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

(21) BR 112021001475-6 A2

(22) Data do Depósito: 26/07/2019

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

(54) Título: COMUTADOR DE CÉLULAS T CAR À BASE DE APTÂMEROS

(51) Int. Cl.: C12N 15/115; A61K 35/17; A61K 31/7088; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 26/07/2018 US 62/703,869; 26/07/2019 US 62/879,401.

(71) Depositante(es): ARATINGA.BIO TNP.

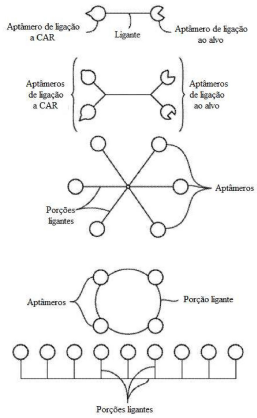
(72) Inventor(es): ANNA MIODEK; FREDERIC MOURLANE; CECILE BAUCHE; RENAUD VAILLANT; PHILIPPE BISHOP.

(86) Pedido PCT: PCT IB2019000890 de 26/07/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/021338 de 30/01/2020

(85) Data da Fase Nacional: 26/01/2021

(57) Resumo: COMUTADOR DE CÉLULAS T CAR À BASE DE APTÂMEROS. Uma tecnologia de comutação baseada em aptâmero é fornecida que intensifica o controle do uso de imunoterapias relacionadas ao receptor de antígeno quimérico (CAR). O comutador à base de aptâmeros utiliza uma molécula de ponte sintética contendo um aptâmero de ligação ao alvo ligado através de um ligante a um aptâmero de ligação a CAR. Um sistema contendo um CAR e uma ponte aptamérica correspondente fornece uma plataforma de imunoterapia que: (i) pode ser direcionada a qualquer antígeno desejado, escolhendo o aptâmero de ligação ao alvo da ponte, (ii) pode ser redirecionada de um alvo para outro alterando o aptâmero de ligação ao alvo; (iii) pode ser dosada de acordo com as necessidades de mudança de um paciente individual ao longo do tempo, alterando o protocolo de administração para a ponte; (iv) pode ser ativada ou desativada rapidamente ou gradualmente; (v) pode ser usada como um diagnóstico complementar para uma terapia com CAR específica; (vi) pode ser integrada com a expressão do CAR in vivo ou ex vivo; (vii) não é imunogênica; e (viii) tem baixo custo de produção.



COMUTADOR DE CÉLULAS T CAR À BASE DE APTÂMEROS

ANTECEDENTES

[001]Receptores de antígenos quiméricos (CARs) utilizam anticorpos de domínio variável de cadeia única (scFv) para dotar as células T de um paciente com a capacidade de reconhecer e matar células cancerígenas. No entanto, apesar da aplicação inicial bem-sucedida, o uso de células T CAR tem sido complicado por dificuldades em controlar as respostas imunológicas *in vivo*, o que pode resultar em liberação excessiva prejudicial de citocinas e/ou toxicidades indesejadas. Além disso, podem ocorrer reações fora do alvo e o escape antigênico por tumores pode criar uma necessidade de ciclos subsequentes de terapia com células T CAR com especificidade de antígeno modificada. Assim, há uma necessidade de desenvolver estratégias para fortalecer as interações para aumentar a especificidade, para redirecionar o CAR para novos antígenos ou para desenvolver comutadores de “desativação” ou “morte” para inibir ou encerrar a terapia com células T CAR.

[002]Abordagens de células T CAR comutáveis foram desenvolvidas que permitem a administração de um comutador molecular adaptável ao paciente que medeia a interação entre uma célula T CAR e uma célula alvo. Na ausência da comutação, nenhuma resposta imunológica mediada por CAR ocorre. Por exemplo, comutadores de morte podem ser usados para eliminar células T CAR e prevenir a toxicidade (Straathof et al., Di Stasi et al.). Outra abordagem utiliza um receptor quimérico dividido que se associa na presença de um pequeno comutador de molécula (Wu et al.). Também foram desenvolvidos comutadores baseados em anticorpos, que medeiam a interação

entre o CAR e o alvo (Tamada, et al., Urbanska, et al. (2012a), Urbanska et al. 2012b)). Em uma variante da tecnologia de comutação de anticorpo, um anticorpo específico para o alvo pode ser integrado com um neo-epítopo peptídico (PNE) que se liga à porção scFv do CAR (Rodgers et al.). O PNE é diferente dos epítopos endógenos e permite uma abordagem do comutador modular em que novos comutadores podem ser projetados pela combinação de um único de CAR para PNE e anti-PNE com diferentes anticorpos específicos do alvo. No entanto, essa abordagem ainda requer a manipulação genética complexa de moléculas de anticorpo e cria o potencial para reações imunológicas ao comutador, particularmente se o scFv não for totalmente humanizado.

SUMÁRIO

[003]A presente tecnologia fornece uma tecnologia de comutação baseada em aptâmero que cria um alto grau de controle ao realizar imunoterapias relacionadas ao receptor de antígeno quimérico (CAR). O comutador à base de aptâmeros, ou ponte aptamérica, da presente tecnologia, em seu nível mais básico, utiliza uma molécula de ponte sintética contendo um aptâmero de ligação ao alvo ligado através de um ligante a um aptâmero de ligação a CAR. Um sistema contendo um CAR e uma ponte aptamérica correspondente fornece uma plataforma de imunoterapia que: (i) pode ser direcionada a qualquer antígeno desejado, escolhendo o aptâmero de ligação ao alvo da ponte, (ii) pode ser redirecionado de um alvo para outro alterando o aptâmero de ligação ao alvo; (iii) pode ser dosado de acordo com as necessidades de mudança de um paciente individual ao longo do tempo, alterando o protocolo de administração para a ponte; (iv) pode ser ativado ou

desativado rapidamente ou gradualmente; (v) pode ser usado como um diagnóstico complementar para uma terapia com CAR específica; (vi) pode ser integrado com a expressão do CAR *in vivo ou ex vivo*; (vii) não é imunogênico; e (viii) tem baixo custo de produção.

[004]A presente tecnologia fornece aptâmeros de redirecionamento de células (por exemplo, aptâmeros biespecíficos ou multivalentes), que podem ser usados como pontes aptaméricas em sistemas de imunoterapia com CAR baseados em aptâmeros, bem como para modificação genética de células *in vivo ou ex vivo*. A(o)s pontes aptaméricas, células, kits e métodos da presente tecnologia podem ser empregada(o)s em uma ampla variedade de usos, incluindo como imunoterapias para o tratamento de cânceres (por exemplo, hematológicos ou não hematológicos, células individuais ou tumores sólidos), doenças autoimunes (por exemplo, artrite, miastenia gravis, pênfigo), doenças neuroinflamatórias, doenças oftálmicas, doenças neurodegenerativas (por exemplo, ALS, doença de Huntington, doença de Alzheimer), doenças neuromusculares (incluindo distrofia muscular de Duchenne, SMA), doenças infecciosas (por exemplo, HIV, HSV, HPV, HBV, Ebola, tuberculose, Cryptococcus) e doenças metabólicas (por exemplo, diabetes mellitus tipo 1). Eles também podem ser usados para fornecer agentes diagnósticos, kits e métodos para uso em tais imunoterapias, incluindo imagens, análise de tráfico de células e pesquisa e desenvolvimento de novas imunoterapias, bem como para fornecer profilaxia quando combinadas com terapias com células-tronco (por exemplo, HSCT).

[005]Como usado nesse documento, “células receptoras de

antígeno quimérico” ou “células CAR” são células geneticamente modificadas (por exemplo, células T, células NK, monócitos ou outros), que foram manipuladas *ex vivo ou in vivo* para expressar um único anticorpo de domínio variável de cadeia (scFv) fundido, através de um domínio de haste ou transmembrana, ao domínio intracelular de um receptor (por exemplo, CD3-TCR) de modo a dotar a célula com a capacidade de reconhecer e ligar um ou mais antígenos específicos e ativar uma resposta imunológica celular (por exemplo, matar células cancerígenas ou destruir uma célula infectada por vírus).

[006]Como usado nesse documento, “perda antigênica” ou “escape antigênico” pode se referir a qualquer um dos vários mecanismos de resistência ou adaptação à imunoterapia, tal como a regulação negativa de um antígeno tumoral ou a regulação positiva de ligantes inibidores (por exemplo, PD-L1, TIM3, LAG3) que contribui para a falha das células T CAR, falha de uma célula CAR em chegar ao seu alvo (por exemplo, um sítio do tumor), imunidade contra a porção do anticorpo de um CAR (por exemplo, resposta das células T contra o scFv, particularmente se for não totalmente humanizado), aptidão das células T CAR (isto é, potencial diminuído para autorrenovação da memória e maior propensão para exaustão) ou *splicing* ou mutação do antígeno.

[007]Os aptâmeros candidatos são um conjunto de ácidos nucleicos de sequência diferente, a partir dos quais um aptâmero desejado é selecionado. A fonte de aptâmeros candidatos pode ser ácidos nucleicos de ocorrência natural ou fragmentos dos mesmos, ácidos nucleicos sintetizados quimicamente, ácidos nucleicos sintetizados enzimaticamente

ou ácidos nucleicos feitos por uma combinação das técnicas anteriores.

[008]Um ácido nucleico para uso na presente tecnologia pode ser, por exemplo, uma molécula de DNA, RNA ou XNA (ácido xenonucleico), incluindo qualquer modificação química da mesma, e pode ser de fita simples, fita dupla ou uma mistura de fita simples e fita dupla.

[009]Um alvo é uma unidade estrutural, usualmente um componente de uma entidade biológica, que se liga a um aptâmero. O alvo pode ser uma molécula, como um(a) proteína, peptídeo, carboidrato, polissacarídeo, glicoproteína, hormônio, receptor, antígeno, anticorpo, vírus, substrato, metabólito, droga, nutriente, fator de crescimento ou semelhantes. O alvo pode ser uma parte de uma célula ou uma célula, tal como uma célula T, uma célula NK, um monócito, uma célula B, uma célula tumoral ou uma célula que está patologicamente alterada (por exemplo, por um vírus ou outro microrganismo, ou alterado devido a rearranjos genéticos). O alvo também pode ser um(a) órgão ou organela.

[0010]A afinidade de ligação se refere à intensidade das interações entre duas ou mais estruturas, tal como um ligante e um receptor, que se ligam reversivelmente entre si. A afinidade de ligação é uma medida de equilíbrio dinâmico da razão entre a taxa de ativação (k_{on}) e a taxa de desativação (k_{off}) e pode ser medida ou estimada por qualquer método conhecido, incluindo a determinação da constante de dissociação (K_d) ou constante de associação (Ka), tal como a partir da dependência da concentração de ligação ou determinação da energia de dissociação livre de Gibbs ($\triangle G_d$). A afinidade de ligação aumentada surge de forças

intermoleculares mais fortes entre as estruturas que interagem (por exemplo, ligante e receptor) e resulta em tempo de residência aumentado no sítio de ligação. Ligantes que exibem afinidade de ligação mais alta podem ter taxas “de ativação” mais altas e/ou taxas “de desativação” mais baixas. A afinidade de ligação aumentada pode ser vantajosa em produtos terapêuticos, uma vez que a atividade total do receptor é alcançada com menor concentração de ligante. A afinidade de ligação pode ser determinada pela intensidade coletiva de múltiplas afinidades de interações de ligação não covalentes individuais em uma estrutura multivalente. A afinidade de ligação geral de um ligante multivalente é dependente de suas afinidades de ligação individuais, valência tanto do ligante quanto do receptor, e do arranjo estérico das estruturas que interagem. No entanto, a afinidade de ligação geral de uma construção multimérica não é meramente a média das afinidades de ligação individuais dos aptâmeros individuais. Os fatores que influenciam a afinidade de uma estrutura multimérica incluem o ajuste estereoquímico entre o ligante e o receptor, o tamanho da área de contato entre eles e a distribuição dos grupos carregados e hidrofóbicos.

[0011]O perfil de segurança refere-se à coleção de efeitos adversos associados a um(a) fármaco, terapia ou intervenção, bem como à probabilidade de tais efeitos adversos. Um melhor perfil de segurança pode resultar de reações adversas menos frequentes e/ou menos graves e/ou eventos adversos seno associados ao mesmo nível de benefício terapêutico. Um melhor perfil de segurança pode ser associado a um índice terapêutico (TI) melhorado, isto é, uma janela

de segurança maior entre uma dose eficaz mínima e uma dose tolerada máxima.

[0012]A resposta imunológica refere-se à indução de respostas humorais e/ou mediadas por células específicas contra um antígeno. O componente humoral pode incluir a produção de anticorpos específicos para um antígeno, enquanto o componente mediado por células pode incluir a geração de hipersensibilidade de tipo retardado e células efetoras citotóxicas contra um antígeno. As células imunes participam da resposta imunológica de várias maneiras, incluindo interação direta com um antígeno, interação com outras células do sistema imunológico e pela liberação e/ou reação a citocinas.

[0013]A ativação ou estimulação do sistema imunológico pode ser mediada pela ativação de células efetoras imunológicas, tais como, linfócitos, macrófagos, células dendríticas, células assassinas naturais (células NK) e linfócitos T citotóxicos (CTL). Pode ser mediada pela ativação e maturação de células apresentadoras de antígenos, tais como as células dendríticas. Também pode ser mediado pelo bloqueio de vias inibitórias, tal como inibindo moléculas de ponto de verificação imunológico.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0014]A Figura 1 mostra representações esquemáticas de várias modalidades de pontes aptaméricas da presente tecnologia.

[0015]A Figura 2 mostra uma representação esquemática de um sistema e método para terapia com células T CAR usando a expressão *in vivo* de uma plataforma de CAR juntamente com o direcionamento mediado por pontes aptaméricas.

[0016]A Figura 3 é uma representação esquemática de métodos de redirecionamento de alvo de acordo com a tecnologia atual.

[0017]A Figura 4 é uma lista de sequências de neoantígenos de peptídeos e aptâmeros monoméricos.

[0018]A Figura 5 mostra alguma estrutura secundária prevista de aptâmeros monoméricos.

[0019]A Figura 6 mostra um esquema para uma reação química *click* para vincular aptâmeros.

[0020]As Figuras 7A e 7B mostram a ligação de aptâmeros anti-PSMA (7A) e anti-CD3 (7B) a células que expressam e não expressam os respectivos antígenos.

[0021]As Figuras 8A e 8B mostram géis de agarose de aptâmeros monoméricos e diméricos (biespecíficos).

[0022]A Figura 9 mostra o curso do tempo de um aptâmero de RNA no soro.

[0023]As Figuras 10A e 10B mostram as afinidades de ligação de aptâmeros biespecíficos para células PSMA-positivas e negativas.

[0024]As Figuras 11A e 11B mostram as afinidades de ligação de aptâmeros biespecíficos a células CD3-positivas e negativas.

[0025]A Figura 12 mostra a citotoxicidade de aptâmeros biespecíficos para células PSMA-positivas.

[0026]A Figura 13A mostra um alinhamento de sequência de vários aptâmeros de RNA anti-PNE. A Figura 13B mostra a estrutura secundária prevista de dois dos aptâmeros de RNA de 13A.

[0027]As Figuras 14A-14C mostram a ligação de aptâmeros de PNE anti-CAR em células que não expressam receptor, um

CAR CD19 ou um CAR PNE.

[0028]A Figura 15 mostra a estabilidade de aptâmeros de RNA anti-CAR PNE no soro.

[0029]A Figura 16 mostra a ligação de aptâmeros anti-CAR PNE a células mononucleares de sangue periférico (PBMC) transduzidas com um CAR-PNE.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0030]A presente tecnologia fornece comutadores baseados em aptâmeros para uso em imunoterapias, tal como a terapia de células T CAR. Os comutadores de aptâmeros servem como pontes físicas entre as células imunes que expressam CAR e as células-alvo, tais como células cancerígenas ou células de um patógeno. No entanto, comutadores ou pontes aptamérico(a)s também servem como ferramentas ágeis e rapidamente adaptáveis para modular a especificidade e a intensidade de uma reação imunológica. Como suas funções de ligação ao CAR e de ligação ao alvo são realizadas por aptâmeros, as pontes aptaméricas podem ser rapidamente selecionadas e adaptadas às necessidades em evolução de um paciente *in vitro* em um ritmo rápido e de baixo custo que não pode ser igualado por abordagens baseadas em anticorpos. Além disso, as pontes aptaméricas da presente tecnologia podem ser combinadas com injeção direta de uma codificação de vetor para um CAR, por exemplo, a partir de partículas de vetor viral revestidas com polímero e a transdução *in vivo* (isto é, transdução dentro do corpo do indivíduo da imunoterapia) das células imunes selecionadas e expressão de CARs, para alcançar imunoterapia avançada com mais tempo e economia de custos em comparação com a transdução *ex vivo* convencional e expansão de células T CAR.

[0031]A tecnologia de aptâmero de redirecionamento de células (por exemplo, ligação biespecífica ou multivalente) e pontes aptaméricas da presente tecnologia, bem como sistemas e kits que os contêm, podem ser usados em várias aplicações, incluindo terapia para câncer autóloga ou heteróloga e imunoterapia. A tecnologia de aptâmero de redirecionamento de células, pontes aptaméricas, sistemas, kits e métodos de imunoterapia com CAR baseados em aptâmeros da presente tecnologia podem ser empregados em uma ampla variedade de imunoterapias, incluindo o tratamento de cânceres (por exemplo, hematológicos ou não hematológicos, células individuais ou tumores sólidos), doenças autoimunes (por exemplo, artrite, miastenia gravis, pênfigo), doenças neuroinflamatórias, doenças oftálmicas, doenças neurodegenerativas (por exemplo, ALS, doença de Huntington, doença de Alzheimer), doenças neuromusculares (doença de Duchenne, SMA), doenças infecciosas (por exemplo, HIV, HSV, HPV, HBV, Ebola, tuberculose, Cryptococcus) e doenças metabólicas (por exemplo, diabetes mellitus tipo 1). Eles também podem ser usados para fornecer agentes, kits e métodos diagnósticos para uso em tais imunoterapias, incluindo imagens, análise de tráfico de células e pesquisa e desenvolvimento de novas imunoterapias, bem como para fornecer profilaxia quando combinadas com terapias com células-tronco (por exemplo, HSCT).

[0032]As pontes aptaméricas podem intensificar a imunoterapia, melhorando a qualidade e a intensidade de uma resposta imunológica, tal como uma resposta imunológica mediada por células direcionada contra o câncer ou a infecção. Além disso, as pontes aptaméricas podem ser usadas

para direcionar um CAR universal para muitos alvos diferentes, bem como para redirecionar uma resposta imunológica para um alvo diferente. As pontes aptaméricas também podem ser usadas para ajustar a intensidade de uma resposta imunológica, ou para ativar ou desativar a resposta, simplesmente administrando pontes aptaméricas direcionadas de forma diferente ou ajustando a dose ou o cronograma de administração de uma ponte aptamérica ao longo do tempo. Um outro uso de pontes aptaméricas é converter ligantes inibidores, tal como PDL-1 em efeitos imunoestimulantes, ou seja, substituindo o aptâmero de ligação ao alvo de uma ponte aptamérica por um aptâmero que se liga ao ligante inibidor, convertendo assim o ligante inibidor em um ligante de ligação de CAR.

[0033]A terapia com CAR de acordo com a tecnologia presente tipicamente começa com a introdução de células que expressam CAR em um indivíduo em necessidade de imunoterapia. As células CAR podem ser obtidas *ex vivo*, por exemplo, transduzindo células removidas do indivíduo com um vetor viral, ou transfectando-as com um plasmídeo ou transposon, que faz com que os CARs sejam expressados nas células, seguido pela expansão das células em meio de cultura e introdução das células expandidas no indivíduo, tal como por injeção intravenosa. Alternativamente, um vetor viral, tal como um vetor lentiviral, que codifica o CAR pode ser administrado ao indivíduo, por exemplo, por injeção intravenosa, em que o CAR é expressado em células imunes desejadas (tais como células T autólogas ou alogênicas, células NK, células B, monócitos, macrófagos ou células dendríticas). Em qualquer um dos métodos, uma vez que uma

referência de células que expressam CAR é estabelecida dentro do corpo do indivíduo, as células CAR se multiplicam quando ativadas pela ligação de um alvo à porção scFv do CAR.

[0034]A administração de uma ponte aptamérica apropriada a um indivíduo contendo um número suficiente de células CAR irá induzir uma resposta imunológica contra o alvo especificado pelo aptâmero de ligação ao alvo da ponte após a ligação do aptâmero de ligação ao CAR da ponte ao CAR. A intensidade da resposta imunológica resultante, que pode mudar ao longo do tempo, é uma função do número de células CAR no indivíduo, acesso das células CAR ao alvo e a concentração da ponte aptamérica no alvo. A intensidade da resposta imunológica pode ser ajustada para cima ou para baixo ajustando o número de células CAR e/ou ajustando a concentração da ponte aumentando ou diminuindo a quantidade de ponte administrada ou reduzindo ou aumentando o intervalo de tempo entre as doses da ponte administrado.

[0035]Em um método terapêutico da presente tecnologia, a quantidade total de células CAR no indivíduo é estimada antes da administração da ponte aptamérica para iniciar a imunoterapia e o protocolo de administração (por exemplo, quantidade de dose, número de doses e/ou intervalo de administração) é projetado (por exemplo, usando um algoritmo) de modo que uma intensidade desejada e/ou duração da resposta imunológica seja produzida. A intensidade da resposta imunológica pode ser monitorada usando métodos conhecidos (por exemplo, usando análise de classificação de células ativadas por fluorescência (FACS) para quantificar o número e o tipo de certas células imunes ativadas em uma amostra de sangue do paciente, ou determinando os níveis de

certas citocinas em tal amostra. Se a resposta imunológica for muito forte e puder representar um perigo para o paciente, a resposta pode ser reduzida reduzindo a quantidade ou frequência de administração da ponte aptamérica, interrompendo-a completamente ou administrando um comutador “morte” que inclui o aptâmero de ligação a CAR único (que interromperia a ligação da ponte aptamérica a CAR), um peptídeo ou anticorpo que se liga ao CAR e interrompe a ligação da ponte aptamérica, o aptâmero de ligação ao alvo único (que interromperia a ligação da ponte aptamérica ao alvo), ou um domínio solúvel ou epítopo do CAR ou antígeno alvo.

[0036]Uma ponte aptamérica da presente tecnologia pode ser usada para redirecionar as células CAR para um alvo diferente. Isso pode ser útil no caso de escape antigênico pelo primeiro alvo, ou uma resposta fraca contra o primeiro alvo, exigindo a busca de um alvo diferente ou adicional. Em uma modalidade do método, uma ponte aptamérica diferente (por exemplo, segunda ou posterior) é administrada ao indivíduo, que tem o aptâmero de ligação a CAR igual ou similar, mas um aptâmero de ligação a alvo diferente da primeira ponte. Em outra modalidade, um CAR convencional que é direcionado diretamente para um primeiro alvo (isto é, sem o uso de um comutador de CAR) é expressado nas células no indivíduo, e uma ponte aptamérica é administrada ao indivíduo para redirecionar a resposta do CAR para um alvo diferente (segundo ou superior); a ponte aptamérica incluiria um aptâmero de ligação a CAR específico para o CAR de ligação a alvo e um aptâmero de ligação a alvo, com os dois aptâmeros ligados por um ligante. Essa abordagem pode ser usada várias

vezes (por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou mais vezes) sequencialmente ou simultaneamente com diferentes alvos no mesmo indivíduo, a fim de sintonizar a imunoterapia ou para encontrar um alvo ideal ou combinação de alvos. Uma modalidade da ponte aptamérica da presente tecnologia é ligada a um rótulo detectável para uso em formação de imagem ou quantificação das células CAR ou alvos dentro do indivíduo. Por exemplo, a ponte pode incluir uma porção ^{18}F afixada ao ligante ou a um aptâmero de ligação a CAR ou um aptâmero de ligação ao alvo para uso com varredura PET. O mesmo método pode ser praticado usando um aptâmero individual (tanto de ligação a CAR quanto de ligação ao alvo) que é usado na ponte aptamérica para terapia. Esse método pode ser empregado, por exemplo, para quantificar células CAR no indivíduo antes de iniciar a terapia ou durante a terapia.

[0037]Uma ponte aptamérica da presente tecnologia contém dois ou mais aptâmeros covalentemente ou não covalentemente ligados por uma porção de ligação. Os dois ou mais aptâmeros formam uma porção de ligação ao CAR e uma porção de ligação ao alvo, cada uma das quais contém um ou mais aptâmero(s). O aptâmero de ligação a CAR se liga a um CAR expressado em uma célula imune, tal como uma célula T, e em algumas modalidades ativa a célula imune, mas em outras modalidades (por exemplo, quando atua como um comutador de “matar”) não ativa a célula imune. O alvo é um alvo pretendido de imunoterapia, isto é, uma célula destinada à eliminação. Assim, a célula que expressa CAR e a ponte aptamérica destinam-se ao uso em conjunto como um sistema em uma imunoterapia, tal como a terapia de células T CAR. A ligação da ponte aptamérica ao CAR, bem como ao alvo, é de

preferência uma ligação de alta afinidade. O alvo pode ser uma proteína (tal como uma proteína receptora da superfície celular), uma célula, uma pequena molécula ou um ácido nucleico. O alvo é, de preferência, localizado na superfície de uma célula alvo, tal como uma célula cancerígena, e pode ou não ser encontrado em outras células (células normais) do indivíduo.

[0038]Em algumas modalidades, o alvo é um antígeno tumoral, tais como, CD19, CD20, CD22, CD30, CD123, BCMA, NY-ESO-1, mesotelina, PSA, PSMA, MART-1, MART-2, Gp100, tirosinase, p53, ras, Ftt3, Ligantes NKG2D, Lewis-Y, MUC1, SAP-1, survivina, CEA, Ep-CAM, Her2, Her3, EGFRvIII, BRCA1/2, CD70, CD73, CD16A, CD40, VEGF-α, VEGF, TGF-β, CD32B, CD79B, cMet, PCSK9, IL-4RA, IL-17, IL-23, 4-1BB, LAG-3, CTLA-4, PD-L1, PD-1, OX-40, ou SOD mutado. Os aptâmeros componentes de uma ponte aptamérica também podem se ligar especificamente a combinações de tais alvos. Em algumas modalidades, o alvo é um antígeno de um agente infeccioso, tal como gag, transcriptase reversa, tat, proteína de envelope de HIV-1, proteína circunsporozóita, proteínas não estruturais de HCV, hemaglutininas; uma ponte de aptâmero também pode se ligar especificamente a combinações de tais alvos.

[0039]Em uma modalidade preferida, o aptâmero ou aptâmeros de ligação a CAR é(são) selecionado(s) para ligação específica ao domínio extracelular de um CAR tendo afinidade para um neo-epítopo peptídico (PNE), isto é, um CAR anti-PNE. Uma vez que o PNE é um epítopo que não existe dentro do corpo do indivíduo, as células imunes que expressam o CAR anti-PNE não são ativadas por biomoléculas endógenas, mas

aguardam a administração ao indivíduo da ponte aptamérica, que serve como um comutador “de ativação” para as células imunes e direciona as células que expressam CAR em direção a um antígeno(s) ou tipo(s) de célula(s) que carrega(m) o(s) antígeno(s). A ativação imune e a expansão *in vivo* das células imunes que expressam CAR podem ser desativatas por administração ao indivíduo de um peptídeo contendo o PNE ou do aptâmero de ligação ao CAR ou aptâmero de ligação ao alvo da ponte na forma monomérica, qualquer um dos quais encerrará a ativação das células imunes que expressam CAR pelo alvo.

[0040]O PNE pode ser qualquer epítopo peptídico não encontrado no proteoma do hospedeiro (por exemplo, não encontrado no proteoma humano), para o qual um CAR anti-PNE pode ser obtido. Um exemplo de um PNE preferido é um fragmento de peptídeo do fator de transcrição GCN4 de *Saccharomyces cerevisiae* (NYHLENEVARLKKL, SEQ ID NO: 1). Um CAR que se liga a GCN4 com alta afinidade (Kd = 5,2 pM) e incluindo o anticorpo de cadeia única 52SR4 é descrito por Rodgers et al. Outros PNEs adequados para uso com um CAR e a ponte aptamérica correspondente incluem: (i) o peptídeo 15-mero N-terminal ESQPDPKPDELHKSS (SEQ ID NO: 2) da enterotoxina B estafilocócica, pareado com um anticorpo ligado a ele e descrito em Clin. Vaccine Immunol. 17(11): 1708–1717; (ii) desoxinivalenol, uma micotoxina de *E. coli*, pareada com um scFv que se liga à mesma e descrita em Protein Expr. Purif. 35(1): 84–92; (iii) proteína E5 de HPV-16, pareada com um anticorpo para a mesma descrita em Biomed. Res. Int. 2018; 2018: 5809028; (iv) uma proteína do vírus da raiva e uma ligação de scFv à mesma e descrita em Protein Expression and Purification 86 (2012) 75–81; (v) uma proteína

de matriz de influenza A pareada com uma ligação de scFv à mesma e descrita em Bioconjugate Chem. 2010, 21, 1134–1141; (vi) aminoácidos 134-145 (PRVRGLYFPAGG, SEQ ID NO: 3) da proteína pré-S2 do HBV, pareada com uma ligação de scFv à mesma e descrita em Viral Immunol. 30 de maio de 2018; (vii) um peptídeo VP 3 do vírus da hepatite de pato tipo 1, pareado com um scFv descrito em J. of Virological Methods 257 (2018) 73–78; (viii) um peptídeo (MEESKGYEPP, SEQ ID NO: 4) da Glicoproteína D do vírus do herpes bovino 1 pareado com um scFv descrito em Appl Microbiol Biotechnol. Dezembro de 2017; 101(23-24): 8331-8344; (ix) um peptídeo que compreende o aminoácido 159 da proteína VP1 do vírus da febre aftosa dos Territórios da África do Sul 2 (SAT2), pareado com uma ligação de scFv ao mesmo e descrito em Virus Research 167 (2012) 370-379; (x) um peptídeo (DRTNNQVKA, SEQ ID NO: 5) de OmpD de Salmonella typhimurium, pareado com uma ligação de scFv ao mesmo e descrito em Veterinary Microbiology 147 (2011) 162-169; (xi) um peptídeo de isoferritina de *E. coli*, pareado com uma ligação de scFv ao mesmo e descrito no Journal of Biotechnology 102 (2003) 177/189; (xii) um peptídeo (AQEPPRQ, SEQ ID NO: 6) localizado no terminal N da proteína de revestimento do vírus 3 associado a enrolamento da folha da videira, pareado com uma ligação de scFv ao mesmo, descrito em Arch. Virol. (2008) 153: 1075–1084; (xiii) um peptídeo (PTDSTDNNQNGGRNGARPKQRRPQ, SEQ ID NO: 7) de proteína N de SARS-CoV, pareado com uma ligação de scFv ao mesmo e descrito em Acta Biochimica et Biophysica Sinica 2004, 36 (8): 541–547; (xiv) um peptídeo contendo os aminoácidos 1-15 da proteína Tat de HIV, pareado com um scFv que se liga ao mesmo e é descrito em J. Virol. Abril de 2004;

78(7): 3792–3796; e (xv) um peptídeo dos aminoácidos 1363-1454 do domínio helicase de NS3 de HCV, pareado com uma ligação de scFv ao mesmo e descrito em J. Hepatology 37 (2002) 660–668, J Virol 1994;68:4829–4836, e Arch Virol 1997;142:601–610.

[0041]Outros exemplos de CARs universais que podem ser pareados com uma ponte aptamérica da presente tecnologia são descritos em J. Autoimmun. Maio de 2013. 42: 105-16; Blood Cancer J. 2016, 6 de agosto (8): e458; Oncotarget. 12 de dezembro de 2017, 8 (65): 108584–108603; Oncotarget 2017, 9 de maio (19): 31368–31385; Oncotarget 2018, 26 de janeiro de 9 (7): 7487–7500; e WO2016030414.

[0042]A porção de ligação de uma ponte aptamérica pode ser simplesmente uma ou mais de ligações covalentes entre aptâmeros individuais ou pode ser um polímero sintético ou de ocorrência natural, tal como um hidrocarboneto, poliéter, poliamina, poliamida, ácido nucleico, peptídeo, carboidrato ou lipídeo. Em certas modalidades, a porção de ligação não é um peptídeo. Em certas modalidades, a ponte aptamérica é desprovida de peptídeos, e é desprovida de polipeptídeos e proteínas. A porção de ligação também pode assumir a forma de uma estrutura em nanoescala (tais como um polímero, proteína, nanopartícula, nanotubo, nanocristal, nanofio, nanofita, nanocristal, micela ou lipossoma), ou uma estrutura em microescala (tal como uma micrograânulo ou uma célula), ou uma estrutura maior (tal como um suporte sólido). De preferência, a porção de ligação é um polímero biodegradável. A porção de ligação pode ser um polímero que é linear, ramificado, cíclico ou uma combinação dessas estruturas. A porção de ligação também pode servir como a

estrutura principal para uma estrutura dendrimérica, ou uma estrutura em forma de estrela ou cubo (tal como uma estrutura central à qual dois ou mais aptâmeros estão ligados). Para associação não covalente, dois ou mais aptâmeros individuais podem ser ligados por meio de interações não covalentes diretamente entre os aptâmeros ou por meio da interação com uma porção de ligação. As interações não covalentes podem ser, por exemplo, uma ou mais de ligações de hidrogênio, ligações iônicas, ligações hidrofóbicas, interações de van der Waals ou uma combinação das mesmas. Os pares de ligação de alta afinidade, tal como estreptavidina-biotina, podem ser usados para ligar aptâmeros não covalentemente em uma ponte aptamérica.

[0043]Um ligante ou porção de ligação pode ser qualquer porção química que une covalentemente ou não covalentemente unidades de aptâmero monoméricas. O ligante pode incluir ou consistir em, por exemplo, oligonucleotídeos, polinucleotídeos, peptídeos, polipeptídeos ou carboidratos. O ligante pode incluir ou consistir em um receptor de célula, um ligante ou um lipídeo. O ligante pode incluir ou consistir em uma cadeia de hidrocarboneto ou polímero, tal como uma cadeia alquila substituída ou não substituída ou estrutura em anel, um polímero de polietilenoglicol ou um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo modificado ou não modificado. O ligante pode ser uma única ligação covalente ou pode incluir uma ou mais de ligações iônicas, ligações de hidrogênio, ligações hidrofóbicas ou interações de van der Waals. O ligante pode incluir uma ponte dissulfeto, um oligossacarídeo derivado de heparina ou sulfato de heparana (um glicosoaminoglicano), um reticulador químico, hidrazona,

tioéter, éster ou triazol. O ligante pode ser clivável por uma enzima, permitindo a liberação de aptâmeros individuais e/ou a terminação de uma interação CAR-alvo pela ponte aptamérica. O ligante pode ter uma carga líquida positiva, negativa ou neutra. O ligante pode ser tão flexível ou rígido quanto desejado para garantir a preservação das propriedades funcionais das unidades de aptâmeros monoméricos individuais em uma construção multimérica e para promover a ligação ao CAR e ao alvo, ou para promover sua interação. O ligante pode incluir uma porção flexível, tal como um polímero de 5-20 resíduos de glicina e/ou serina. O ligante também pode conter uma estrutura rígida definida, tal como um polímero de glutamato, alanina, lisina e/ou leucina. O ligante pode incluir uma porção de dobradiça ou uma porção espaçadora. O ligante pode incluir uma cadeia C_2-C_{50} substituída ou não substituída ou estrutura de anel, um polímero de polietilenoglicol (por exemplo, hexaetilenoglicol) ou um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo modificado ou não modificado. O ligante pode incluir um oligossacarídeo derivado de heparina ou sulfato de heparana (um glicosoaminoglicano), um reticulador químico, peptídeo, polipeptídeo, hidrazona, tioéter ou éster.

[0044]Um ligante C_2-C_{50} pode incluir uma estrutura de 2 a 50 átomos de carbono (saturado ou insaturado, de cadeia linear, ramificada ou cíclica), 0 a 10 grupos arila, 0 a 10 grupos heteroarila e 0 a 10 grupos heterocíclicos, opcionalmente contendo uma ligação éter, (por exemplo, uma ou mais de unidades de alquilenoglicol, incluindo, mas não se limitando a, uma ou mais de unidades de etilenoglicol -O-(CH_2CH_2O)-; uma ou mais unidades de 1,3-propanodiol; uma

amina, uma amida; ou um tioéter. Cada átomo de carbono da estrutura principal pode ser independentemente não substituído (isto é, compreendendo apenas substituintes -H) ou pode ser substituído com um ou mais de grupos selecionados de alquila C_1 a C_3, -OH, $-NH_2$, -SH, -O-(alquila C_1 a C_6), -S-(alquila C_1 a C_6), halogênio, -OC(O)(alquila C_1 a C_6), e -NH-(alquila C_1 a C_6). Em algumas modalidades, o ligante é um ligante C_2-C_{20}, um ligante C_2-C_{10}, um ligante C_2-C_8, um ligante C_2-C_6, um ligante C_2-C_5, um ligante C_2-C_4 ou um ligante C_3, em que cada carbono pode ser independentemente substituído como descrito acima.

[0045]Em certas modalidades, há ligação não covalente entre aptâmeros, mediada, por exemplo, por ligação iônica, ligação de hidrogênio, ligação hidrofóbica, interações de van der Waals ou uma mistura das mesmas, sem qualquer porção de ligação interveniente unindo os aptâmeros individuais. Uma única construção de aptâmero multimérica também pode usar uma mistura de ligação covalente, através de uma porção ligante interveniente conectando certos aptâmeros, e ligação não covalente, sem uma porção ligante interveniente, em outros sítios de ligação entre aptâmeros.

[0046]Os ligantes podem opcionalmente ter uma ou mais de funcionalidades. Por exemplo, em algumas modalidades, o ligante é sensível à temperatura e/ou pH, o que significa que o ligante muda de conformação ou é clivado em uma faixa pré-projetada de temperatura e/ou pH.

[0047]Cada uma da porção de ligação ao CAR e da porção de ligação ao alvo de uma ponte aptamérica pode incluir aptâmeros únicos ou pode incluir duas ou mais unidades de aptâmero idênticas ou não idênticas. O uso de dois ou mais

aptâmeros idênticos, ou aptâmeros que não são idênticos, mas se ligam ao mesmo alvo, pode ter afinidade de ligação bastante intensificada por meio da cooperatividade de ligação ou ligação do mesmo alvo apresentado de forma diferente, particularmente para alvos, tais como células, que possuem várias cópias de uma determinada molécula alvo. Aptâmeros monoméricos idênticos podem ter sequências de nucleotídeos completamente idênticas (100% idênticas) ou podem ter sequências que são cerca de 99% idênticas, cerca de 98% idênticas, cerca de 97% idênticas, cerca de 96% idênticas, cerca de 95% idênticas, cerca de 94% idênticas, cerca de 93% idênticas, cerca de 92% idênticas, cerca de 91% idênticas ou cerca de 90% idênticas, ou pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idênticas.

[0048]Cada uma da porção de ligação ao CAR e da porção de ligação ao alvo de uma ponte aptamérica pode incluir dois ou mais aptâmeros individuais que não são idênticos e se ligam aos mesmos ou a diferentes alvos. Os aptâmeros não idênticos podem diferir em estrutura, sequência de nucleotídeos e/ou especificidade de ligação ou afinidade de ligação. Tal ponte pode se ligar especificamente a dois ou mais sítios diferentes no alvo, tais como diferentes epítopos de uma proteína ou diferentes proteínas de superfície de uma célula alvo, ou diferentes CARs, aumentando assim a afinidade e/ou especificidade para o alvo, ou ligação a diferentes células alvo e/ou diferentes células que expressam CAR. Os diferentes alvos ou diferentes CARS podem ser escolhidos de modo a maximizar o efeito terapêutico desejado, por meio de uma combinação de ações envolvendo diferentes células alvo

e/ou diferentes células que expressam CAR.

[0049]A função das células CAR pode ser melhorada direcionando-as para dois ou mais antígenos nas células alvo, por exemplo, para dois ou mais antígenos em uma determinada célula tumoral, tais como, CD19 e CD22, CD19 e CD123 ou CD19 e BCMA. Tal abordagem pode ajudar a superar a perda de antígeno tumoral e alcançar durabilidade da resposta melhorada. Uma ponte aptamérica pode ser manipulada geneticamente para reconhecer o CAR e dois ou mais antígenos na mesma célula alvo ligante dois ou mais aptâmeros juntos na porção de ligação ao alvo. Essa abordagem seria similar a células T de manipulação genética para expressar dois receptores de antígenos associados a tumor ao mesmo tempo, mas se estendendo além da limitação de duplo alvo de anticorpos e fornecendo menor custo e maior flexibilidade do que comutadores de CAR baseados em anticorpos.

[0050]As construções de ponte aptamérica da presente tecnologia podem ser usadas em uma composição imunoterapêutica. Uma modalidade de tal composição inclui a ponte aptamérica e um excipiente. A ponte aptamérica pode ser associada a outras moléculas ou a estruturas, tais como lipossomas, micro ou nanopartículas, moléculas direcionadas a receptores ou células, ou formulações orais, tópicas ou outras formulações para auxiliar na absorção, distribuição e/ou absorção. Em algumas modalidades, a ponte aptamérica é encapsulada, conjugada ou de outra forma associada a um veículo de dispensação de agente terapêutico. Em algumas modalidades, o veículo de dispensação de agente terapêutico é um veículo de dispensação de gene, tal como um vetor viral, ou inclui um vetor viral. O vetor viral pode ser qualquer

tipo de vetor adequado, tal como um vetor de expressão ou um plasmídeo. Em modalidades preferidas, o vetor é um vetor lentiviral. Em modalidades preferidas, o vetor de codificação de CAR é administrado ao indivíduo primeiro, e uma referência inicial da expressão do CAR e, em algumas modalidades, a expansão da célula CAR é estabelecida no indivíduo antes de administrar uma ponte aptamérica ao indivíduo para ativar uma resposta imunológica contra o alvo. A expressão do CAR e, opcionalmente, a expansão das células que expressam o CAR, podem ser detectadas e/ou quantificadas no indivíduo, por exemplo, pela administração de um aptâmero de ligação ao CAR (tal como a porção de ligação ao CAR da ponte aptamérica) em uma forma rotulada, seguido pela determinação do rótulo ligado nas células do sangue periférico ou pela determinação da distribuição do rótulo no corpo.

[0051]Os aptâmeros componentes de uma ponte aptamérica podem incluir quaisquer modificações desejadas na estrutura ou sequência do aptâmero. As modificações podem incluir substituições introduzidas em uma ou mais de frações de ribose ou desoxirribose de um aptâmero candidato. As modificações podem incluir substituições em uma ou mais de porções de fosfato de uma sequência candidata. As modificações podem incluir substituições em uma ou mais de porções de purina ou pirimidina de um aptâmero candidato, ou substituição de nucleotídeos naturais raros ou não naturais por nucleotídeos naturais de um aptâmero candidato. Modificações químicas podem ser introduzidas em ligações de fosfato de internucleotídeo, tais como substituição de fosfatos de internucleotídeo por fosforotioatos ou

boranofosfatos, adição de grupos de biotina, azida ou alquino. As modificações químicas podem ser introduzidas na posição C2′ do anel de ribose, tal como a introdução de flúor, unidades de LNA (ácido nucleico bloqueado) ou modificações de 2′-O-alquila. Um ou mais de nucleosídeos de um aptâmero pode(m) incluir uma modificação selecionada de uma modificação de açúcar na posição 2′ (tal como um 2′-amino (2′-NH_2), um 2′-fluoro (2′-F), ou um 2′-O-metil (2′-OMe)), uma modificação em uma amina exocíclica de citosina, uma modificação de ligação internucleosídica ou uma 5-metil-citosina. O aptâmero pode incluir um capeamento 3′, um capeamento 5′ e/ou uma desoxitimidina invertida no terminal 3′. Nucleotídeos raros, tal como 2-tiouridina (s2U), pseudouridina (Ψ) e dihidrouridina (D), ou nucleotídeos não naturais, tais como ácidos nucleicos de peptídeo (PNA), morfolino, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos nucleicos de glicol (GNA), ou ácidos nucleicos de treose (TNA) podem substituir os nucleotídeos de ocorrência comum. Os ácidos nucleicos não naturais (ácido xeno nucleico (XNA)) também podem ser incluídos.

[0052]Qualquer método adequado para preparar ou selecionar um aptâmero para um alvo pode ser empregado para obter os aptâmeros componentes de uma ponte aptamérica. Por exemplo, aptâmeros podem ser identificados por Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX). SELEX é descrito, por exemplo, na Patente US 5.270.163 que é incorporada nesse documento por referência. Resumidamente, SELEX começa com uma pluralidade de ácidos nucleicos (isto é, sequências de aptâmeros candidatos) contendo sequências de nucleotídeos variadas que são

colocadas em contato com um alvo. Os ácidos nucleicos não ligados são separados daqueles que formam complexos aptâmero-alvo. Os complexos aptâmero-alvo são então dissociados, os ácidos nucleicos são amplificados e as etapas de ligação, separação, dissociação e amplificação são repetidas por tantos ciclos quanto desejado para produzir uma população de aptâmeros de afinidade progressivamente maior para o alvo. Os ciclos de seleção e amplificação podem ser repetidos até que nenhuma melhora significativa na afinidade de ligação seja alcançada em outras repetições do ciclo.

[0053]Os ciclos de seleção e amplificação podem ser interrompidos antes que um único aptâmero seja identificado. Em tais casos, uma população de aptâmeros é identificada, o que pode oferecer informações significativas sobre a sequência, a estrutura ou os motivos que permitem a ligação do aptâmero a um alvo. Tal população de aptâmeros candidatos também pode informar quais porções do aptâmero não são críticas para a ligação ao alvo. Essa informação pode então guiar a geração de outros aptâmeros para o mesmo alvo. Os aptâmeros assim gerados podem ser usados como entrada para um novo ciclo de SELEX, potencialmente produzindo aptâmeros com melhores afinidades de ligação ou outras características de interesse.

[0054]Em algumas modalidades, são criadas sequências de aptâmeros candidatos que contêm construções de aptâmeros multiméricos, tais como pontes aptaméricas candidatas, que são então submetidas a mais ciclos de seleção como uma construção multimérica. Construções de aptâmeros candidatos multiméricos podem ser feitos ligante porções de aptâmeros

candidatos individuais com uma porção de ligação e, opcionalmente, usando tais construções como entrada para um ou mais ciclos de SELEX. Em algumas modalidades, aptâmeros individuais são independentemente selecionados por meio de um ou mais ciclos de SELEX e, finalmente, ligados em conjunto com uma porção de ligação. Portanto, a multimerização de aptâmeros monoméricos, bem como de construções de aptâmeros multiméricos, pode ser realizada antes, durante ou após os procedimentos de SELEX.

[0055]Para selecionar os aptâmeros componentes de uma ponte aptamérica, a seleção pode ser realizada de forma diferente para aptâmeros que se ligam a um CAR em comparação com aptâmeros que se ligam a um alvo em uma célula alvo. A seleção de aptâmeros que se ligam à célula alvo pode ser realizada associando aptâmeros candidatos a uma célula alvo intacta, célula recombinante, célula patogênica, partícula semelhante a vírus ou proteína alvo purificada ou epítopo peptídico, ou com uma preparação de membrana de uma célula alvo, ou célula recombinante contendo uma proteína de superfície antigênica. No entanto, a seleção de aptâmeros que se ligam a um CAR anti-PNE pode ser realizada pelo contato de aptâmeros candidatos com o CAR anti-PNE expressado em uma célula na presença e ausência do PNE. Assim, de acordo com esse método, aptâmeros tendo a afinidade de ligação desejada para um CAR anti-PNE serão aqueles cuja ligação ao CAR na ausência do PNE pode ser deslocada pela adição de um peptídeo contendo o PNE. No entanto, aptâmeros também podem ser selecionados usando peptídeos de regiões do CAR diferentes do, tais como adjacentes ao, sítio de ligação de PNE, e aptâmeros selecionados dessa maneira podem não ser

deslocados pelo PNE, mas podem oferecer ligação de alta afinidade para o CAR anti-PNE. Além disso, a fim de promover uma imunoterapia bem-sucedida, a ativação da célula que expressa o CAR, como uma célula T que expressa o CAR, deve ser monitorada durante o processo de seleção de aptâmero. Para essa finalidade, a seleção de aptâmeros de ligação a CAR candidatos pode ser realizada usando os aptâmeros de ligação a CAR candidatos instalados em um comutador aptamérico, juntamente com aptâmeros de ligação a alvo candidatos.

[0056]Os aptâmeros componentes de uma ponte aptamérica podem ter qualquer comprimento desejado. Em algumas modalidades, um aptâmero de componente inclui pelo menos cerca de 15 nucleotídeos. Em algumas modalidades, o aptâmero componente inclui até cerca de 100 nucleotídeos. O comprimento da ponte aptamérica pode determinar a distância entre as células que interagem através da ponte. Como tal, o comprimento da ponte está, de preferência, na faixa de cerca de 70 a cerca de 200 angstroms, ou cerca de 70 a cerca de 150 angstroms, ou cerca de 100 a cerca de 170 angstroms, ou cerca de 120 a cerca de 150 angstroms.

[0057]As técnicas podem ser usadas para identificar ou gerar aptâmeros com qualquer afinidade de ligação desejada. Em modalidades preferidas, um ou mais aptâmero(s) selecionado(s) te(ê)m um K_d para ligação ao alvo de cerca de 1 pM a cerca de 10 nM para ligação de alta afinidade (específica), ou de cerca de 100 nM a cerca de 10 μM para ligação de baixa afinidade. Em algumas modalidades, o aptâmero tem um K_d de cerca de 1 pM até cerca de 10 μM; cerca de 1 pM até cerca de 1 μM; cerca de 1 pM até cerca de 100

nM; cerca de 100 pM até cerca de 10 μM; cerca de 100 pM até cerca de 1 μM; cerca de 100 pM até cerca de 100 nM; ou cerca de 1 nM até cerca de 10 μM; cerca de 1 nM até cerca de 1 μM; cerca de 1 nM até cerca de 200 nM; cerca de 1 nM até cerca de 100 nM; cerca de 500 nM até cerca de 10 μM; ou cerca de 500 nM até cerca de 1 μM. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação de um aptâmero de componente dentro de uma ponte aptamérica é de 4 a 50 vezes maior do que a afinidade do aptâmero candidato monomérico. Em algumas modalidades, a afinidade dos aptâmeros componentes de uma ponte aptamérica para um ou mais de alvos pode ser ajustada alterando o grau de multimerização dentro da ponte, os aptâmeros componentes incluídos na ponte ou no ligante. Em certas modalidades, a porção de ligação ao CAR e/ou a porção de ligação ao alvo da ponte é multivalente, o que significa que contém dois ou mais de aptâmeros individuais que se ligam ao mesmo sítio ou a sítios diferentes no CAR ou alvo. Construções de aptâmeros multivalentes oferecem as vantagens de maior especificidade de ligação e/ou maior afinidade de ligação para o CAR ou o alvo. A afinidade de ligação de aptâmeros multiméricos pode ser muito maior do que para aptâmeros únicos porque a ligação do complexo multimérico pode exibir cooperatividade positiva ou alosterismo positivo entre os sítios de ligação individuais. A capacidade de selecionar e combinar cuidadosamente os sítios de ligação em uma porção de ponte de aptâmero multimérica aumenta o perfil de segurança, limitando os efeitos prejudiciais ou tóxicos e intensificando os efeitos eficazes do tratamento.

[0058]Em algumas modalidades, os aptâmeros de uma ponte aptamérica são estabilizados e/ou multimerizados por

complexação com outro composto, tal como biotina-avidina ou polietilenoglicol. Em algumas modalidades, aptâmeros são sintetizados utilizando um suporte sólido.

[0059]As pontes aptaméricas divulgadas nesse documento são úteis para prevenir ou tratar doenças proliferativas ou infecciosas. Um aspecto da presente invenção é um método de prevenção ou tratamento de câncer ou infecção por administração de uma ponte aptamérica ou uma formulação imunoterapêutica ou um veículo de dispensação de agente terapêutico incluindo uma ponte aptamérica.

[0060]A invenção também fornece um método para induzir ou intensificar uma resposta imunológica contra um câncer ou uma doença infecciosa em um indivíduo pela administração de uma ponte aptamérica ou uma formulação imunoterapêutica ou um veículo de dispensação de agente terapêutico incluindo uma ponte aptamérica.

[0061]A invenção fornece adicionalmente um método de associar especificamente uma célula imune que expressa um CAR com uma célula alvo contra a qual uma resposta imunológica ou uma resposta imunológica aumentada é desejada. Administrar uma ponte aptamérica tendo especificidade de ligação tanto para o CAR quanto para um alvo molecular na célula alvo leva à ativação da célula imune que expressa o CAR e ao início ou à intensificação de uma resposta imunológica contra a célula alvo.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Preparação de aptâmeros biespecíficos específicos para PSMA e CD3.

[0062]O aptâmero de RNA A10 (SEQ ID NO: 8) é uma sequência de 39 nucleotídeos que foi selecionada contra o

antígeno de membrana específico da próstata humana (PSMA) e usado como um agente de dispensação específico da próstata para siRNA (McNamara *et al*. 2006 - Dassie *et al*. 2009).

[0063]CELTIC_1s, CELTIC_19s e CELTIC_core são aptâmeros de DNA (SEQ ID NOS: 9, 10 e 11), e ARACD3-3700006 e ARACD3-0010209 são aptâmeros de RNA (SEQ ID NOS: 12 e 13), que foram previamente selecionados contra CD3 humano. Esses aptâmeros de DNA ou 2’-desoxi-2’-fluoro-timidina-RNA modificado (2’F-RNA) foram adquiridos da *baseclick* (Neuried, Alemanha) como oligos de fita simples purificados por HPLC-RP sintetizados via química de fosforamidita de fase sólida padrão. Os aptâmeros anti-CD3 não ativaram a secreção de citocinas ou a expressão do marcador de superfície, mesmo quando combinados com o anticorpo anti-CD28 coestimulador, e ao contrário dos anticorpos monoclonais anti-CD3 (dados não mostrados).

[0064]O aptâmero A10 foi modificado com um grupo azida em sua extremidade 3’ para subsequente dimerização internucleotídeos de triazol. A biotina foi adicionada à extremidade 5’ do aptâmero A10 como um Biotina-TEG que introduz um espaçador de polaridade mista de 16 átomos entre a sequência de aptâmeros e o sinalizador de biotina. Uma versão rotulada com Cy5 de A10 também foi sintetizada. CELTIC_1s, CELTIC_19s, CELTIC_core, ARACD3-3700006 e ARACD3-0010209 foram modificados com um grupo alquino em sua extremidade 5’ para subsequente dimerização internucleotídeos de triazol. Peso molecular, pureza e integridade foram verificados por HPLC-MS. A afinidade e a especificidade do aptâmero de RNA anti-PSMA A10 foram avaliadas em células PSMA-positivas e PSMA-negativas (Figura

7A).

[0065]Os aptâmeros anti-PSMA A10 e anti-CD3 foram heterodimerizados por reação click catalisada por cobre realizada por 60 min a 45°C com o kit Oligo2-Click L (baseclick, Neuried, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de reação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3% migrado em tampão TBE 1X (Invitrogen) a 100 V durante 30 min. Os géis foram visualizados usando o sistema de formação de imagem Bio-Rad e os resultados são mostrados nas Figuras 8A e 8B. Fatias de gel correspondentes a aptâmeros diméricos foram cortadas do gel e os ácidos nucleicos foram extraídos por 72 h a 8°C por eluição passiva em tampão NaCl-TE 25 mM. Dímeros de aptâmeros biespecíficos foram recuperados por precipitação com acetato de sódio padrão, recolocados em suspensão em água estéril e armazenados a -20°C até o uso.

Exemplo 2. Estabilidade Funcional do Aptâmero A10 Específico para PSMA.

[0066]A estabilidade do aptâmero de RNA A10 foi medida em solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS) contendo FBS a 5% ou apenas FBS. O aptâmero biotinilado foi desnaturado a 85°C por 5 min e então imediatamente resfriado em bloco de gelo a 4°C por 5 min. O aptâmero foi então diluído para uma concentração final de 2 µM em DPBS suplementado com FBS a 5% ou em FBS puro. As amostras foram incubadas a 37°C por 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h ou 24 h; a amostra de controle continha os aptâmeros recém-preparados sem incubação a 37°C. Estreptavidina-PE 100 nM foi então adicionado a cada solução e o aptâmero foi incubado com células LNCaP PSMA-positivas (Carcinoma da Próstata de

humano - ATCC CRL-1740). A meia-vida do aptâmero A10 em tampão DPBS contendo FBS a 5% ou em FBS puro foi então determinada usando citometria de fluxo no canal YL-1, com base na variação do número de células positivas para fluorescência em função do tempo de incubação a 37°C. Os resultados das medições são apresentados na Figura 9. O aptâmero A10 incubado em tampão DPBS contendo soro a 5% manteve-se estável durante 24 horas. Quando testado em soro puro, metade da atividade de ligação foi perdida nas primeiras 2 horas de incubação.

Exemplo 3. Determinação da afinidade e da especificidade do aptâmero biespecífico anti-PSMA x anti-CD3 para alvos expressados nas células.

[0067]A afinidade e a especificidade de aptâmeros biespecíficos anti-PSMA x anti-CD3 para proteínas alvo expressadas em células foram avaliadas por citometria de fluxo. Esses estudos foram realizados em Jurkat CD3-positivo (Linha de Células Humanas de Leucemia de Células T Agudas - ATCC TIB-152), Ramos CD3-negativos (Linha de Células Humanas de Linfoma de Burkitt - ATCC CRL-1596), LNCaP PSMA-positivo (Carcinoma de Próstata Humano - ATCC CRL-1740) e células PC-3 PSMA-negativas (Carcinoma da Próstata Humana - ATCC CRL-1435) por incubação com aptâmeros de RNA/DNA biotinilados em tampão SELEX ou aptâmeros de RNA/RNA em tampão DPBS, suplementado com FBS a 5%. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco Invitrogen), suplementado com FBS a 10% (Gibco Invitrogen) e Penicilina/Esteptomicina a 1% (Gibco Invitrogen) antes do uso. Antes do experimento, as células Jurkat, Ramos, LNCaP e PC-3 (2,5 x 10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e centrifugadas a 2500

rpm por 2 min. O sobrenadante foi descartado, e as células sedimentadas foram lavadas duas vezes com 200 µL de SELEX ou tampão DPBS-FBS a 5% pré-aquecido a 37°C. Cada etapa de lavagem foi seguida por centrifugação a 2500 rpm por 2 min. Os aptâmeros foram desnaturados a 85°C por 5 min e imediatamente colocados em um bloco de gelo de 4°C por 5 min. As amostras de teste foram subsequentemente diluídas em duas faixas de concentração diferentes: 3, 10, 30.100 e 300 nM (ensaios de ligação de CD3) e 30, 100 e 300 nM (ensaios de ligação de PSMA) seguido pela adição de estreptavidina rotulada com ficoeritrina 100 nM (estreptavidina-PE, eBioscience) para cada solução. Células Jurkat, Ramos, LNCaP e PC-3 foram recolocadas em suspensão nas diluições de aptâmeros (100 µL/poço) e incubadas a 37°C por 30 min em uma atmosfera umidificada com CO_2 a 5%. Como controles, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais CD3 (rotulados com PE, OKT3 humano anti-CD3, Invitrogen), anticorpos monoclonais PSMA (rotulados com Alexa Fluor 488, GCP-05 anti-PSMA humano, Invitrogen), PE-estreptavidina ou os respectivos tampões sem reagentes adicionais. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 2500 rpm por 2 min e o sobrenadante com as sequências não ligadas foi descartado. As células sedimentadas foram lavadas com SELEX ou DPBS-tampão FBS a 5% (200 µL/poço) e centrifugadas duas vezes de modo a remover todas as sequências ligadas de forma fraca e não específica. As células foram então lavadas com 1 mg/mL de solução de DNA de esperma de salmão (100 µL/poço) a 37°C em uma atmosfera umidificada com CO_2 a 5%. Após 30 min, a solução de esperma de salmão foi removida por centrifugação a 2500 rpm por 2 min e as células foram

adicionalmente lavadas duas vezes com SELEX ou tampão DPBS-5% (200 µL/poço) seguido por centrifugação. As células Jurkat, Ramos, LNCaP e PC-3 com sequências de DNA ou RNA anexadas foram então fixadas (solução BD CellFIX #340181) e as células positivas para fluorescência foram contadas por citometria de fluxo (AttuneNXT; Invitrogen, Inc.) no canal YL-1.

[0068]Os resultados dos estudos de ligação a células PSMA-positivas são apresentados nas Figuras 10A e 10B. Três aptâmeros de RNA/DNA (A10 x CELTIC_1s, A10 x CELTIC_19s, A10 x CELTIC_core) e dois aptâmeros de RNA/RNA (A10 x ARACD3-3700006 e A10 x ARACD3-0010209) foram analisados juntamente com o aptâmero monomérico A10. Para comparação, a ligação dos reagentes testados a células PC-3 PSMA-negativas também foi medida. Uma ligação dependente da dose a células LNCaP PSMA-positivas foi observada com A10 sem atingir a saturação do sinal nas concentrações testadas mais altas. A intensidade do sinal foi tão forte quanto para anticorpos de controle. A ligação residual do monômero AIO às células PC-3 foi observada apenas na concentração testada mais alta. Todos os aptâmeros PSMA x CD3 biespecíficos exibiram propriedades de ligação similares ao monômero A10, mas com uma especificidade melhorada para células alvo positivas, uma vez que a ligação residual a células PSMA negativas foi reduzida. Para cada concentração testada, a intensidade do sinal de aptâmeros biespecíficos foi superior à medida para o monômero A10, sugerindo que a heterodimerização resultou em uma melhora da afinidade.

[0069]Em outro experimento, foi investigada a ligação dos mesmos aptâmeros a células Jurkat CD3 positivas e células

Ramos CD-3 negativas. Ver as Figuras 11A e 11B. Como esperado, o aptâmero A10 não se ligou a essas duas linhas de células. A ligação residual de monômeros anti-CD3 às células Ramos foi observada apenas na concentração testada mais alta. Todos os aptâmeros PSMA x CD3 biespecíficos exibiram ligação dependente da dose similar, mas com especificidade superior para células alvo positivas, uma vez que a ligação residual a células CD3 negativas foi fortemente reduzida. Para cada concentração testada, a intensidade do sinal de aptâmeros biespecíficos foi inferior à medida para monômeros anti-CD3, sugerindo que a heterodimerização resultou na diminuição da afinidade.

[0070]Em conjunto, esses resultados sugerem que após a heterodimerização as propriedades de ligação de aptâmeros selecionados contra diferentes alvos não são destruídas devido ao impedimento estérico quando avaliadas separadamente. Dependendo dos parceiros selecionados, a especificidade e a afinidade para os respectivos alvos podem até ser melhoradas após a dimerização.

Exemplo 4. Ligação de aptâmeros biespecíficos direcionados a PSMA e CD3 como medido pela ressonância plasmônica de superfície.

[0071]As medições de afinidade de ligação foram realizadas usando um instrumento BIAcore T200 (GE Healthcare). Para analisar as interações entre os aptâmeros e as proteínas CD3 e PSMA, 300 unidades de ressonância de aptâmeros biotinilados foram imobilizadas em chips de Sensor AS da Série S (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). O tampão DPBS foi usado como o tampão de corrida. As interações foram medidas no modo “Ciclo

Cinético Único” a uma vazão de 30 µl/min e pela injeção de diferentes concentrações de CD3 ε/γ, CD3 ε/δ, IgG1 Fc e PSMA (Acro Biosystems). A maior concentração de aptâmero usada foi de 300 nM. Outras concentrações foram obtidas por diluição de 3 vezes. Todos os dados cinéticos da interação foram avaliados usando o software de avaliação BIAcore T200.

[0072]A comparação dos valores de K_d para aptâmeros monoméricos e biespecíficos mostra que a dimerização não perturba as propriedades de ligação de cada subunidade para seu alvo particular. A ligação simultânea de PSMA e CD3 ε/γ também pode ser registrada com o modo de injeção manual a uma vazão de 10 µl/min e pela injeção de uma solução do primeiro alvo em uma concentração de saturação seguida por uma solução do segundo alvo em um concentração saturante. É realizada uma segunda injeção com sequência invertida. Em ambas as sequências, cada injeção que resulta em respostas de intensidades iguais indica que ambos os braços de aptâmeros biespecíficos são capazes de se ligar ao segundo alvo enquanto o sítio de ligação para o primeiro antígeno está ocupado. Monômeros que falham em responder a ambas as injeções de soluções alvo indicam que o aptâmero biespecífico pode ligar simultaneamente ambos os alvos.

Exemplo 5. Bioatividade de aptâmeros biespecíficos específicos para PSMA e CD3.

[0073]Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) não estimuladas. PBMCs recém-preparadas foram isoladas de camadas leucoplaquetárias obtidas de doadores saudáveis (Etablissement Français du Sang, Divisão Rhônes-Alpes). Depois de diluir o sangue com DPBS, as PBMCs foram separadas

em um gradiente de densidade FICOLL (FICOLL-PAQUE PREMIUM 1.077 GE Healthcare), lavadas duas vezes com DPBS, recolocadas em suspensão em meio RPMI-1640 (Gibco Invitrogen) para obter uma densidade celular de 5 x 10^6 células/ml. Essas PBMCs foram usadas como células efetoras.

[0074]As células alvo LNCaP foram rotuladas com calceína AM 2 µM (Trevigen Inc, Gaithersburg, MD, EUA) por 30 min a 37°C em meio de cultura de células. O fluorocromo calceína AM é um corante que fica preso dentro das células LNCaP vivas e apenas liberado após a lise redirecionada. Após 2 lavagens em meio de cultura de células, uma densidade celular de 5 x 10^5 células/ml foi ajustada em meio RPMI-1640 e alíquotas de 100 µl de 50.000 células foram usadas por reação de ensaio. Uma reação padrão a 37°C/CO_2 a 5% durou 4 horas e usou 5 x 10^4 células de células alvo rotuladas com calceína AM, 5 x 10^5 PBMCs (razão E/T de 1:10) e 20 µl de soluções de aptâmero biespecífico a 1 µM em um volume total de 200 µl. Após a reação citotóxica, o corante liberado no meio de incubação foi quantificado em um leitor de fluorescência (VarioSkan Lux, ThermoFisher, Waltham, MA, EUA) e comparado com o sinal de fluorescência de uma reação de controle em que o composto citotóxico estava ausente e uma reação na qual o sinal de fluorescência foi determinado para células totalmente lisadas (onde os aptâmeros foram substituídos pelo reagente A100 adquirido na Chemometec, Allerod, Dinamarca). Com base nessas leituras, a citotoxicidade específica foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: [fluorescência (amostra) - fluorescência (controle)]/[fluorescência (lise total) - fluorescência (controle)] x 100.

[0075]Os resultados do ensaio de citotoxicidade obtidos após 4 h de incubação na presença de aptâmeros 100 nM com uma única razão E:T de 10:1 são mostrados na Figura 12. A atividade nula a fraca de morte celular específica (<10%) foi observada com Aptâmeros biespecíficos de RNA/DNA de PSMAxCD3. A citotoxicidade específica superior foi medida com aptâmeros de RNA/RNA A10 x ARACD3-3700006 e A10 x ARACD3-0010209 que induziu a morte de 40-50% das células LNCaP. O monômero de controle A10 sem a porção de ligação a CD3 não induziu qualquer citotoxicidade.

[0076]Esses resultados sugerem que os comutadores de aptâmeros manipulados geneticamente são capazes de recrutar linfócitos T efetores para células alvo para redirecionar sua maquinaria citolítica e eliminar uma população de células em particular.

Exemplo 6. Aptâmeros PNE Anti-CAR.

Biblioteca e iniciadores

[0077]O molde inicial da biblioteca de RNA e os iniciadores foram sintetizados por IDT (Coralville, IA, EUA) como DNA de fita simples: 5’-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT-(N20)-TTTCTGCAGCGATTCTTGTTT-(N10)-GGAGAATGAGGAACCCAGTGCAG-3’ (molde, SEQ ID NO:14), 5’-TAATACGACTCACTATAGGGCCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT-3’ (iniciador direto, SEQ ID NO: 15), 5’-CTGCACTGGGTTCCTCATTCTCC-3’ (iniciador reverso, SEQ ID NO: 16). Duas sequências de “bloqueio” curtas (adquiridas da IDT) complementares às regiões de iniciador constantes em 5’ e 3’ foram sintetizadas para minimizar o efeito dos iniciadores na estrutura secundária: 5’-ATCACCGACTGCCCATAGAGAGG-3’ (sequência de bloqueio direta, SEQ ID NO:17), 5’-CTGCACTGGGTTCCTCATTCTCC-

3’ (sequência de bloqueio reversa, SEQ ID NO: 18). Uma sequência de “captura” biotinilada adicional, complementar à região central constante da biblioteca também foi sintetizada por IDT: 5’-Biotina-GTC-PEG-6 Espaçador-CAAGAATCGCTGCAG-3’ (SEQ ID NO: 19). Todos os materiais foram encomendados em uma escala de 250 nmol e submetidos à purificação por dessalinização.

[0078]A biblioteca de RNA para seleção de aptâmero de RNA foi modificada com 2’Fluoro-(2’F-)pirimidinas para maior estabilidade na aplicação final. O iniciador T7 foi combinado com sequências de molde de biblioteca para extensão do iniciador com Titanium Taq DNA polimerase (Clontech; Mountain View, CA, EUA). O material estendido por iniciador foi então transcrito usando o Kit de Transcrição Durascribe® T7 (Epicenter; Madison, WI, EUA), purificado em poliacrilamida desnaturante com ureia 8 M (Sequel NE Reagent, Parte A e Parte B), que foi adquirido na American Bioanalytical (Natick, MA, EUA). Durante a seleção, a biblioteca foi transcrita reversamente usando Transcriptase Reversa SuperScript IV (Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante e amplificada usando Titanium Taq DNA polimerase da Clontech. Durante a seleção, a biblioteca foi amplificada usando o seguinte protocolo de PCR (10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, com ativação por HotStart inicial de 60 segundos a 95°C). A biblioteca de RNA foi então transcrita usando o Kit de Transcrição Durascribe® T7 e purificada em gel de poliacrilamida (PAGE). O tampão de eluição em gel para recuperação de biblioteca pós-purificação de 4°C durante a noite foi preparado para NH_4OAc 0,5 M, EDTA 1 mM (ambos adquiridos de Teknova), SDS a

0,2% (adquiridos de Amresco), pH 7,4.

Seleção de aptâmero de RNA

[0079]A triagem da biblioteca de RNA foi conduzida com seis ciclos de seleção usando uma abordagem *Melting-Off*. Os ciclos 1-6 da seleção foram realizadas em uma linha de célula HEK293T estável (Rim Embrionário Humano - ATCC CRL-1573) que expressa o CAR GCN4 (S25R14) (Receptor de Antígeno Quimérico) direcionado contra neo-epítopos peptídicos (PNE) na célula superfície e com células HEK293T estavelmente transduzidas que abrigam um CAR anti-CD19 para a etapa de seleção negativa (célula-SELEX). A linha de célula HEK293T foi obtida da American Type Cell Collection e cultivada em meio DMEM (Gibco Invitrogen), suplementado com FBS a 10% (Gibco Invitrogen) e Penicilina/Esteptomicina a 1% (Gibco Invitrogen). Todas as seleções foram realizadas em meio DMEM suplementado com matriz de soro 10% e cada um dos ciclos SELEX incluiu as seguintes etapas: imobilização da biblioteca de RNA nos grânulos magnéticos revestidos com estreptavidina, contra seleção, incubação com o alvo, transcrição reversa de sequências que reconheceu o alvo, amplificação por PCR e transcrição para RNA. Antes de cada ciclo, uma alíquota de grânulos magnéticos revestidos com estreptavidina (Estreptavidina T1 MyOne Dynabeads™, tipicamente 1 pmole de material biotinilado é usado com cada 20 µg de Dynabead™, a quantidade variando dependendo da estringência necessária) foi pré-lavada três vezes com 200 µL de PBS-T (concentração final de 0,01% Tween 20, pH 7,4) de tampão de lavagem. Além disso, as células alvo e contra-alvo foram colhidas com tratamento com tripsina, sedimentadas por centrifugação a 5.000 x g e lavadas duas vezes com tampão DPBS antes de serem

colocadas em suspensão em 200 µL de tampão DPBS; o número de células usadas por ciclo está delineado na Tabela 1. A biblioteca de RNA foi redobrada em meio DMEM sem soro (desnaturação de 1 minuto a 90°C, anelamento de 5 minutos a 60°C, depois 5 minutos a 23°C) com duas vezes a quantidade molar da biblioteca de ambas as sequências de bloqueio do iniciador e a sequência de captura. Isso foi feito para minimizar os efeitos das regiões de iniciador constantes na estrutura secundária de aptâmeros, para permitir que a biblioteca seja capturada pelos grânulos magnéticos através de uma interação de ligação de estreptavidina-biotina e para proteger as extremidades dos aptâmeros de exonucleases.

[0080]Após redobramento e bloqueio do iniciador, a biblioteca foi capturada em grânulos magnéticos por incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. Os grânulos magnéticos foram então separados da solução e lavados três vezes com 200 µL do tampão de seleção a 37°C para eliminar qualquer PBS-T remanescente e espécies de biblioteca não especificamente ligadas. Os grânulos magnéticos com biblioteca de RNA imobilizado foram então submetidos a uma incubação de contra-seleção em 200 µL de preparação de 10^6 contra-células a 37°C por 30 minutos que resultou na liberação de sequências não específicas dos grânulos magnéticos. Os membros não específicos da biblioteca foram então descartados e os grânulos magnéticos foram lavados seis vezes por 7 min com 200 µL do tampão de seleção ao longo de uma hora (7 minutos em DPBS a 37°C, 3 minutos para separar magneticamente, o sobrenadante foi descartado e o processo repetido) para reduzir a probabilidade de que um membro não específico da biblioteca possa sobreviver para responder

durante a etapa de seleção positiva. A seleção positiva consistiu na incubação da biblioteca de RNA de grânulos magnéticos com 200 µL da preparação de células positivas a 37°C por 60 minutos durante os ciclos 1-4 e 30 minutos durante os ciclos 5-6 e as avaliações paralelas (contagens de células na Tabela 1). Assim que a seleção positiva foi concluída, o sobrenadante contendo as sequências que reconheceram o alvo foi separado dos grânulos magnéticos e recuperado. O sobrenadante foi então submetido a uma segunda separação magnética para garantir que os grânulos magnéticos foram completamente removidos. Células CAR PNE HEK293T direcionadas foram sedimentadas por centrifugação a 5.000 x g e lavadas uma vez com 200 µL de tampão DPBS para remover espécies de aptâmeros fracamente associadas. A biblioteca foi recuperada das células por desnaturação por calor a 70°C. A biblioteca recuperada em todos os ciclos passou por precipitação de proteínas com reagente MPC (Lucigen Corp, Middleton, WI, EUA), precipitação com etanol e concentração da amostra, e foram purificadas por PAGE desnaturante de 10% com ureia 8 M. A biblioteca foi então transcrita reversamente usando Transcriptase Reversa SuperScript IV de acordo com as instruções do fabricante, amplificada usando Titanium® Taq DNA polimerase e transcrita usando o Kit de Transcrição Durascribe® T7 de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos da transcrição foram então purificados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 10% (PAGE) com ureia 8 M. As fatias de gel foram excisadas, eluídas durante a noite a 4°C em tampão de eluição de gel e a concentração da biblioteca de RNA foi calculada medindo a absorbância a 260 nm em NanoDrop-1000. Durante os ciclos

sucessivos do processo SELEX, a concentração da biblioteca de RNA e o número de células alvo diminuíram gradualmente. Avaliações paralelas adicionais e “teste de aptidão cruzada” foram realizadas para facilitar a identificação de bons aptâmeros candidatos durante a análise bioinformática pós-seleção.

Tabela 1: Condições SELEX usadas para cada ciclo de seleção de aptâmeros de RNA anti-CAR PNE

Ciclo	**Contra-seleção**		**Lavagens**	**Seleção Positiva**		**Biblioteca de Entrada**
	[CAR CD19]	**Tempo de incubação**	**7min/3min**	**[CAR PNE]**	**Tempo de incubação**	**Picomol**
1	1 x 10^6	30 minutos	6	1 x 10^6	60 minutos	1000
2	1 x 10^6	30 minutos	6	1 x 10^6	60 minutos	100
3	1 x 10^6	30 minutos	6	1 x 10^6	60 minutos	100
4	1 x 10^6	30 minutos	6	1 x 10^6	60 minutos	100
5	1 x 10^6	60 minutos	6	1 x 10^5	30 minutos	50
6	1 x 10^6	60 minutos	6	1 x 10^5	30 minutos	100
Paralelo (x)	1 x 10^6	60 minutos	6	1 x 10^6	30 minutos	100
Paralelo (+)	1 x 10^6	60 minutos	6	1 x 10^5	30 minutos	100

[0081]Os aptâmeros candidatos foram escolhidos por sequenciamento de próxima geração usando o sistema MiniSeq Mid Output (150 ciclos) (Illumina). Vários aptâmeros foram selecionados para mais testes. Para essa finalidade, aptâmeros de RNA modificados com 2’-desoxi-2’-fluoro-timidina foram adquiridos da Eurogentec-Kaneka (Liège, Bélgica) como oligos de fita simples purificados por HPLC-RP sintetizados via química de fosforamidita em fase sólida padrão. A biotina foi adicionada à extremidade 5’ dos aptâmeros como uma Biotina-TEG que introduz um espaçador de polaridade mista de 16 átomos entre a sequência de aptâmeros e o sinalizador de biotina. Peso molecular, pureza e integridade foram verificados por HPLC-MS. As sequências de

ácido nucleico desses aptâmeros são mostradas na Figura 13A.

Exemplo 7. Determinação da afinidade e da especificidade de aptâmeros anti-CAR PNE para o alvo expressado em células humanas.

[0082]A afinidade e a especificidade ARAA-00100001, ARAA-05200001, ARAA-0060095, ARAA-01300011 e ARAA-01700001 aptâmeros para proteínas-alvo expressadas nas células foram avaliadas por citometria de fluxo. Esses estudos foram realizados em HEK293T, HEK293T-CAR CD19 (linha de célula HEK293T transduzida com um vetor lentiviral que codifica para um CAR direcionado contra o antígeno CD19) e HEK293T-CAR PNE (linha de célula HEK293T transduzida com um vetor lentiviral que codifica para um CAR direcionado contra peptídeo PNE) células por incubação com aptâmeros biotinilados em tampão DPBS, suplementadas com FBS a 5%. As células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco Invitrogen), suplementadas com FBS a 10% (Gibco Invitrogen) e Penicilina/Esteptomicina a 1% (Gibco Invitrogen) antes do uso. Antes do experimento, as células (2,5 x 10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e centrifugadas a 2500 rpm por 2 min. O sobrenadante foi descartado, e as células sedimentadas foram lavadas duas vezes com 200 µL de tampão DPBS-FBS a 5% pré-aquecido a 37°C. Cada etapa de lavagem foi seguida por centrifugação a 2500 rpm por 2 min. Os aptâmeros foram desnaturados a 85°C por 5 min e imediatamente colocados em um bloco de gelo de 4°C por 5 min. As sequências foram subsequentemente diluídas em duas faixas de concentração diferentes: 30, 100 e 300 nM (teste primário de 5 aptâmeros candidatos) e 30, 50, 75 e 100 nM (repetição de colorações com ARAA-00100001 e ARAA-01700001)

seguido pela adição de estreptavidina rotulada com ficoeritrina 100 nM (estreptavidina-PE, eBioscience) para cada solução. As células foram recolocadas em suspensão nas diluições de aptâmero (100 µL/poço) e incubadas a 37°C por 30 min em uma atmosfera umidificada com CO_2 a 5%. Como controles, as células foram incubadas com o peptídeo PNE (rotulado com Alexa Fluor 488, Provepharm, Marseille, França), estreptavidina-PE (eBioscience) ou os respectivos tampões sem reagentes adicionais. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 2500 rpm por 2 min e o sobrenadante com as sequências não ligadas foi descartado. As células sedimentadas foram lavadas com DPBS-tampão FBS a 5% (200 µL/poço) e centrifugadas duas vezes de modo a remover todas as sequências ligadas de forma fraca e não específica. As células foram então lavadas com solução de DNA de esperma de salmão 1 mg/mL (100 µL/poço) a 37°C em uma atmosfera umidificada com CO_2 a 5%. Após 30 min, a solução de esperma de salmão foi removida por centrifugação a 2500 rpm por 2 min e as células foram adicionalmente lavadas duas vezes com DPBS-tampão tampão a 5% (200 µL/poço) seguido de centrifugação. As células com sequências de DNA afixadas foram então fixadas (solução BD CellFIX #340181) e as células positivas para fluorescência foram contadas por citometria de fluxo (AttuneNXT; Invitrogen, Inc.) no canal YL-1.

[0083]Os resultados dos estudos de ligação a HEK293T, HEK293T-CAR CD19 e HEK293T-CAR PNE são mostrados na Figura 14A. Uma ligação dependente da dose a células HEK293T CAR PNE-positivas foi observada com aptâmeros ARAA-00100001 e ARAA-01700001 sem atingir a saturação do sinal nas concentrações testadas mais altas. A intensidade do sinal

foi mais forte do que o peptídeo PNE de controle. A ligação residual de ambos os aptâmeros às células CAR PNE-negativas foi observada em concentrações acima de 50 nM. ARAA-05200001, ARAA-0060095 e ARAA-01300011 não exibiram qualquer coloração diferencial entre as três linhas de células HEK293T, indicando que estes três aptâmeros não eram específicos para o CAR PNE. Os estudos de ligação com aptâmeros ARAA-00100001 e ARAA-01700001 foram repetidos em uma faixa mais ampla de concentrações que confirmaram os resultados do experimento primário (ver Figuras 14B e 14C.).

[0084]Em outro experimento, a ligação dos mesmos aptâmeros a PBMCs de humanos que expressam CAR PNE foi investigada. PBMCs foram isoladas de doadores de sangue como já descrito no Exemplo 5 e cultivados em meio RPMI-1640 (Gibco Invitrogen), suplementado com FBS a 10% (Gibco Invitrogen) e Penicilina/Esteptomicina a 1% (Gibco Invitrogen) a 37°C, CO_2 a 5%. Após 2 h de transdução com um vetor lentiviral que codifica para o CAR direcionado contra o peptídeo PNE, as células foram mantidas em cultura por mais 72 h antes de os estudos de ligação serem realizados após o método descrito acima. Como mostrado na Figura 16, um sinal dependente da dose foi medido com ambos os aptâmeros que atingiram um patamar em concentrações acima de 300 nM. A intensidade do sinal foi mais forte do que o peptídeo PNE de controle.

[0085]Ambos os conjuntos de experimentos mostram que os aptâmeros ARAA-00100001 e ARAA-01700001 selecionados contra um CAR que reconhece o peptídeo PNE são capazes de reconhecer especificamente seu alvo expressado em células humanas que foram manipuladas geneticamente para expressar esse Receptor

de Antígeno Quimérico particular.

Exemplo 8. Estabilidade no soro de aptâmeros específicos para CAR-PNE.

[0086]A estabilidade de aptâmeros de RNA anti-CAR PNE (ARAA-00100001 e ARAA-01700001) foi estudada em tampão DPBS contendo soro fetal bovino a 5% (FBS), meio RPMI contendo FBS a 10% ou FBS puro. Os aptâmeros foram desnaturados a 85°C por 5 min e então imediatamente resfriados em bloco de gelo a 4°C por 5 min. As sequências foram então diluídas para uma concentração final de 2 µM em tampão DPBS suplementado com FBS a 5%, meio RPMI suplementado com FBS a 10% ou em soro FBS puro. As amostras foram incubadas a 37°C por 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h ou 24 h; as amostras de controle continham os aptâmeros recém-preparados sem incubação a 37°C. A meia-vida dos aptâmeros em seus respectivos tampões foi determinada por migração em gel de agarose usando o método de eletroforese desnaturante como a seguir: a amostra de aptâmero de diferentes tempos de incubação foi misturada com tampão de carga contendo formamida (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA) e após desnaturação a 85°C por 5 min, 15 µL de cada amostra foram colocados em gel de agarose a 3% recém preparados contendo SYBRsafe (Invitrogen) como um marcador de coloração de RNA. A migração de aptâmeros de RNA em gel de agarose foi realizada em tampão TBE 1X (Invitrogen) pela aplicação de 100 V durante 20 min. Os géis foram visualizados usando o sistema de formação de imagem Bio-Rad e os resultados são mostrados na Figura 15. Ambos os aptâmeros foram estáveis por pelo menos 2 h nas diferentes condições de incubação, já que a intensidade dos sinais de RNA começou a diminuir após

4 h.

Exemplo 9. Preparação de aptâmeros biespecíficos específicos para PSMA e CAR-PNE.

[0087]Os aptâmeros ARAA-00100001 e ARAA-01700001 foram adquiridos da baseclick (Neuried, Alemanha) como oligos de RNA 2’-F purificados por HPLC-RP sintetizados via química de fosforamidita em fase sólida padrão.

[0088]O aptâmero A10 2’F-RNA foi modificado com um grupo azida em sua extremidade 3’ para subsequente dimerização internucleotídeos com triazol. A biotina foi adicionada à extremidade 5’ do aptâmero A10 como uma Biotina-TEG que introduz um espaçador de polaridade mista de 16 átomos entre a sequência de aptâmeros e o sinalizador de biotina. ARAA-00100001 e ARAA-01700001 foram modificados com um grupo alquino em sua extremidade 5’ para subsequente dimerização internucleotídeos com triazol. Peso molecular, pureza e integridade foram verificados por HPLC-MS.

[0089]O procedimento descrito no Exemplo 1 foi usado para preparar aptâmeros biespecíficos anti-PSMA A10 e anti-CAR PNE. Os resultados da reação click são mostrados na Figura 8A.

Exemplo 10. Determinação da afinidade e da especificidade do aptâmero biespecífico anti-PSMA x anti-CAR PNE para alvos expressados nas células.

[0090]A afinidade e a especificidade dos aptâmeros anti-PSMA x anti-CAR PNE para proteínas alvo expressas nas células foram avaliadas por citometria de fluxo. Esses estudos foram realizados em LNCaP PSMA positiva (Carcinoma de Próstata de humano - ATCC CRL-1740) e PC-3 PSMA negativa (Carcinoma de Próstata de humano - ATCC CRL-1435) em tampão

DPBS contendo FBS a 5%, como descrito no Exemplo 3. Os aptâmeros foram testados em uma única faixa de concentração: 30, 100 e 300 nM.

[0091]Os resultados dos estudos de ligação a células PSMA-positivas são apresentados na Figura 10A. Dois aptâmeros de RNA/RNA, A10 x ARAA-00100001 e A10 x ARAA-01700001 foram analisados juntamente com o aptâmero monomérico A10. Para comparação, a ligação dos reagentes testados a células PC-3 PSMA-negativas também foi medida.

[0092]Uma ligação dependente da dose a células LNCaP PSMA-positivas foi observada com A10 sem atingir a saturação do sinal nas concentrações testadas mais altas. A intensidade do sinal foi tão forte quanto para anticorpos de controle. A ligação residual do monômero A10 às células PC-3 foi observada apenas na concentração testada mais alta. Ambos os aptâmeros biespecíficos PSMA x CAR PNE exibiram propriedades de ligação similares ao monômero A10, mas com uma especificidade melhorada para células alvo positivas, uma vez que a ligação residual a células PSMA negativas foi reduzida. Para cada concentração testada, a intensidade do sinal de aptâmeros biespecíficos foi superior à medida para o monômero A10, sugerindo que a heterodimerização resultou em uma melhora da afinidade.

[0093]Em conjunto, os resultados dos Exemplos 9 e 10 sugerem que a heterodimerização de aptâmeros selecionados contra diferentes alvos não tem impacto significativo nas propriedades de ligação de cada porção quando avaliada separadamente.

Exemplo 11. Bioatividade de aptâmeros biespecíficos específicos para CAR-PNE e PSMA.

[0094]Os ensaios de citotoxicidade são realizados em células mononucleares de sangue periférico não estimuladas (PBMCs). As PBMCs recém-preparadas são isoladas de camadas leucoplaquetárias obtidas de doadores saudáveis (Etablissement Français du Sang, Division Rhônes-Alpes). Depois de diluir o sangue com DPBS, as PBMCs são separadas em um gradiente de densidade FICOLL (FICOLL-PAQUE PREMIUM 1.077 GE Healthcare), lavadas duas vezes com DPBS, recolocadas em suspensão em meio RPMI-1640 (Gibco Invitrogen) para obter uma densidade celular de 5 x 10^6 células/ml. Essas PBMCs são transduzidas com vetores lentivirais que expressam o receptor CAR-PNE. Essas PBMC-CAR-PNE são usadas como células efetoras.

[0095]As células alvo LNCaP são rotuladas com calceína AM 2 µM (Trevigen Inc, Gaithersburg, MD, EUA) por 30 min a 37°C em meio de cultura de células. O fluorocromo da calceína AM é um corante que fica preso dentro das células LNCaP vivas e apenas liberado após a lise redirecionada. Após 2 lavagens em meio de cultura de células, uma densidade celular de 5 x 10^5 células/ml é ajustada em meio RPMI-1640 e alíquotas de 100 µL de 50.000 células são usadas por reação de ensaio. Uma reação padrão a 37°C/CO_2 a 5% por 4 horas e usa 5 x 10^4 células de células alvo rotuladas com calceína AM, 5 x 10^5 PBMCs-CAR-PNE (razão E/T de 1:10) e 20 µl de soluções de aptâmero biespecífico em 1 µM em um volume total de 200 µl. Após a reação citotóxica, o corante liberado no meio de incubação é quantificado em um leitor de fluorescência (VarioSkan Lux, ThermoFisher, Waltham, MA, EUA) e comparado com o sinal de fluorescência de uma reação de controle em que o composto citotóxico está ausente e uma reação na qual

o sinal de fluorescência foi determinado para células totalmente lisadas (onde os aptâmeros foram substituídos pelo reagente A100 adquirido da Chemometec, Allerod, Dinamarca). Com base nessas leituras, a citotoxicidade específica é calculada de acordo com a seguinte fórmula: [fluorescência (amostra) - fluorescência (controle)]/[fluorescência (lise total) - fluorescência (controle)] x 100.

[0096]Os resultados do ensaio de citotoxicidade obtidos após 4 h de incubação na presença de aptâmeros 100 nM com uma única razão E:T de 10:1 são determinados. A citotoxicidade específica é medida com aptâmeros de RNA/RNA A10 x PNE que induzem a morte de mais que 30% das células LNCaP. O monômero de controle A10 sem a porção de ligação a PNE não induz qualquer citotoxicidade.

[0097]Os resultados podem ser usados para mostrar que os comutadores de aptâmeros manipulados geneticamente são capazes de recrutar linfócitos T efetores para células alvo para redirecionar sua maquinaria citolítica e eliminar uma população de células em particular.

Exemplo 12. Tratamento de câncer em um modelo pré-clínico com aptâmero anti-CD3 x Anti-PSMA.

[0098]A eficácia e a toxicidade *in vivo* de diferentes construções de aptâmeros multiméricos em comparação com aptâmeros monoméricos em camundongos são avaliadas. Camundongos adultos com tumores PSMA positivos são administrados com aptâmeros que se ligam especificamente a CD3 e PSMA, em diferentes grupos de camundongos, os aptâmeros estão na forma monomérica ou multimérica. A eficácia é avaliada medindo o tamanho do tumor, o crescimento e a taxa

do tumor e a sobrevivência nos grupos tratados versus controles. A toxicidade é avaliada pela incidência de reações adversas em grupos tratados versus controles.

Exemplo 13. Tratamento de câncer em um modelo pré-clínico com um comutador aptamérico T CAR.

[0099]A eficácia e a toxicidade *in vivo* de construções de aptâmeros de comutador em comparação com aptâmeros monoméricos em camundongos são avaliadas. Os aptâmeros multiméricos são preparados como comutadores que ativarão a atividade da terapêutica baseada em células T CAR. Camundongos adultos com tumores são primeiro injetados com células T transduzidas com CAR PNE e o aptâmero multimérico feito de um aptâmero anti-CAR PNE fundido com PSMA, ou HER2, ou alvos associados a tumor CD19 ou CD20 ou CD22, é infundido. A eficácia é avaliada medindo o tamanho do tumor, o crescimento e a taxa do tumor e a sobrevivência nos grupos tratados versus controles. A toxicidade é avaliada pela incidência de reações adversas em grupos tratados versus controles.

[00100]Como usado nesse documento, “consistindo essencialmente em” permite a inclusão de materiais ou etapas que não afetam materialmente as características básicas e novas da reivindicação. Qualquer recitação nesse documento do termo “compreendendo”, particularmente em uma descrição de componentes de uma composição ou em uma descrição de elementos de um dispositivo, pode ser trocada por “consistindo essencialmente em” ou “consistindo em".

[00101]Embora a presente tecnologia tenha sido descrita em conjunto com certas modalidades preferidas, um habilitado comum, após ler a especificação anterior, será capaz de

efetuar várias mudanças, substituições de equivalentes e outras alterações nas composições e nos métodos estabelecidos nesse documento.

Referências

[00102]Dassie JP, et al., *Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors.* Nat. Biotechnol 27, 839 (2009).

[00103]Di Stasi A, et al., *Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy*. N Engl J Med 365, 1673 (2011).

[00104]McNamara JO, et al., *Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras.* Nat. Biotechnol 24, 1005 (2006).

[00105]Rodgers DT, et al., *Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies*, PNAS 113, E459 (2016).

[00106]Straathof KC, et al., *An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy.* Blood 105,4247 (2005).

[00107]Tamada K, et al., *Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies*. Clin Cancer Res 18, 6436 (2012).

[00108]Urbanska K, et al., *A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor*. Cancer Res 72,1844 (2012a).

[00109]Urbanska K, et al., *Development of a novel universal immune receptor for antigen targeting: To infinity and beyond*, OncoImmunology 1, 777 (2012b).

[00110]Wu CY, et al., *Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor*, Science 350, aab4077 (2015).

REIVINDICAÇÕES

1. Ponte aptamérica para ligar um receptor de antígeno quimérico (CAR) a um alvo, a ponte **caracterizada** pelo fato de compreender um ou mais aptâmero(s) de ligação ao CAR e um ou mais aptâmero(s) de ligação ao alvo, em que um ou mais aptâmero(s) de ligação ao CAR é(são) conectado(s) por um ou mais ligante(s) para os aptâmeros de ligação ao alvo, e em que pelo menos um dos um ou mais aptâmero(s) de ligação ao CAR se liga a um domínio extracelular do CAR.

2. Ponte aptamérica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o domínio extracelular de CAR é capaz de se ligar especificamente a um neo-epítopo peptídico (PNE).

3. Ponte aptamérica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que a ligação de um aptâmero de ligação ao CAR da ponte ao CAR expressado em uma célula imune ativa a célula imune.

4. Ponte aptamérica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que a ligação de um aptâmero de ligação ao CAR da ponte ao CAR expressado em uma célula imune não ativa a célula imune.

5. Ponte aptamérica, de acordo com a reivindicação 3 ou 4, **caracterizada** pelo fato de que a célula imune é uma célula T, célula NK ou macrófago, e a referida ligação leva à destruição de uma célula alvo ligada a um aptâmero de ligação ao alvo da ponte aptamérica.

6. Ponte aptamérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de que o ligante compreende ou consiste em uma porção de ligante selecionada do grupo que consiste em uma ligação covalente,

um ácido nucleico de fita simples, um ácido nucleico de fita dupla, um peptídeo, um polipeptídeo, um oligossacarídeo, um polissacarídeo, um polímero sintético, uma hidrazona, um tioéter, um éster, um triazol, uma nanopartícula, uma micela, um lipossoma, uma célula e combinações dos mesmos.

7. Ponte aptamérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de que não contém um peptídeo de imunoglobulina ou fragmento do mesmo.

8. Ponte aptamérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de que não contém um peptídeo ou polipeptídeo.

9. Ponte aptamérica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que a porção ligante compreende um ácido nucleico de fita simples ou de fita dupla selecionado de DNA, RNA e XNA.

10. Ponte aptamérica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que a porção ligante é um polipeptídeo de imunoglobulina ou fragmento do mesmo.

11. Ponte aptamérica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que a porção ligante é um polissacarídeo selecionado do grupo que consiste em glucano, dextrano, glicogênio, amido e derivados dos mesmos.

12. Ponte aptamérica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que a porção ligante é um polímero sintético selecionado de poli(amidoamina) (PAMAM) e poli(beta amino éster) (PBAE).

13. Ponte aptamérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de que o domínio extracelular CAR compreende um polipeptídeo de

imunoglobulina ou fragmento ou derivado do mesmo.

14. Ponte aptamérica, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que o polipeptídeo de imunoglobulina é um Fv de cadeia única.

15. Ponte aptamérica, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que o PNE tem uma sequência de aminoácidos não encontrada no proteoma humano.

16. Ponte aptamérica, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que o PNE é selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 1-7.

17. Ponte aptamérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de que pelo menos um dos aptâmeros de ligação ao alvo liga um alvo selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD22, CD123, BCMA, NY-ESO-1, mesotelina, PSA, PSMA, MART-1, MART-2, Gp100, tirosinase, p53, ras, MUC1, SAP-1, survivina, CEA, Ep-CAM, Her2, EGFRvIII, BRCA1/2, CD70, CD73, e SOD mutado.

18. Ponte aptamérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de que compreende dois ou mais aptâmeros de ligação a CAR idênticos ou não idênticos.

19. Ponte aptamérica, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizada** pelo fato de que compreende dois ou mais aptâmeros de ligação ao alvo idênticos ou não idênticos.

20. Ponte aptamérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma forma molecular selecionada do grupo que consiste em forma de anel, forma de estrela, dendrimérica, linear, ramificada e combinações das mesmas.

21. Ponte aptamérica, de acordo com qualquer uma das

reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de que tem uma distância entre um ou mais dos aptâmeros de ligação ao CAR e um ou mais dos aptâmeros de ligação ao alvo na faixa de cerca de 70 a cerca de 200 angstroms.

22. Ponte aptamérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de que se liga ao referido CAR quando expressada em uma célula T, célula NK, célula B ou um macrófago.

23. Ponte aptamérica, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizada** pelo fato de que ativa a referida célula T, célula NK, célula B ou o macrófago ao ligar o referido CAR.

24. Ponte aptamérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de que um ou mais aptâmero(s) de ligação a CAR e um ou mais aptâmero(s) de ligação ao alvo têm, cada um, uma afinidade de ligação menor que 10 nM, de preferência menor que 1 nM, e mais preferencialmente menor que 100 pM ou menor que 10 pM.

25. Sistema para imunoterapia, **caracterizado** pelo fato de que compreende a ponte aptamérica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações precedentes, e uma célula imune que expressa o referido CAR.

26. Sistema, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que a célula imune é ativada mediante ligação a um aptâmero de ligação a CAR da referida ponte aptamérica.

27. Uso do sistema, conforme definido na reivindicação 25 ou 26, **caracterizado** pelo fato de ser para intensificar uma resposta imunológica a um câncer, um patógeno ou uma célula ou proteína inflamatória.

28. Kit para fornecer imunoterapia a um indivíduo, o kit **caracterizado** pelo fato de que compreende a ponte aptamérica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1-24 e um vetor viral que codifica o referido CAR.

29. Kit, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado** pelo fato de que o vetor viral é um vetor lentiviral.

30. Kit, de acordo com a reivindicação 28 ou 29, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente um aptâmero tendo uma sequência complementar àquela do aptâmero de ligação ao CAR ou uma porção do mesmo.

31. Kit para fornecer imunoterapia a um indivíduo, o kit **caracterizado** pelo fato de que compreende (i) um vetor viral que codifica um CAR para expressão em uma célula imune *in vivo* ou *ex vivo* e (ii) um aptâmero capaz de ligação de alta afinidade ao referido CAR.

32. Kit, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado** pelo fato de que o vetor viral é um vetor lentiviral.

33. Kit, **caracterizado** pelo fato de que compreende a ponte aptamérica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1-24 e um aptâmero de ligação a CAR rotulado e/ou não rotulado que se liga ao mesmo CAR que o aptâmero de ligação a CAR da ponte, mas não se liga ao alvo ligado pela ponte.

34. Kit, **caracterizado** pelo fato de que compreende a ponte aptamérica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1-24 e um aptâmero de ligação ao alvo rotulado e/ou não rotulado que se liga ao mesmo alvo que o aptâmero de ligação ao alvo da ponte, mas não se liga ao CAR ligado pela ponte.

35. Método para realizar imunoterapia em um indivíduo em necessidade do mesmo, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) administrar ao indivíduo uma população de células que expressam um CAR, em que o CAR compreende um domínio extracelular que é capaz de se ligar especificamente a um neo-epítopo peptídico (PNE); e

(b) administrar ao indivíduo a ponte aptamérica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1-24;

em que a ponte aptamérica se liga às células que expressam CAR no indivíduo e induz uma interação entre as células que expressam CAR e o alvo.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de:

(a1) administrar ao indivíduo um aptâmero monoespecífico rotulado que se liga ao referido CAR e determinar uma quantidade de CAR ou células que expressam CAR presentes no indivíduo.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado** pelo fato de que a etapa (b) é realizada apenas se a quantidade de CAR ou células que expressam CAR atingir ou exceder uma quantidade predeterminada estimada necessária para que a referida imunoterapia seja bem-sucedida.

38. Método, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade de CAR ou células que expressam CAR cai abaixo da referida quantidade predeterminada, e a etapa (a1) é repetida após um período de tempo.

39. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 35-38, **caracterizado** pelo fato de que o alvo está em uma célula alvo e a interação resulta na morte da célula alvo.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35-38, **caracterizado** pelo fato de que a interação resulta em uma resposta imunológica intensificada no indivíduo.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35-38, **caracterizado** pelo fato de que a interação resulta em tolerância imunológica no indivíduo.

42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35-38, **caracterizado** pelo fato de que a interação resulta em uma resposta imunológica reduzida ou terminada no indivíduo.

43. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a resposta imunológica intensificada é a um câncer, um patógeno ou uma célula ou proteína inflamatória.

44. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35-38, **caracterizado** pelo fato de que a intensidade ou duração da resposta imunológica é modulada pela dose ou duração da administração da ponte aptamérica na etapa (b).

45. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35-44, **caracterizado** pelo fato de que a intensidade ou duração da resposta imunológica é limitada pela etapa adicional de:

(c) administrar ao indivíduo um aptâmero tendo uma sequência complementar àquela do aptâmero de ligação ao CAR ou uma porção do mesmo.

46. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35-45, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de:

(a0) transduzir uma célula do indivíduo com um vetor viral que expressa o CAR na célula.

47. Método, de acordo com a reivindicação 46, **caracterizado** pelo fato de que a referida transdução é realizada *in vitro* (*ex vivo*).

48. Método, de acordo com a reivindicação 46, **caracterizado** pelo fato de que a referida transdução é realizada no indivíduo (*in vivo*).

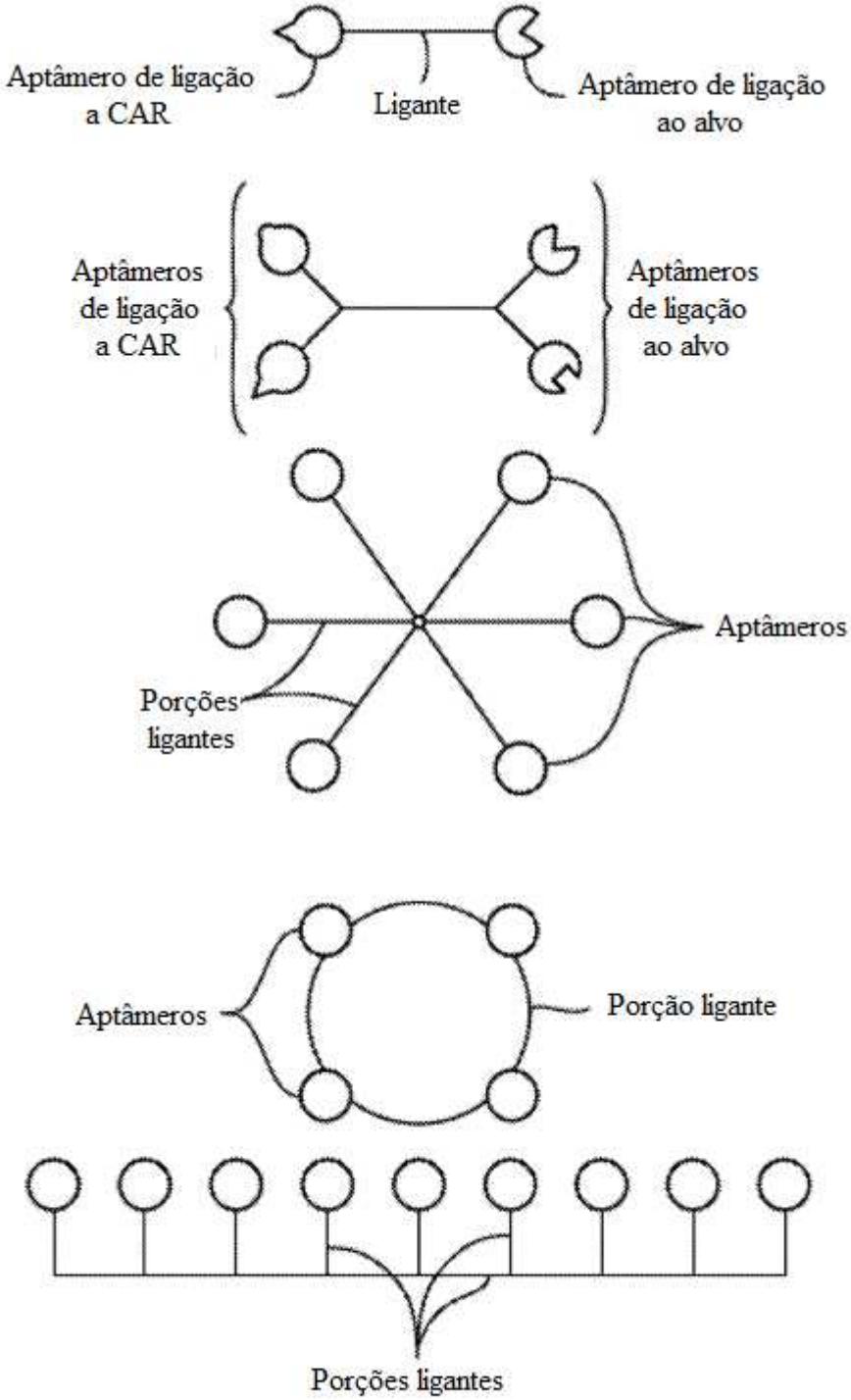

Aptâmero de ligação a CAR
Ligante
Aptâmero de ligação ao alvo
Aptâmeros de ligação a CAR
Aptâmeros de ligação ao alvo
Aptâmeros
Porções ligantes
Aptâmeros
Porção ligante
Porções ligantes

Fig. 1



Fig. 2A

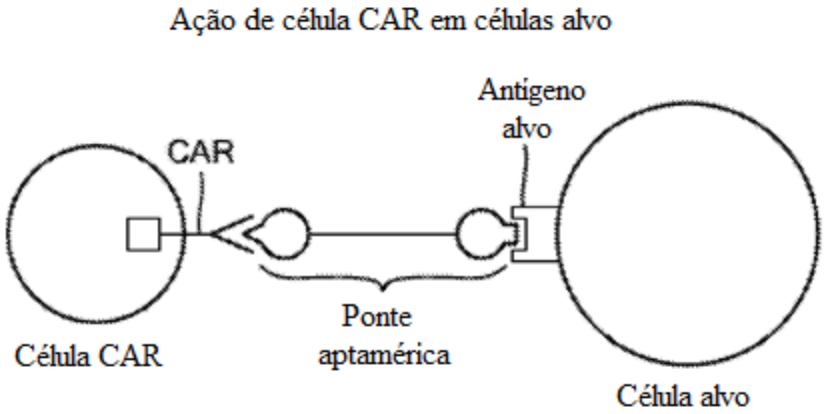


Fig. 2B

Modulação de resposta imunológica

- Adicionar/retirar ponte
- Mudar regime de dosagem
- Ciclo(s) adicionais de expressão de CAR
- Usar aptâmero de diagnóstico de companhia para ajustar a dosagem de ponte

Fig. 2C

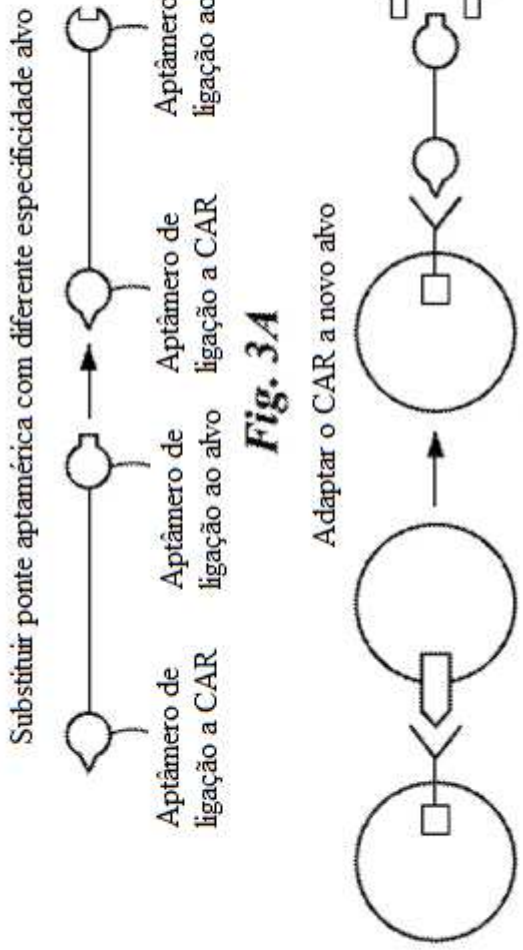


Fig. 3A

Fig. 3B

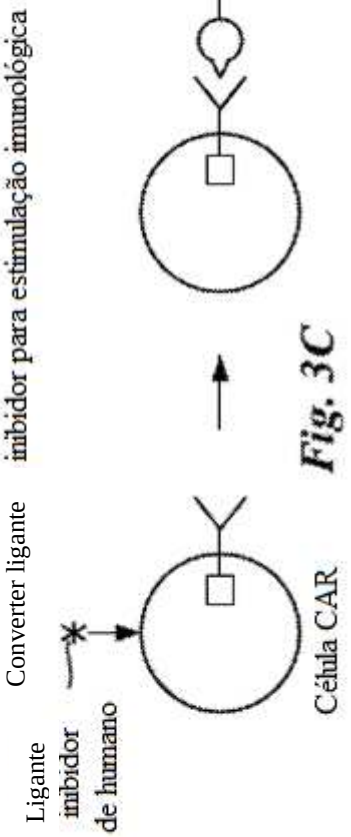


Fig. 3C

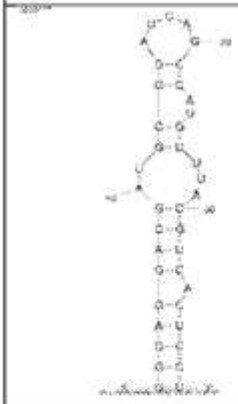
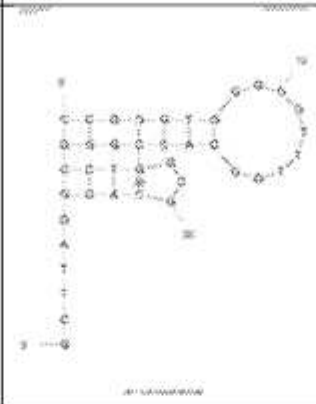
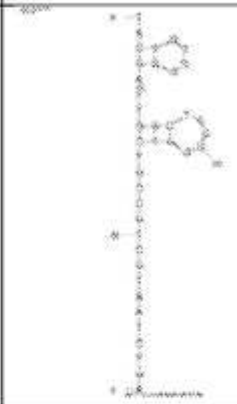
SEQ ID NO:1	GCN4	NYHLENEVARLKKL
SEQ ID NO:2	15-mer SEB	ESQPDPKPDELHKSS
SEQ ID NO:3	HBV pre-S2	PRVRGLYFPAGG
SEQ ID NO:4	BHV1 gpD	MEESKGYEPP
SEQ ID NO:5	OmpD	DRTNNQVKA
SEQ ID NO:6	GLV3	AQEPPRQ
SEQ ID NO:7	SARS-CoV	PTDSTDNNQNGGRNGARPKQRRPQ
SEQ ID NO:8	A10	GGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCU
SEQ ID NO:9	CELTIC_1s	TTTCCGGGTGGGGGTTTGGCACCGGGCCTGGCGCAGGGATTCG
SEQ ID NO:10	CELTIC_19s	TACCGCGGGGATTGGCTCCGGGCCTGGCGTCGTAATCTGA
SEQ ID NO:11	CELTIC_core	GGGTTTGGCATCGGGCCTGGC

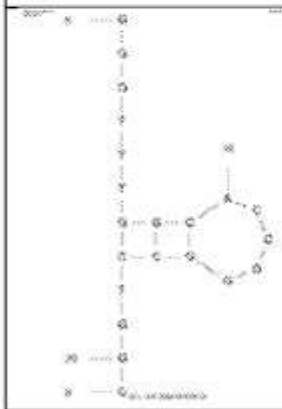
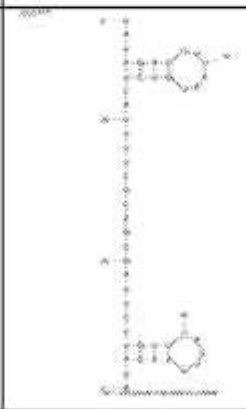
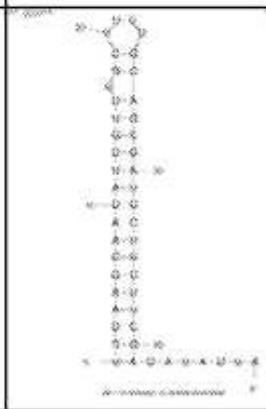
SEQ ID NO:12 ARACD3-3700006
UAUAGACUUUAAUGUCUCAUUUUCGCAGCGAUUCUUGUUUAUUUAACAUA 50

SEQ ID NO:13 ARACD3-
0010209UCUAAGCAAUAUUGUUUGCUUUUGCAGCGAUUCUGUUUCGAUAUAUUA

Sequências de neoantigenos peptídicos e aptâmeros monoméricos

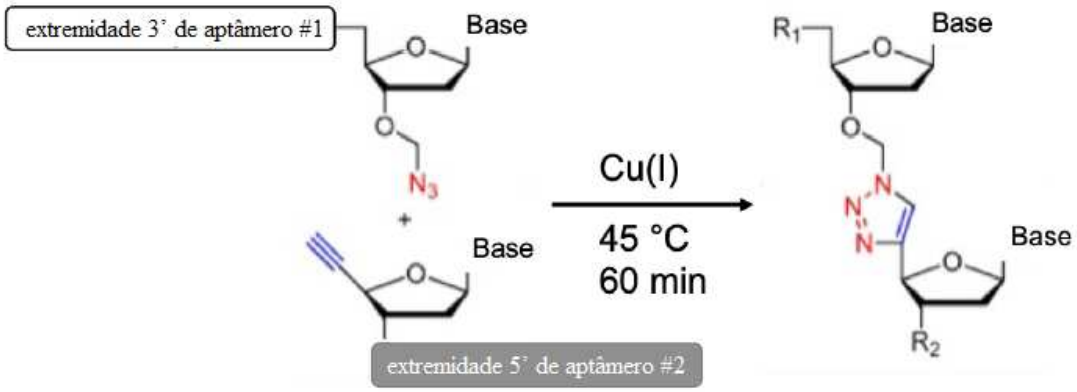
Fig. 4

A10	CD3_CELTIC_1s	CD3_CELTIC_19s
		
ΔG= -12.3 kcal/mol	ΔG= -5.0 kcal/mol	ΔG= -3.13 kcal/mol

CD3_CELTIC_core	ARACD3-3700006	ARACD3-0010209
		
ΔG= -2.81 kcal/mol	ΔG= -3.80 kcal/mol	ΔG= -10.70 kcal/mol

Estrutura secundária prevista de aptâmeros monoméricos

Fig. 5



Química click para aptâmeros ligantes

Fig. 6

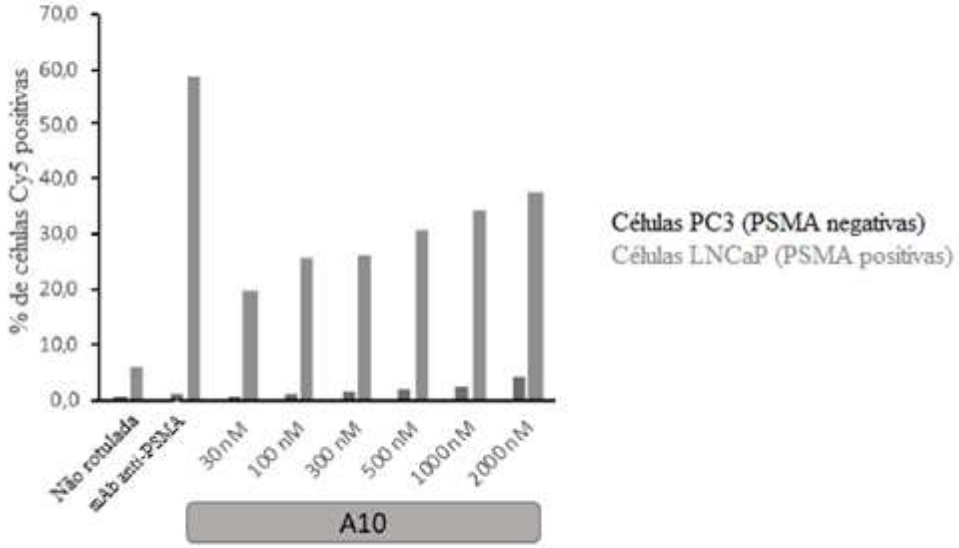


Fig. 7A

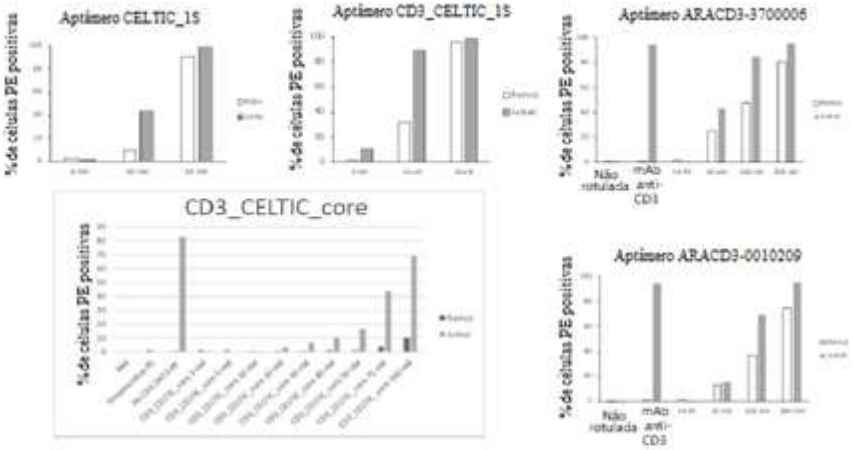
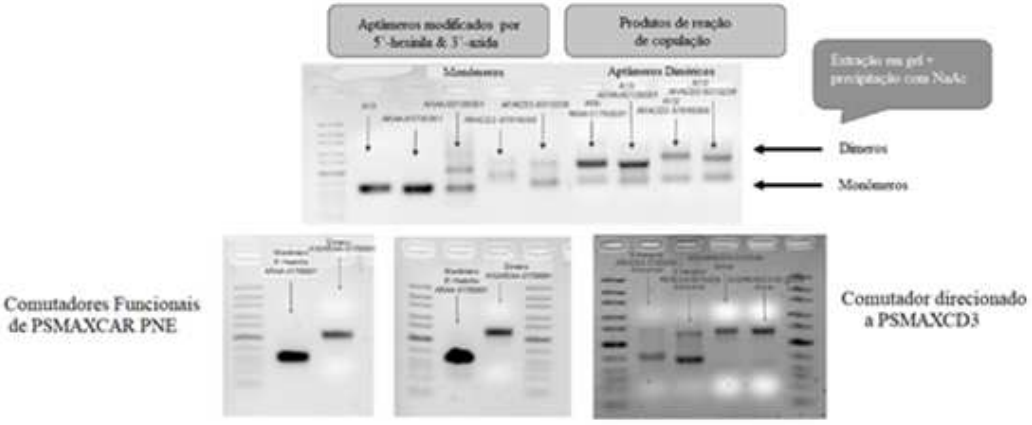


Fig. 7B

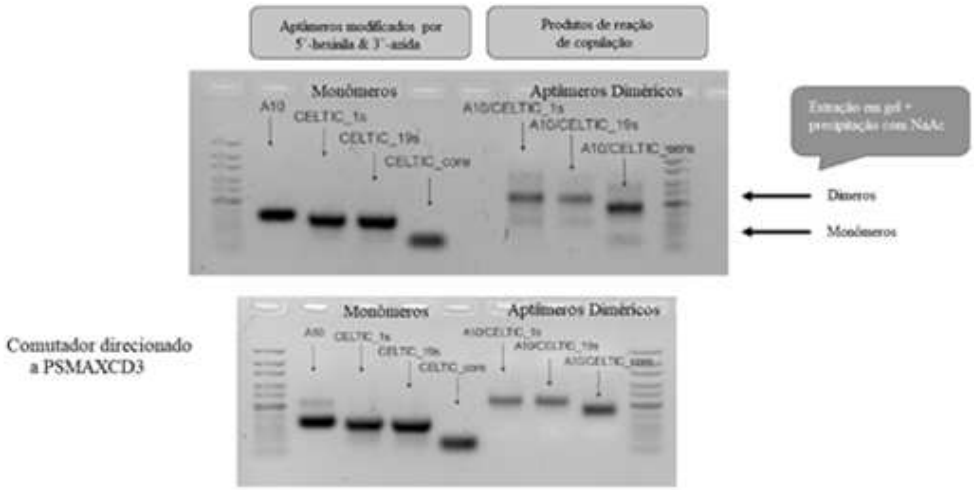
Ligação de aptâmero de RNA anti-PSMA em células PSMA positivas e negativas (Fig. 7A) e ligação de aptâmeros anti-CD3 em células CD3 positivas e negativas (Fig. 7B)

Figs. 7A-7B



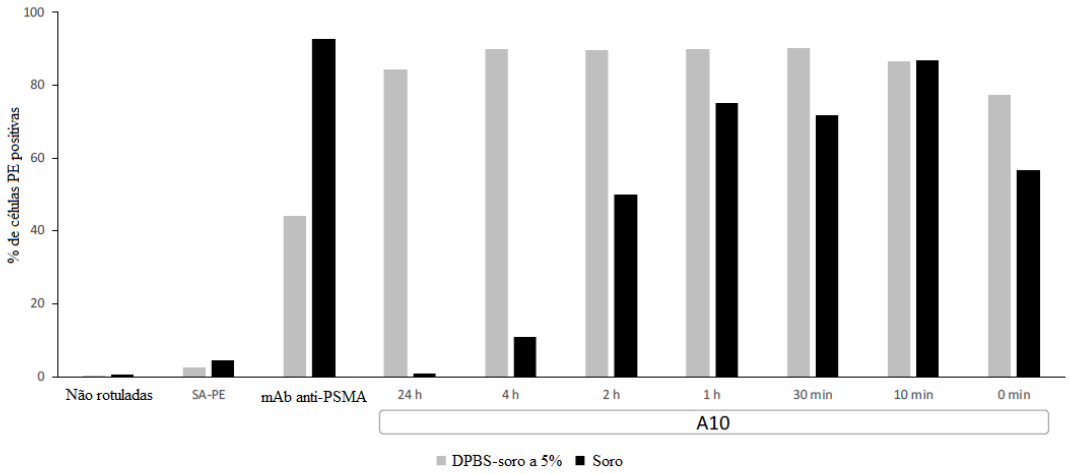
Visualização em um gel de agarose dos monômeros anti-CAR-PNE, anti-PSMA e anti-CD3 e dimeros aptaméricos anti-PSMAxanti-CAR-PNE e anti-PSMAxanti-CD3. Apatâmeros biespecíficos RNA/RNA

Fig. 8A



Visualização em um gel de agarose dos monômeros de RNA anti-PSMA e de DNA anti-CD3 e dimeros aptaméricos de RNA-DNA anti-PSMAxanti-CD3. Apatâmeros biespecíficos DNA/RNA

Fig. 8B



Estabilidade de aptâmero de RNA A10 no soro

Fig. 9

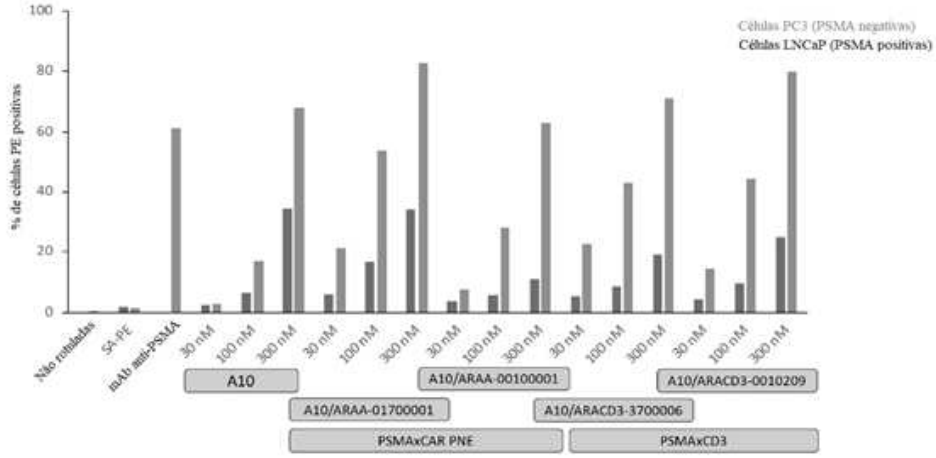


Fig. 10A

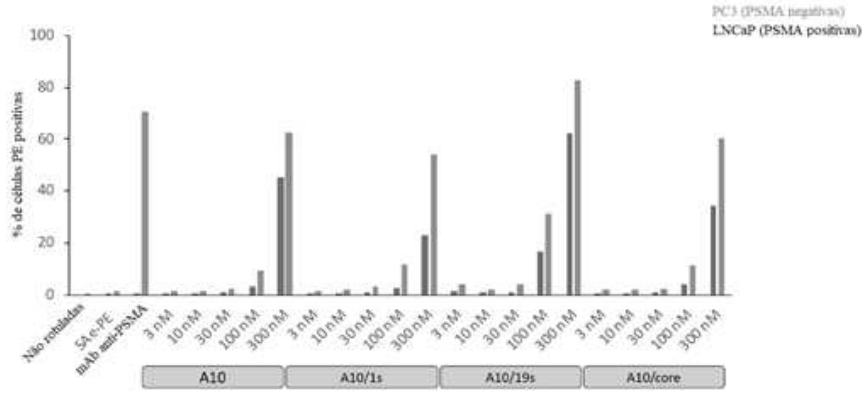


Fig. 10B

Propriedades de ligação de PSMA A10 não são alteradas por dimerização: Ligação em células PSMA positivas é mantida após a dimerização com aptâmeros de RNA (anti-CD3 e anti-CAR PNE, Fig.10A) ou com aptâmeros de DNA (aptâmeros de DNA anti-CD3, Fig.10B)

Figs. 10A-10B

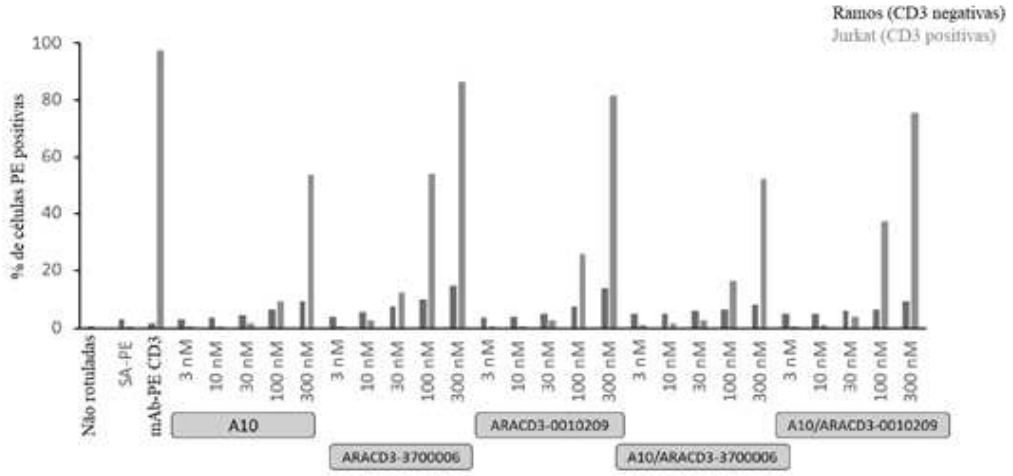


Fig. 11A

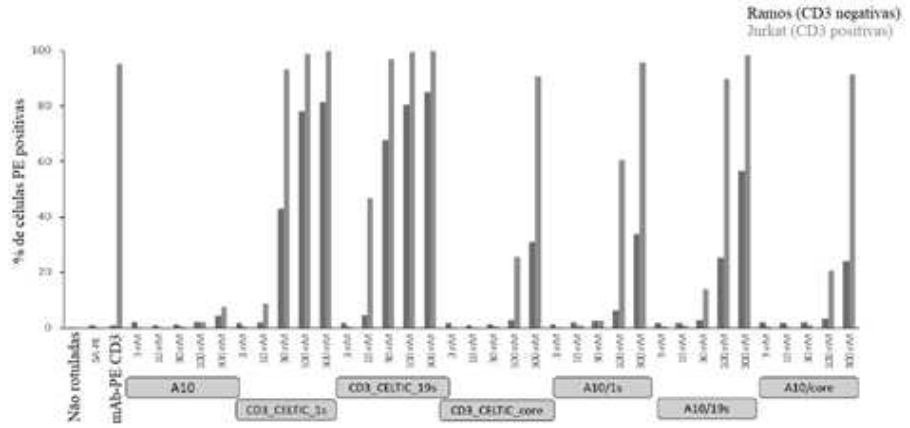


Fig. 11B

Propriedades de ligação de aptâmeros de RNA (Figura 11A) e de DNA (Figura 11B) anti-CD3 não são alteradas por dimerização: Ligação em células CD3 positivas é mantida após a dimerização com aptâmero à base de RNA anti- PSMA

Figs. 11A-11B

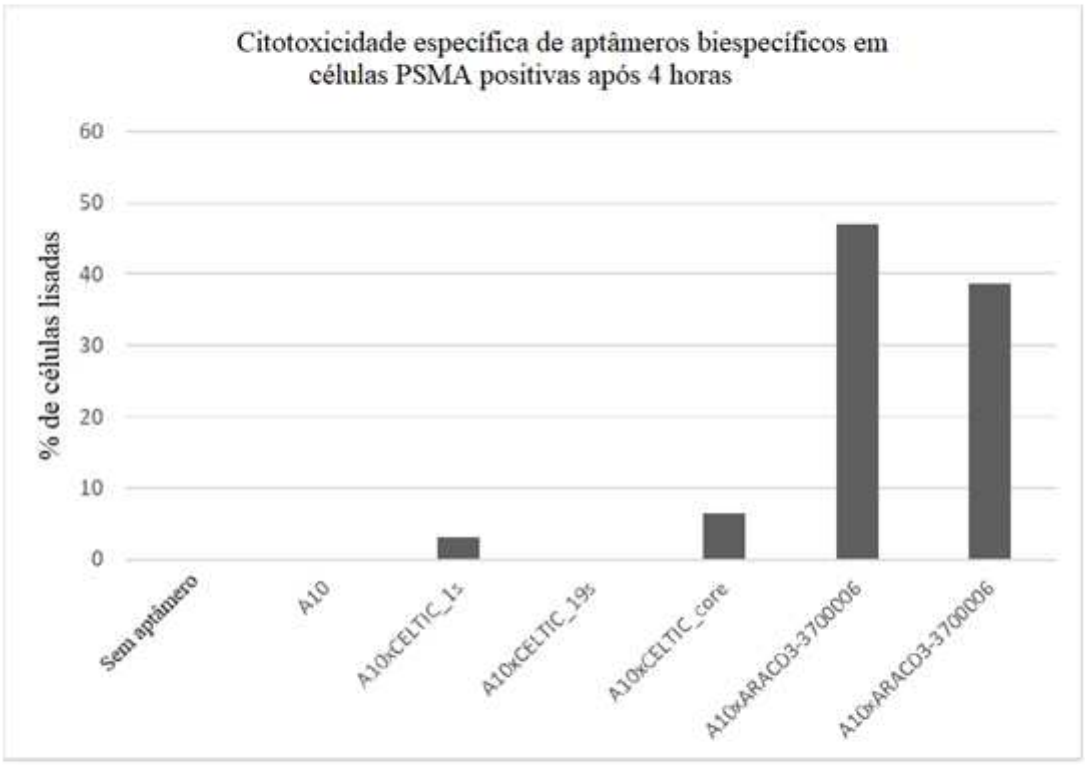
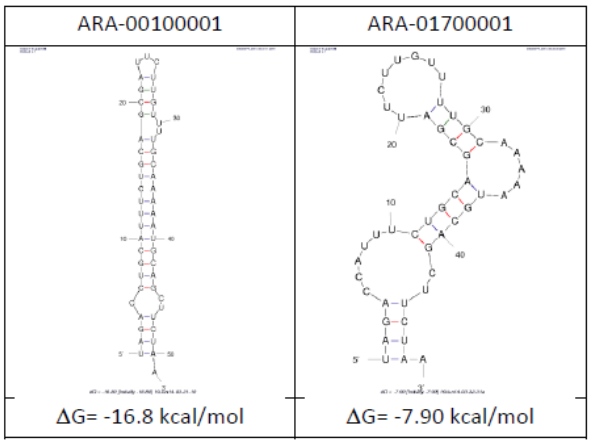

Citotoxicidade específica de aptâmeros biespecíficos em células PSMA positivas após 4 horas
% de células lisadas
60
50
40
30
20
10
0
Sem aptâmero
A10
A10xCELTIC_1s
A10xCELTIC_19s
A10xCELTIC_core
A10xARACD3-3700006
A10xARACD3-3700006

Fig. 12

```
                    1                                                    56
ARAA-00100001   (1) UAGACCUGCAUUUCUGCAGCGAUUCUUGUUUUGCAAAAAUGCAGCUUCUAA-----
ARAA-01300011   (1) UAGACCUGCAUUUCUGCAGCGAUUCU--UUUUGCAAAAAUG-AGCUUCUAA-----
ARAA-01700001   (1) UAGACC---AUUUCUGCAGCGAUUCUUGUUUUGCAAAAAUGCAGCUUCUAA-----
ARAA-00600095   (1) UAGACCUGCAUUUCUGCAGCGAUUCUUGUUUUG-AAAA--GCAG-UUCUAA-----
ARAA-05200001   (1) UAGACCG--CUUUCUGCAGCGAUUCUUGUUUUGCAAAA-UGCAGCUUCUAA-----
                    ******     *****************  ***** ****  * ** ******
```

Alinhamento de aptâmeros de RNA anti-CAR-PNE

Fig. 13A



Estrutura secundária prevista de dois aptâmeros de RNA CAR-PNE

Fig. 13B

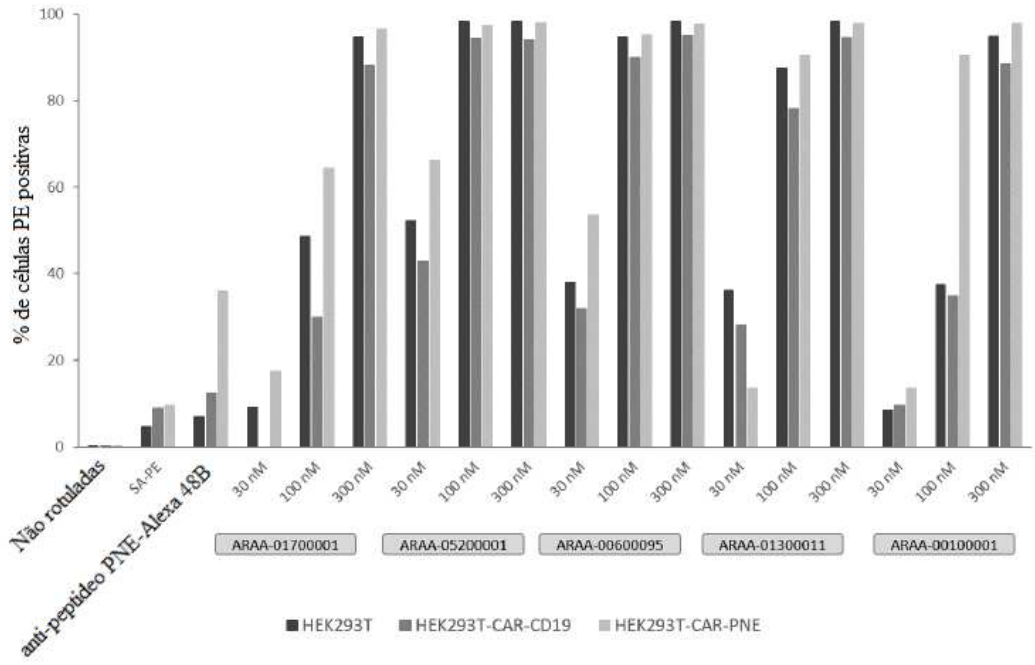


Fig. 14A

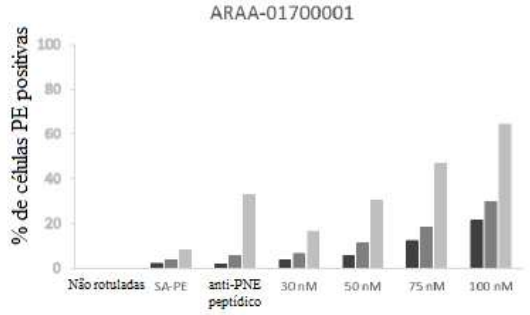


Fig. 14B

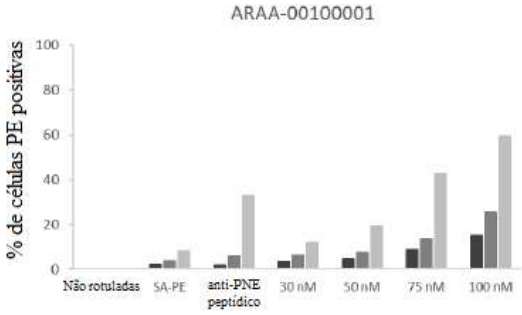
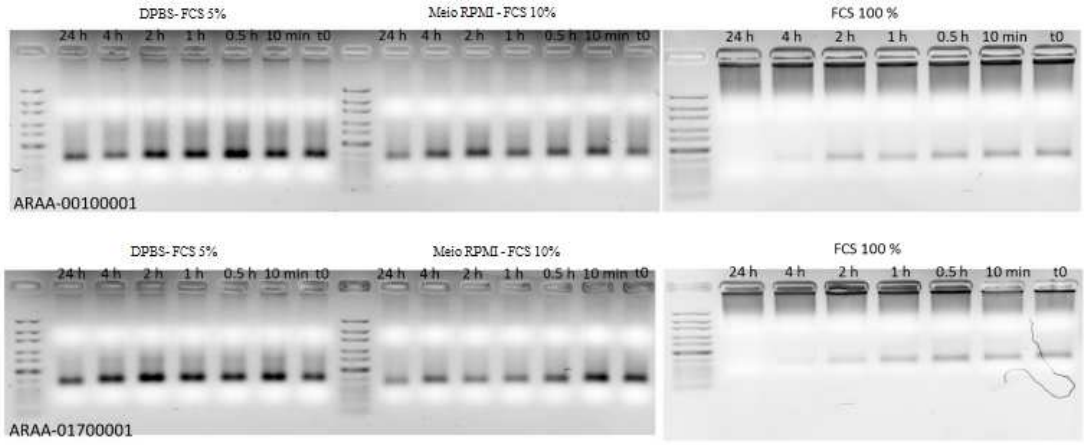


Fig. 14C

HEK293T HEK293T - CAR CD19 HEK293T - CAR PNE

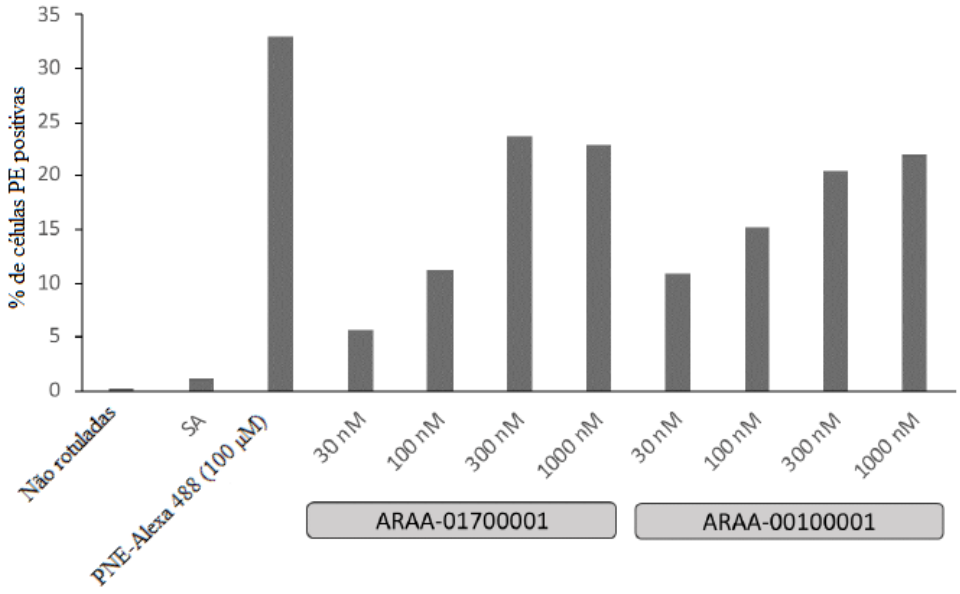
Ligação do aptâmero de RNA anti-CAR PNE em células que não expressam receptor, um CAR CD19 e CAR PNE.

Figs. 14A-14C



Estabilidade de aptâmeros de RNA anti-CAR PNE na presença de várias concentrações de soro

Fig. 15



Ligação de aptâmeros de RNA anti-CAR PNE em PBMC transduzidas com um CAR-PNE

Fig. 16

RESUMO

COMUTADOR DE CÉLULAS T CAR À BASE DE APTÂMEROS

Uma tecnologia de comutação baseada em aptâmero é fornecida que intensifica o controle do uso de imunoterapias relacionadas ao receptor de antígeno quimérico (CAR). O comutador à base de aptâmeros utiliza uma molécula de ponte sintética contendo um aptâmero de ligação ao alvo ligado através de um ligante a um aptâmero de ligação a CAR. Um sistema contendo um CAR e uma ponte aptamérica correspondente fornece uma plataforma de imunoterapia que: (i) pode ser direcionada a qualquer antígeno desejado, escolhendo o aptâmero de ligação ao alvo da ponte, (ii) pode ser redirecionada de um alvo para outro alterando o aptâmero de ligação ao alvo; (iii) pode ser dosada de acordo com as necessidades de mudança de um paciente individual ao longo do tempo, alterando o protocolo de administração para a ponte; (iv) pode ser ativada ou desativada rapidamente ou gradualmente; (v) pode ser usada como um diagnóstico complementar para uma terapia com CAR específica; (vi) pode ser integrada com a expressão do CAR in vivo ou ex vivo; (vii) não é imunogênica; e (viii) tem baixo custo de produção.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 2021_882 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 26/01/2021
- Hora de Geração do Código: 16:48:38
- Código de Controle:
  - Campo 1: 4B359998FF3A7684
  - Campo 2: 8944FEEFB5139018