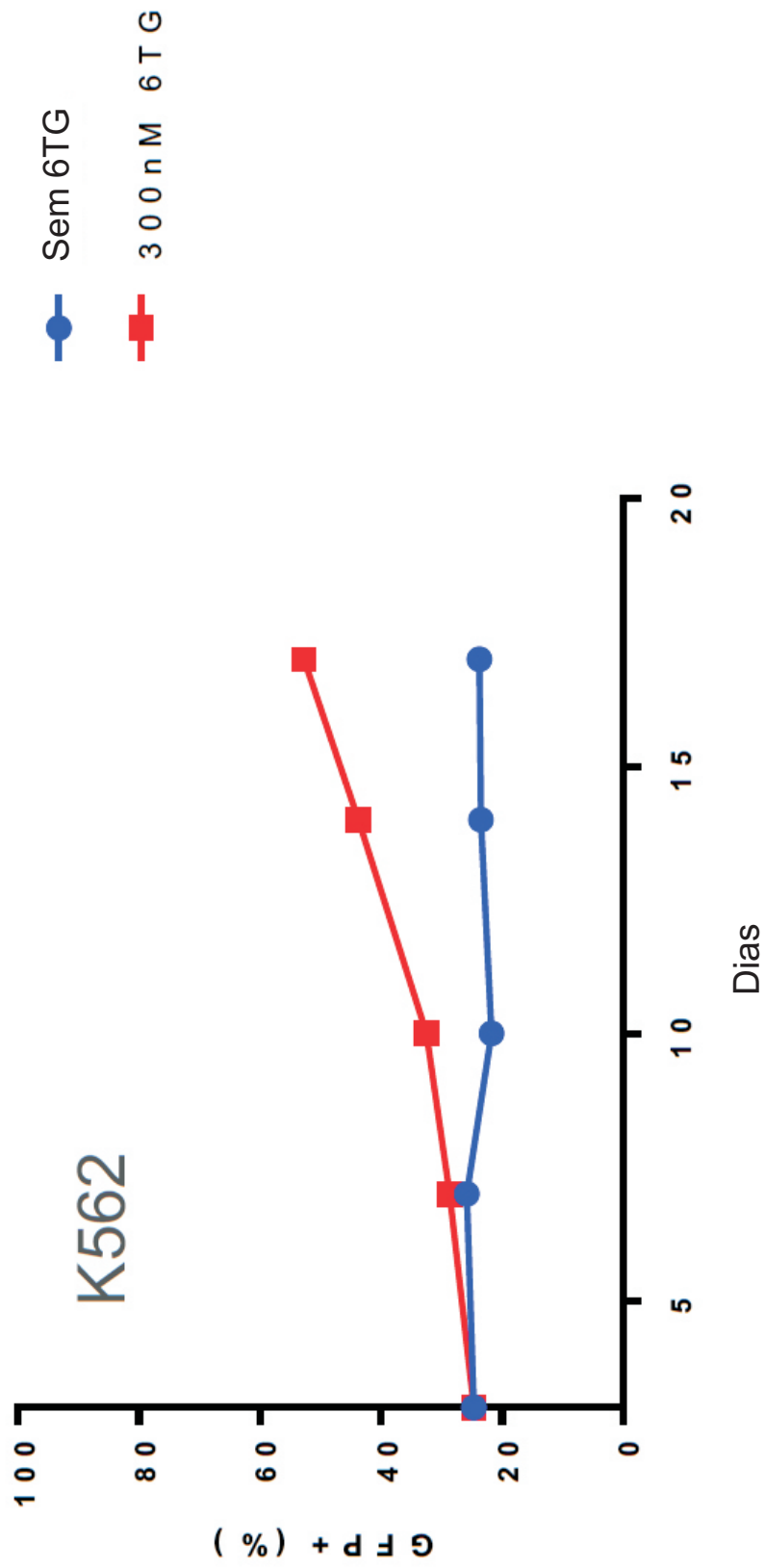


FIG. 10B

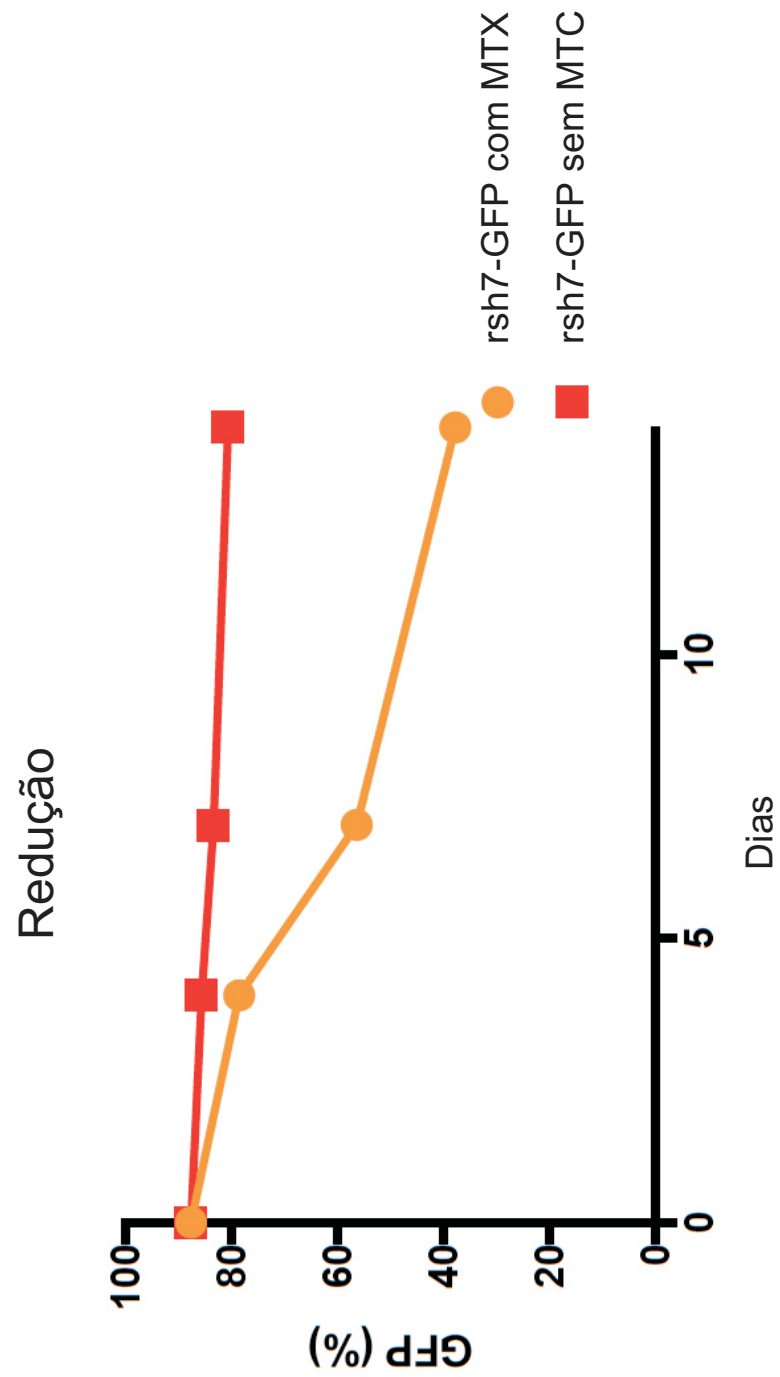
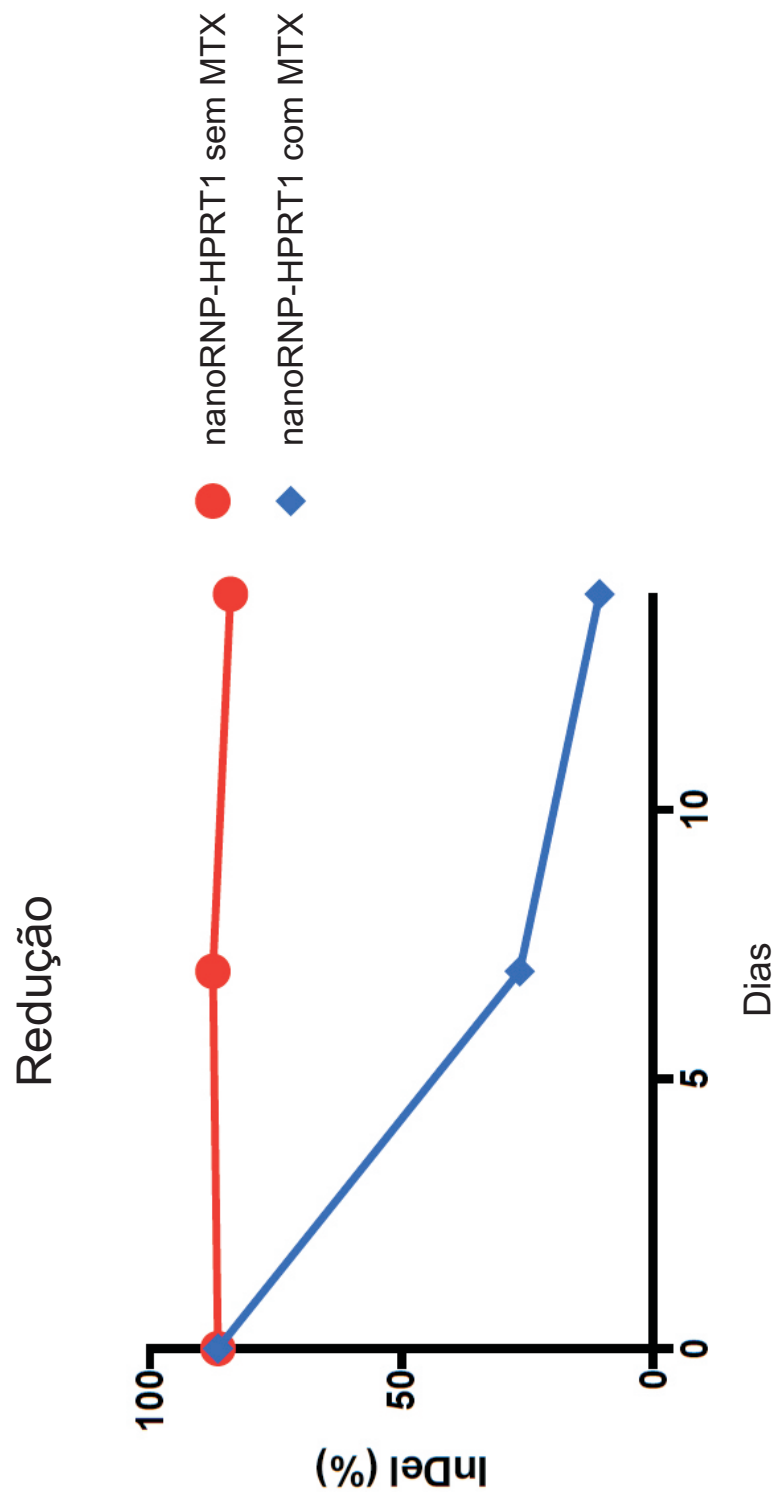


FIG. 11A



0,3uM de Metotrexato para células K562

FIG. 11B

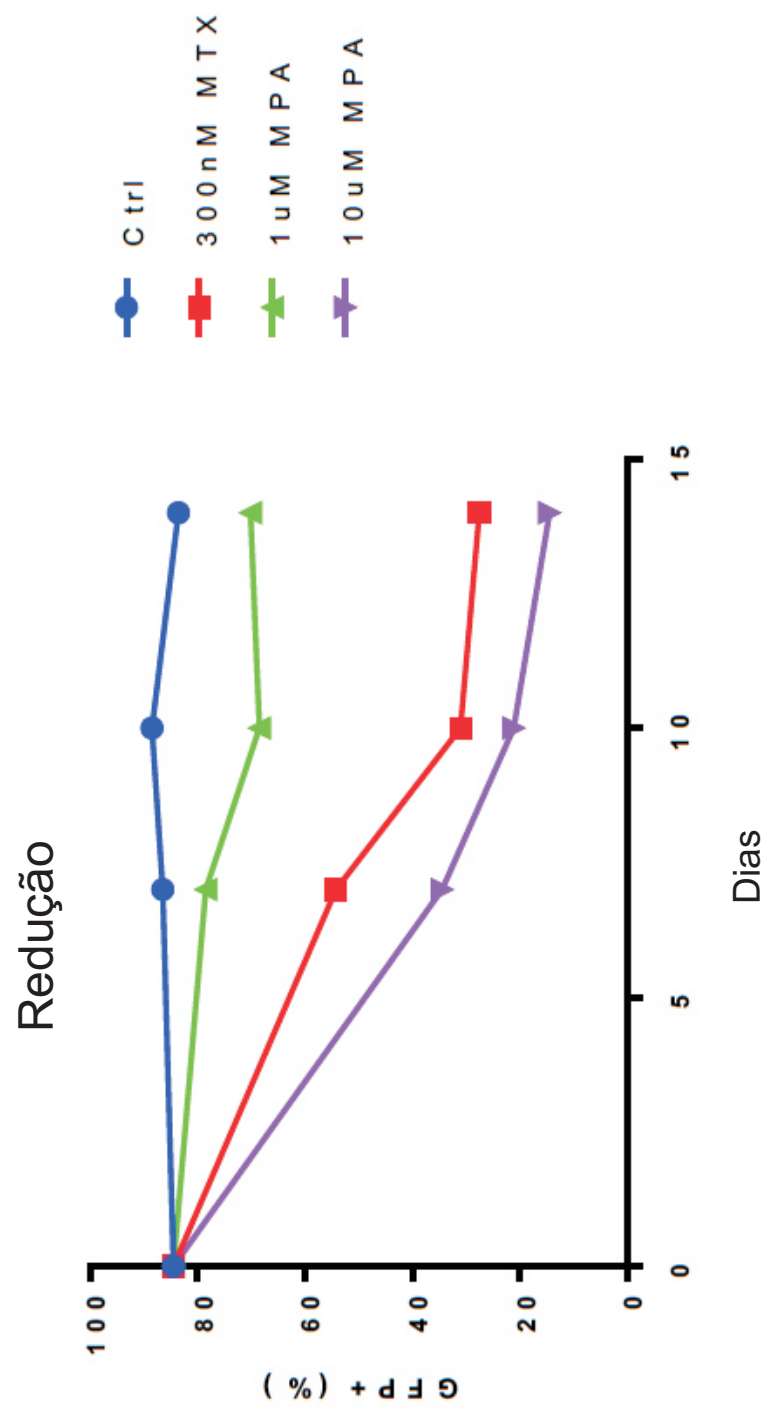


FIG. 12A

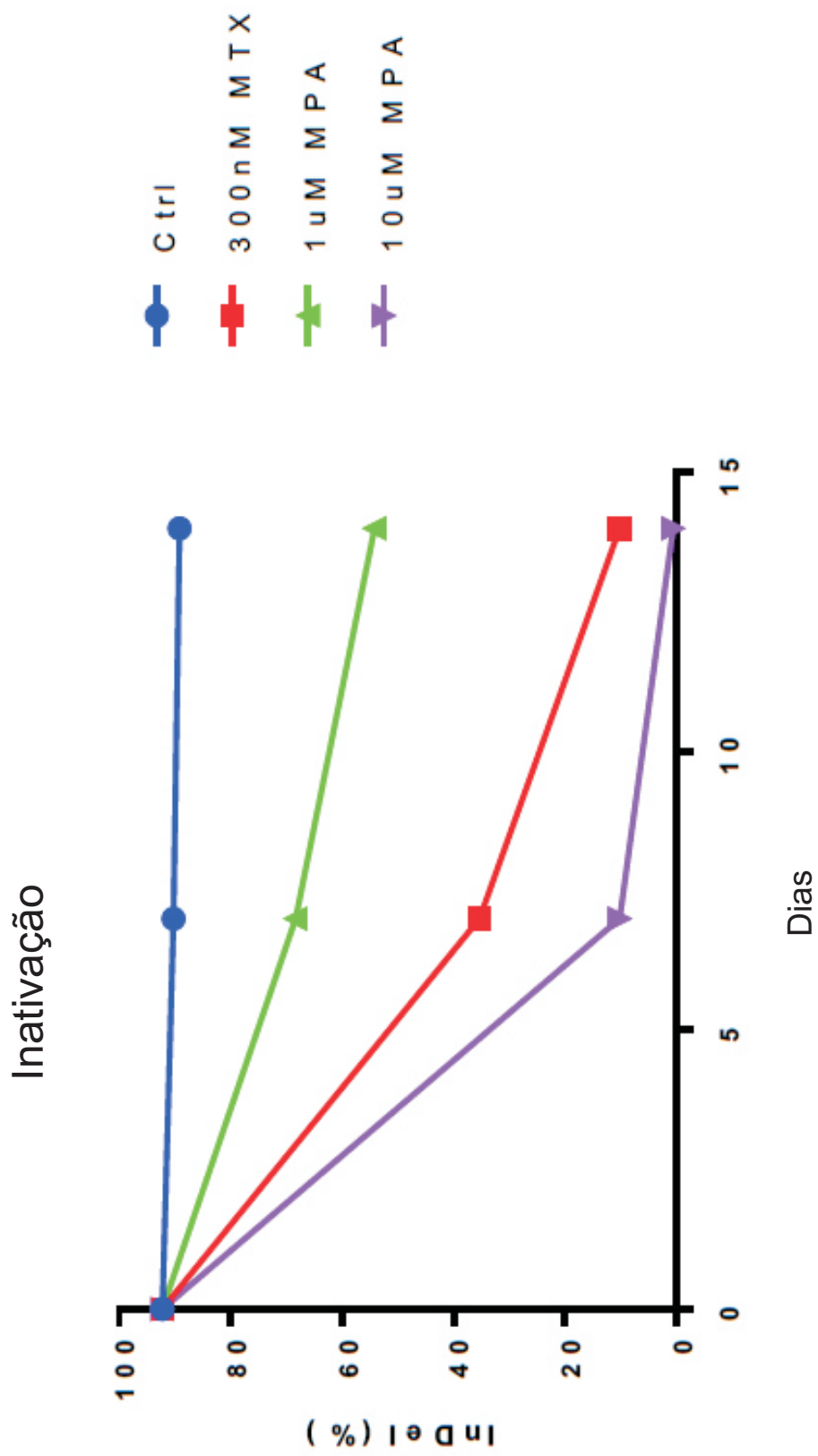


FIG. 12B

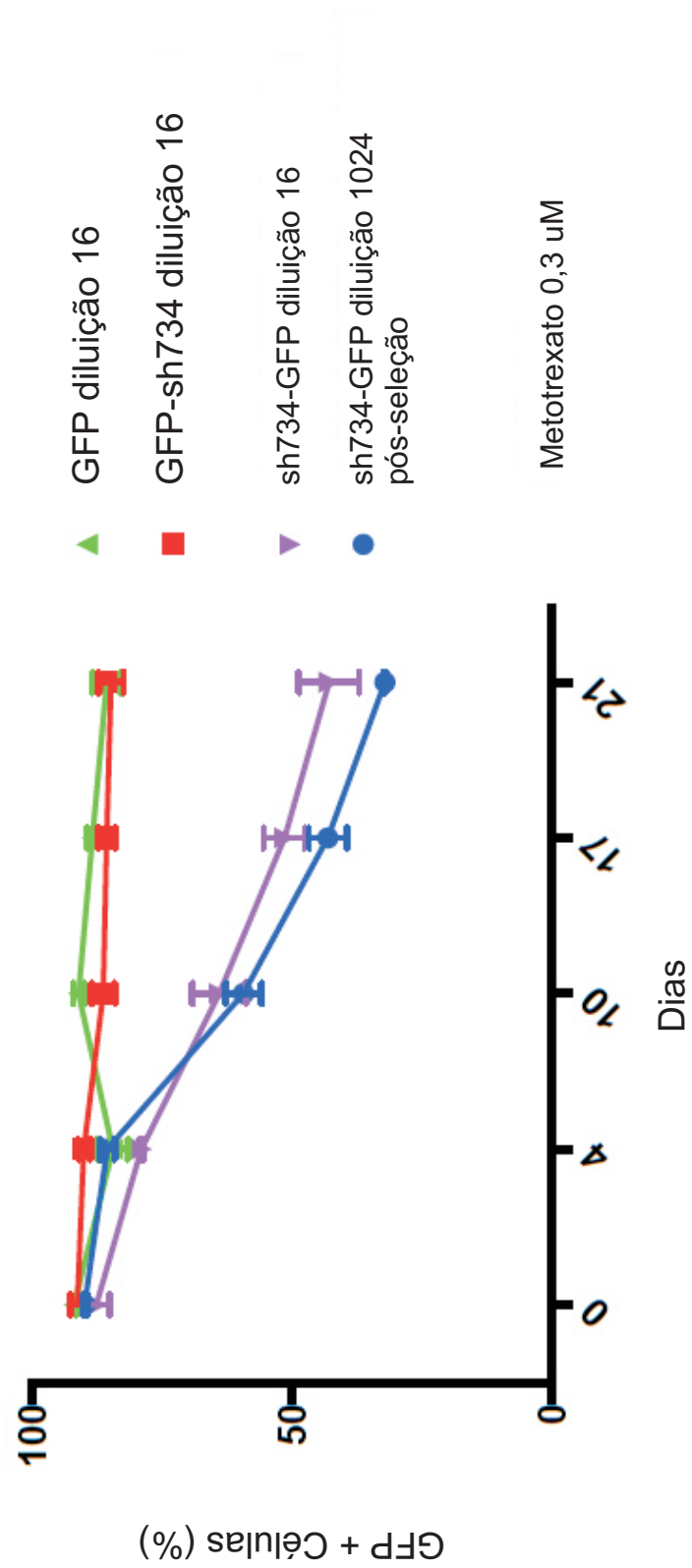
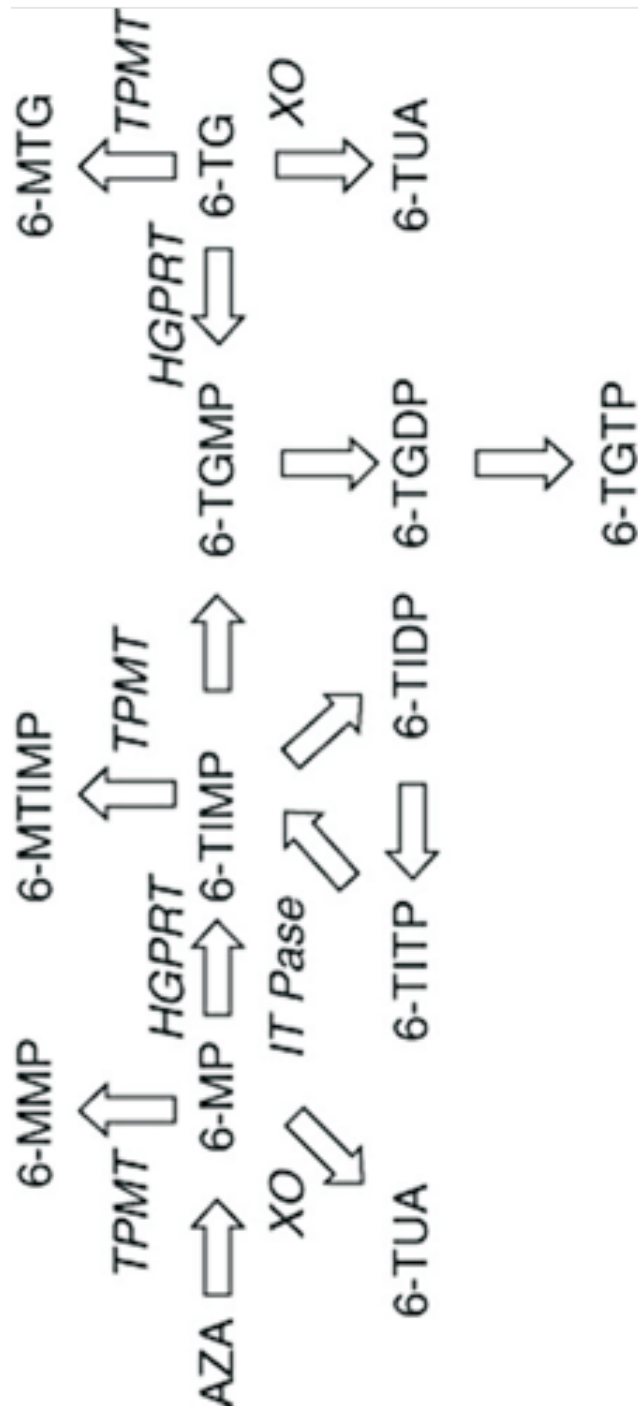


FIG. 13

**FIG. 14**

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagem de sequência p244966.TXT
- Data de Geração do Código: 17/01/2020
- Hora de Geração do Código: 16:20:57
- Código de Controle:
 - Campo 1: 4DAF2C03CC900C81
 - Campo 2: 28313CF3A6498909

RESUMO

Patente de Invenção: **“INTERRUPTOR MODULÁVEL PARA SELEÇÃO DE CÉLULAS DOADORAS MODIFICADAS”**.

A invenção refere-se a métodos que são geralmente direcionados à prevenção, tratamento, supressão, controle ou de outro modo mitigação de efeitos colaterais de terapia de célula T, a terapia de célula T planejada para acelerar reconstituição imune, induzir um efeito de GVM e/ou se direcionar a células de tumor.