



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

(21) BR 112019021745-2 A2



(22) Data do Depósito: 18/04/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 05/05/2020

(54) **Título:** CÉLULAS EFETORAS IMUNOLÓGICAS ANTÍGENO-ESPECÍFICAS

(51) **Int. Cl.:** C07K 14/725; A61K 38/17; A61K 35/17; A61K 35/545; C12N 5/0783; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 18/04/2017 US 62/486,875.

(71) **Depositante(es):** FUJIFILM CELLULAR DYNAMICS, INC..

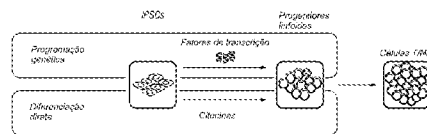
(72) **Inventor(es):** MAKSYM A. VODYANYK; XIN ZHANG; ANDREW J. BRANDL; DEEPIKA RAJESH; BRADLEY SWANSON; CHRISTIE MUNN; SARAH BURTON; WEN BO WANG; ETHAN MCLEOD.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018028133 de 18/04/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/195175 de 25/10/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 16/10/2019

(57) **Resumo:** São aqui fornecidos métodos para a produção de células T e células NK efetoras antígeno-específicas a partir de células-tronco pluripotentes que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR). São ainda aqui fornecidos métodos para a terapia celular adotiva através da administração das células T efetoras e/ou células NK aqui fornecidas.



“CÉLULAS EFETORAS IMUNOLÓGICAS ANTÍGENO-ESPECÍFICAS”

[001]O presente pedido reivindica o benefício prioritário dos pedidos provisórios de nº de série US 62/486.875, depositados em 18 de abril de 2017, cujo conteúdo inteiro é aqui incorporado por referência.

ANTECEDENTES

1.Campo

[002]A presente invenção refere-se geralmente ao campo da biologia molecular. Mais particularmente, refere-se a métodos e composições referentes a células efetoras imunológicas antígeno-específicas, como células T e células NK.

2.Descrição da técnica relacionada

[003]Apesar dos avanços tecnológicos nas opções de diagnóstico e tratamento disponíveis para pacientes diagnosticados com câncer, o prognóstico ainda permanece ruim e muitos pacientes não podem ser curados. A imunoterapia mantém a promessa de oferecer um tratamento potente, mas direcionado, a pacientes diagnosticados com vários tumores com potencial para erradicar as células tumorais malignas sem danificar os tecidos normais. Em teoria, as células T do sistema imunológico são capazes de reconhecer padrões de proteínas específicos para células tumorais e mediar sua destruição através de uma variedade de mecanismos efetores. A terapia de células T adotiva é uma tentativa de aproveitar e ampliar a capacidade de erradicação de tumores das células T de um paciente e, em seguida, devolver esses efetores ao paciente em um estado que elimine efetivamente o tumor residual, porém, sem danificar o tecido saudável. Embora essa abordagem não seja nova no campo da imunologia tumoral, muitas desvantagens no uso clínico da terapia adotiva de células T prejudicam o uso completo dessa abordagem em tratamentos contra o câncer.

[004]As atuais terapias adotadas com células T são limitadas pela falta de células T específicas para pacientes e tumores, incluindo sua raridade no organismo, sua falha em superar vários mecanismos de evasão do sistema imunológico do tumor e sua curta vida útil. É difícil isolar e expandir o número tipicamente baixo de células T reativas a um antígeno desejado. Portanto, há uma necessidade não atendida de células imunológicas antígeno-específicas, terapeuticamente suficientes e funcionais, para uso eficaz em imunoterapia.

SUMÁRIO

[005]Em uma primeira modalidade, a presente revelação fornece um método de produção de células T e/ou células NK efetoras antígeno-específicas compreendendo células-tronco pluripotentes de engenharia (PSCs) para expressar um receptor de antígeno quimérico (CAR), produzindo CAR-PSCs; diferenciar ou reprogramar a reprogramação dos PS-CAR para células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺ (HPCs); diferenciando ainda mais as CD34⁺ HPCs para células T e/ou células NK; e expandir as células T e/ou células NK. Em alguns aspectos, a expansão compreende a cocultura com células-alvo antígeno-específicas, produzindo assim células T e/ou células NK efetoras antígeno-específicas.

[006]Em certos aspectos, as PSCs projetadas para expressar um CAR são células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) ou células-tronco embrionárias (ESCs). Em aspectos particulares, as iPSCs são reprogramadas a partir de células somáticas, como as células T.

[007]Em alguns aspectos, a etapa de diferenciação de PSCs de CAR para CD34⁺ HPCs compreende a realização de diferenciação direta. Em certos aspectos, a diferenciação direta compreende a geração de corpos embrionários (EBs) na presença de blebistatina, um inibidor da GSK-3, FGF2 e VEGF; colocar em contato os EBs com BMP4,

VEGF e FGF2 para induzir a indução de mesoderme; e diferenciar os EBs na presença do ligante Flt-3, IL-3, SCF e TPO, produzindo HPCs. Em alguns aspectos, a diferenciação está no meio essencialmente livre ou livre de BMP4. Em outros aspectos, a diferenciação está na presença de BMP4. Em aspectos particulares, o inibidor da GSK-3 é CHIR99021. Em alguns aspectos, a diferenciação compreende ainda a presença de IL-11, cAMP e/ou VEGF.

[008]Em alguns aspectos, a diferenciação direta compreende o cultivo de PSCs individualizadas em uma superfície revestida com amina na presença de blebistatina, BMP4, VEGF e bFGF; iniciar diferenciação entrando em contato com as PSCs com BMP4, VEGF e FGF2; e diferenciando ainda mais as PSCs na presença do ligante Flt-3, IL-3, IL-6, SCF, TPO e heparina, produzindo assim HPCs, em que o método não compreende a formação de EBs.

[009]Em aspectos particulares, o método compreende cultivar as células sob condições definidas, sem alimentador, como para a duração de todo o método. Em alguns aspectos, as PSCs são essencialmente livres de transgene ou livres de transgene. Em aspectos particulares, as PSCs são humanas. Em certos aspectos, as células T são células T CD4⁺, células T CD8⁺, células T citotóxicas, células T reguladoras, células T natural killer, células T ingênuas, células T de memória e/ou células T gama delta.

[010]Em certos aspectos, as PSCs projetadas para expressar um CAR também são projetadas para expressar ERG/ETV2, GATA2 e HOXA9, como sob o controle de um único promotor indutível. Em alguns aspectos, o método compreende ainda manipular as PSCs para expressar HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1 e/ou HOXA4. Assim, em alguns aspectos, a etapa de diferenciar CAR-PSCs para CD34⁺ HPCs compreende induzir a expressão de ERG/ETV2, GATA2 e HOXA9 por um período de

tempo suficiente para produzir HPCs e encerrar a indução de expressão antes de diferenciar ainda mais as HPCs para células T e/ou células NK.

[011]Em aspectos específicos, a etapa de diferenciação de CAR-PSCs para CD34⁺ HPCs compreende ainda a seleção de células que expressam CD34 e/ou CD43 antes da diferenciação para células T e/ou células NK antígeno-específicas. Em aspectos particulares, a seleção compreende realizar a classificação de células ativadas magneticamente (MACS). Em alguns aspectos, as células que expressam CD34 e/ou CD43 compreendem pelo menos 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ou porcentagem maior da população total de células. Em alguns aspectos, a etapa de execução de MACs para selecionar células positivas para CD34 e/ou CD43 não é executada.

[012]Em aspectos particulares, pelo menos 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 ou mais por cento dos HPCs expressam o CAR. Em alguns aspectos, pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou mais por cento dos HPCs expressam o CAR.

[013]Em alguns aspectos, a diferenciação de HPCs para células T e/ou células NK compreende a cultura de HPCs em uma superfície revestida com retronectina e Notch DLL-4 na presença de ácido ascórbico e nicotinamida sob condições hipóxicas. Em alguns aspectos, a cultura compreende ainda SCF, ligando FLT-3, TPO e IL-7, e opcionalmente compreende um inibidor de GSK (por exemplo, CHIR99021), IL-2 e/ou IL-12. Em certos aspectos, a etapa de expansão compreende ainda a cultura das células T antígeno-específicas na presença de anticorpo anti-CD3 e IL-2. Em aspectos adicionais, a etapa de expansão compreende ainda a cultura das células T antígeno-específicas na presença de anticorpo anti-CD3, IL-2, IL-15 e IL-21. Em alguns aspectos, a etapa de expansão compreende a cultura das células T antígeno-específicas na presença de anticorpo anti-CD3, ligante FLT3, IL-7, IL-2 e/ou IL-15 e, opcionalmente, compreende

ainda SCF, TPO e/ou IL-21. Em aspectos particulares, pelo menos 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ou porcentagem maior das CD34⁺ HPC diferenciadas são células T CD3⁺ CAR⁺. Em alguns aspectos, pelo menos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, ou porcentagem maior das CD34⁺ HPC diferenciadas são células CD3⁻ CAR⁺ NK. Em alguns aspectos, pelo menos 2% das CD34⁺ HPCs expandidas são células T CD3⁺ CAR⁺. Em aspectos particulares, pelo menos 10% das CD34⁺ HPCs expandidas são células CD3⁻ CAR⁺ NK.

[014]Em certos aspectos, o CAR e as células-alvo antígeno-específicas são direcionadas para o mesmo antígeno. Em um aspecto específico, o antígeno é CD19. Em aspectos particulares, as células-alvo antígeno-específicas são células tumorais. Em alguns aspectos, as células-alvo antígeno-específicas são humanas. Em aspectos particulares, as células-alvo antígeno-específicas são negativas para o HLA classe I. Em alguns aspectos, pelo menos 5, como 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 ou porcentagem superior das células T efectoras antígeno-específicas exibem atividade citotóxica contra células-alvo. Em certos aspectos, pelo menos 10, como 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ou porcentagem superior das células NK efectoras antígeno-específicas exibem atividade citotóxica contra as células-alvo.

[015]Em alguns aspectos, o CAR é codificado pelo DNA integrado ao genoma das PSCs. Em certos aspectos, o CAR compreende um domínio de sinalização intracelular, um domínio transmembranar e um domínio extracelular compreendendo uma região de ligação ao antígeno. Em aspectos específicos, os domínios de sinalização intracelular compreendem CD3 ζ e CD28. Em alguns aspectos, a região de ligação ao antígeno é um F(ab')₂, Fab', Fab, Fv ou scFv.

[016]Em certos aspectos, as PSCs são HLA homozigoto. Em alguns aspectos, as PSCs de HLA homozigoto são homozigotas para um ou mais alelos dos locos HLA-A,

HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ. Em certos aspectos, as PSCs de HLA homozigoto são homozigotas para dois dos alelos dos loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ. Em aspectos particulares, as PSCs de HLA homozigoto são homozigotas para o HLA-A e o HLA-B. Em certos aspectos, as PSCs de HLA homozigoto são homozigotas para o HLA-A, HLA-B e HLA-C.

[017] Outra modalidade fornece um método de produção de células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas compreendendo manipular PSCs para expressar um CAR, produzindo CAR-PSCs; cultivar os CAR-PSCs na presença de blebistatina, um inibidor da GSK-3, FGF2 e VEGF, gerando assim EBs; colocar em contato os EBs com BMP4, VEGF e FGF2 para induzir a indução de mesoderme; diferenciar os EBs na presença de ligante Flt-3, BMP4, IL-3, SCF e TPO, produzindo assim CDC⁺ HPCs; diferenciar adicionalmente as CDC⁺ HPCs para células T e/ou células NK; e expandir as células T e/ou células NK, em que a expansão compreende cocultura com células-alvo antígeno-específicas, produzindo assim células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas. Em aspectos particulares, o inibidor da GSK-3 é CHIR99021.

[018] Em ainda outra modalidade, é fornecido um método de produção de células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas compreendendo manipular PSCs para expressar um CAR, produzindo CAR-PSCs; cultivar CAR-PSCs individualizadas em uma superfície revestida com amina na presença de blebistatina, BMP4, VEGF e iniciar diferenciação colocando em contato as CAR-PSCs com BMP4, VEGF e FGF2; diferenciar adicionalmente os CAR-PSCs na presença do ligante Flt-3, IL-3, IL-6, SCF, TPO e heparina, produzindo assim CDC⁺ HPCs; diferenciar as CD34⁺ HPCs para células T e/ou células NK; e expandir as células T e/ou células NK, em que a expansão compreende cocultura com células-alvo antígeno-específicas, produzindo assim células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas, em que o método não compreende a formação de EBs.

[019]Uma modalidade adicional fornece um método de produção de células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas compreendendo manipular PSCs para expressar um CAR, produzindo assim CAR-PSCs; diferenciar os CAR-PSCs das CD34⁺ HPCs; selecionar para HPCs CD34⁺ CD43⁺; diferenciar adicionalmente as CDC⁺ CD43⁺ HPCs para células T e/ou células NK; e expandir as células T e/ou células NK, em que a expansão compreende cocultura com células-alvo antígeno-específicas, produzindo assim células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas.

[020]Em outra modalidade, é fornecida uma população de células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas produzidas de acordo com as modalidades descritas acima. Também é aqui fornecida uma composição farmacêutica compreendendo as células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas produzidas de acordo com as modalidades aqui descritas. É ainda aqui fornecida uma composição compreendendo as células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas produzidas de acordo com as modalidades para o tratamento de câncer em um indivíduo. Também é aqui fornecida a utilização das células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas produzidas de acordo com as modalidades para o tratamento de câncer.

[021]Em ainda outra modalidade, é fornecido um método de tratamento de câncer em um indivíduo que compreende a administração de uma quantidade eficaz de células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas produzidas de acordo com as modalidades aqui descritas para o indivíduo. Em alguns aspectos, o câncer expressa um antígeno tumoral e as células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas são direcionadas para o dito antígeno tumoral. Em aspectos particulares, o indivíduo é humano.

[022]Outros objetivos, características e vantagens da presente invenção serão evidentes a partir da descrição detalhada a seguir. Deve ser entendido, no entanto, que a descrição detalhada e os exemplos específicos, embora indiquem modalidades

preferenciais da invenção, são dados apenas como ilustração, uma vez que várias mudanças e modificações dentro do espírito e escopo da invenção se tornarão aparentes para aqueles versados na técnica a partir desta descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[023]Os desenhos a seguir fazem parte do presente relatório descritivo e são incluídos para demonstrar ainda mais certos aspectos da presente invenção. A invenção pode ser mais bem compreendida por referência a um ou mais desses desenhos em combinação com a descrição detalhada de modalidades específicas aqui apresentadas.

[024]Figuras 1A-1G: (Figura 1A) Esquemas que descrevem métodos para produzir células T e células NK a partir de PSCs, incluindo métodos de programação direta e métodos de diferenciação direta. (Figura 1B) Diagrama representando a diferenciação de células T e NK livres de soro e de alimentador de hPCS. Abreviações: inibidor de CHIR - CHIR99021 GSK-3; HDM, meio de diferenciação hematopoiética sem soro; TCDM, meio de diferenciação de células T; TCEM, meio de expansão de células T; HPC, células progenitoras hematopoiéticas; o asterisco (*) marcado é um componente de aprimoramento opcional. (Figura 1C) Eficiência de CD34⁺ CD43⁺ HPCs de PSCs através de diferenciação direta ou programação direta. (Figura 1D) Análise citométrica de fluxo de culturas de diferenciação de T/NK. (Figura 1E) Rendimento de diferentes populações celulares ao longo da diferenciação. (Figura 1F) Fenótipo de células T derivadas de PSC. (Figura 1G) Expansão de células T derivadas de PSC. Os anticorpos anti-CD3 imobilizados (iCD3) destinam-se à expansão de células T derivadas de PSC (gráfico de barras). As células T que proliferam nas culturas de expansão adquirem uma morfologia característica de linfoblastos de formato irregular (fotografia). CD56 e adquirir expressão CD8 de 2 semanas de expansão de células T (gráficos de pontos de citometria de fluxo).

[025]Figura 2: Expressão de CAR em células T/NK derivadas de PSC. Expressão de CAR ao longo dos estágios de diferenciação avaliados por citometria de fluxo usando coloração com proteína L. As células T CD3⁺ foram cocoradas com mAb CD3 anti-humano de camundongo de cadeia lambda (clone SP34-2). A expressão de CAR por PSCs E11 e HPCs e células T derivadas de E11 é mostrada.

[026]Figuras 3A-B: Citotoxicidade mediada por CAR anti-CD19 *in vitro* em células T/NK derivadas de PSC. (Figura 3A) Ensaio de citotoxicidade *in vitro* utilizando células-alvo CD19⁺ Daudi e Raji que expressam luciferase. (Figura 3B) Potencial citolítico de células CAR-T por contagem de células-alvo em tempo real usando o sistema de análise de células vivas Incucyte S3 (Essen Bioscience).

[027]Figura 4: Produção de citocina induzida por CAR anti-CD19 *in vitro* em células T/NK derivadas de PSC.

[028]Figuras 5A-5B: Potencial oncolítico *in vivo* de células CAR-T/NK derivadas de PSC. (Figura 5A) Progressão do tumor em camundongos monitorados por imagem bioluminescente *in vivo*. (Figura 5B) Curvas de sobrevivência em diferentes grupos de camundongos tratados com células T (1C) ou NK (A16) derivadas de PSC.

DESCRIÇÃO DE MODALIDADES ILUSTRATIVAS

[029]Em certas modalidades, a presente revelação fornece métodos altamente eficientes para gerar células efetoras imunológicas antígeno-específicas a partir de células-tronco pluripotentes humanas (PSCs) que foram manipuladas para expressar um receptor de antígeno, como um receptor de antígeno quimérico (CAR), referido neste documento como CAR-PSCs. As células efetoras imunológicas produzidas pelos métodos atuais podem incluir, mas não estão limitadas a células T, células NK e células iNKT.

[030]As PSCs podem ser obtidas reprogramando (por exemplo, por métodos retrovirais ou epissomais) uma população inicial de células T para produzir iPSCs

derivadas de células T (TiPSCs). As células T podem ser isoladas de várias fontes, como uma amostra de sangue. A população inicial de células T pode reter seus rearranjos característicos de receptores de células T (TCR) e pode ser células HLA homozigotas (isto é, homozigotas para os genes MHC de classe I e II). Por conseguinte, as iPSCs podem ser produzidas a partir de células isoladas de indivíduos HLA homozigotos, aqui referidos como super doadores de HLA.

[031]Os CAR-PSCs podem então ser diferenciados ou programados para produzir células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺ (HPCs). Isso pode ser alcançado através da diferenciação direta usando uma combinação de citocinas (por exemplo, SCF, TPO, FLT-3, IL-6, IL-3 e heparina) (por exemplo, descritas em PCT/US2016/057899, incorporadas aqui por referência em sua totalidade). Em um método alternativo, as CAR-PSCs podem ser diferenciadas para CD34⁺ HPC utilizando a programação antecipada com um construto de expressão que codifica ETV2/ERG, GATA2 e HOXA9 (isto é, EGH) (por exemplo, descrito no documento PCT/US2016/057.893, aqui incorporado por referência na sua totalidade). Esses EGH-PSCs podem ser manipulados adicionalmente para expressar HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1 e/ou HOXA4 para qualidade de enxerto a longo prazo.

[032]Finalmente, os CD34⁺ CAR-HPCs podem ser diferenciados para células CD3⁺ T ou CD56⁺ CD3-NK. Um período ideal durante a diferenciação de HPC (por exemplo, dias 7 a 11) para o potencial linfóide pode ser os dias 7 a 11, identificados pela expressão de CD34 e CD43. Por exemplo, as HPCs com potencial linfóide aumentado podem ser isoladas classificando frações de células positivas para dois ou mais dos marcadores CD144, CD34, CD45 e CD7.

[033]Um método exemplificador para diferenciação de células T compreende o uso de RetroNectin e DLL-4 como matriz livre de alimentador. A diferenciação de células

T pode ser ainda mais aprimorada pelo uso de ácido ascórbico para aumentar a eficiência e maturação, bem como pela cultura sob condições hipóxicas.

[034]Além disso, as células T e/ou células NK podem ser expandidas através da cocultura com células-alvo antígeno-específicas (por exemplo, células tumorais) durante o processo de diferenciação. Verificou-se que este método aumenta a atividade citotóxica das células T e células NK contra células-alvo, observada especificamente por uma diminuição no crescimento tumoral e aumento na sobrevivência de camundongos injetados com células tumorais.

[035]Assim, os métodos da presente revelação podem fornecer um número ilimitado de células efetoras imunológicas antígeno-específicas, como células T e células NK, para uma ampla gama de aplicações como transplante estável *in vivo*, triagem de compostos *in vitro* e elucidação dos mecanismos de doenças e lesões hematológicas.

I. Definições

[036]Como usado aqui, "essencialmente livre", em termos de um componente especificado, é usado aqui para significar que nenhum componente especificado foi propositadamente formulado em uma composição e/ou está presente apenas como contaminante ou em pequenas quantidades. A quantidade total do componente especificado resultante de qualquer contaminação não intencional de uma composição é, portanto, bem abaixo de 0,05%, preferencialmente abaixo de 0,01%. O mais preferencial é uma composição na qual nenhuma quantidade do componente especificado pode ser detectada com métodos analíticos padrão.

[037]Conforme usado neste relatório descritivo, "um" ou "uma" pode significar um ou mais. Conforme usado neste documento nas reivindicações, quando usado em conjunto com a palavra "compreendendo", as palavras "um" ou "uma" podem significar um ou mais de um.

[038]O uso do termo "ou" nas reivindicações é usado para significar "e/ou", a menos que explicitamente indicado para se referir apenas a alternativas ou as alternativas sejam mutuamente exclusivas, embora a revelação apoie uma definição que se refira apenas a alternativas e "e/ou." Como usado aqui, "outro" pode significar pelo menos um segundo ou mais.

[039]Em todo este pedido, o termo "cerca de" é usado para indicar que um valor inclui a variação inerente do erro para o dispositivo, sendo que o método é empregado para determinar o valor ou a variação existente entre os sujeitos do estudo.

[040]O termo "exógeno", quando usado em relação a uma proteína, gene, ácido nucleico ou polinucleotídeo em uma célula ou organismo refere-se a uma proteína, gene, ácido nucleico ou polinucleotídeo que foi introduzido na célula ou organismo por meios artificiais ou naturais; ou em relação a uma célula, o termo refere-se a uma célula que foi isolada e subsequentemente introduzida em outras células ou em um organismo por meios artificiais ou naturais. Um ácido nucleico exógeno pode ser de um organismo ou célula diferente, ou pode ser uma ou mais cópias adicionais de um ácido nucleico que ocorre naturalmente dentro do organismo ou célula. Uma célula exógena pode ser de um organismo diferente ou pode ser do mesmo organismo. A título de exemplo não limitativo, um ácido nucleico exógeno é aquele que está em um local cromossômico diferente de onde estaria nas células naturais ou é flanqueado por uma sequência de ácidos nucleicos diferente daquela encontrada na natureza.

[041]Por "construto de expressão" ou "cassete de expressão" entende-se uma molécula de ácido nucleico que é capaz de direcionar a transcrição. Um construto de expressão inclui, no mínimo, um ou mais elementos de controle transcricionais (como promotores, intensificadores ou uma estrutura funcionalmente equivalente) que direcionam a expressão gênica em um ou mais tipos de células, tecidos ou órgãos

desejados. Elementos adicionais, como um sinal de terminação de transcrição, também podem ser incluídos.

[042]Um "vetor" ou "construto" (às vezes referido como um sistema de entrega de genes ou "veículo" de transferência de genes) refere-se a uma macromolécula ou complexo de moléculas compreendendo um polinucleotídeo a ser entregue a uma célula hospedeira, *in vitro* ou *in vivo*.

[043]Um "plasmídeo", um tipo comum de vetor, é uma molécula de DNA extracromossômica separada do DNA cromossômico que é capaz de se replicar independentemente do DNA cromossômico. Em certos casos, é circular e de fita dupla.

[044]Uma "origem de replicação" ("ori") ou "origem de replicação" é uma sequência de DNA, por exemplo, em um vírus herpes linfotrófico, que quando presente em um plasmídeo em uma célula é capaz de manter sequências vinculadas no plasmídeo e/ou um local próximo ou onde inicia a síntese de DNA. Como exemplo, uma ori para EBV (vírus Epstein-Barr) inclui sequências FR (20 cópias imperfeitas de uma repetição de 30 pb) e, de preferência, sequências DS; no entanto, outros locais no EBV se ligam ao EBNA-1, por exemplo, sequências Rep⁺ podem substituir o DS como uma origem de replicação (Kirshmaier e Sugden, 1998). Assim, uma origem de replicação do EBV inclui sequências FR, DS ou Rep⁺ ou quaisquer sequências funcionalmente equivalentes através de modificações de ácidos nucleicos ou combinação sintética delas derivada. Por exemplo, a presente revelação também pode usar a origem de replicação geneticamente modificada do EBV, como por inserção ou mutação de elementos individuais, conforme descrito especificamente em Lindner *et al.* 2008.

[045]Um "gene", "polinucleotídeo", "região de codificação", "sequência", "segmento", "fragmento" ou "transgene" que "codifica" uma proteína específica, é uma molécula de ácido nucleico que é transcrita e opcionalmente também traduzida em um

produto genético, por exemplo, um polipeptídeo, *in vitro* ou *in vivo* quando colocado sob o controle de sequências reguladoras apropriadas. A região de codificação pode estar presente na forma de cDNA, DNA genômico ou RNA. Quando presente na forma de DNA, a molécula de ácido nucleico pode ser de fita simples (ou seja, a fita de sentido) ou de fita dupla. Os limites de uma região de codificação são determinados por um códon de partida no terminal 5' (amino) e um códon de parada de tradução no terminal 3' (carbóxi). Um gene pode incluir, mas não está limitado a, cDNA de mRNA procariótico ou eucariótico, sequências de DNA genômico de DNA procariótico ou eucariótico e sequências de DNA sintéticas. Uma sequência de terminação da transcrição estará normalmente localizada em 3' para a sequência do gene.

[046]O termo "elementos de controle" refere-se coletivamente a regiões promotoras, sinais de poliadenilação, sequências de terminação de transcrição, domínios reguladores a montante, origens de replicação, locais internos de entrada de ribossomo (IRES), intensificadores, junções de emenda e similares, que fornecem coletivamente a replicação, transcrição, processamento pós-transcricional e tradução de uma sequência de codificação em uma célula receptora. Nem todos esses elementos de controle precisam estar presentes desde que a sequência de codificação selecionada seja capaz de ser replicada, transcrita e traduzida em uma célula hospedeira apropriada.

[047]O termo "promotor" é usado aqui no seu sentido comum para se referir a uma região nucleotídica compreendendo uma sequência reguladora de DNA, em que a sequência reguladora é derivada de um gene que é capaz de se ligar a RNA polimerase e iniciar a transcrição de uma jusante (direção 3') sequência de codificação. Pode conter elementos genéticos nos quais proteínas e moléculas reguladoras podem se ligar, como RNA polimerase e outros fatores de transcrição, para iniciar a transcrição específica de uma sequência de ácidos nucleicos. As frases "posicionado operacionalmente",

"operacionalmente ligado", "sob controle" e "sob controle transcricional" significam que um promotor está em um local funcional correto e/ou orientação em relação a uma sequência de ácidos nucleicos para controlar a iniciação transcricional e/ou expressão dessa sequência.

[048]Por "intensificador" entende-se uma sequência de ácidos nucleicos que, quando posicionada próxima a um promotor, confere atividade de transcrição aumentada em relação à atividade de transcrição resultante do promotor na ausência do domínio intensificador.

[049]Por "ligado operacionalmente" ou coexpresso "com referência a moléculas de ácido nucleico significa que duas ou mais moléculas de ácido nucleico (por exemplo, uma molécula de ácido nucleico a ser transcrita, um promotor e um elemento potenciador) são conectadas de tal maneira para permitir a transcrição da molécula de ácido nucleico. "Operacionalmente ligado" ou "coexpresso" com referência a moléculas de peptídeo e/ou polipeptídeo significa que duas ou mais moléculas de peptídeo e/ou polipeptídeo são conectadas de forma a produzir uma única cadeia polipeptídica, ou seja, um polipeptídeo de fusão, tendo pelo menos uma propriedade de cada componente peptídico e/ou polipeptídico da fusão. O polipeptídeo de fusão é preferencialmente quimérico, isto é, composto de moléculas heterólogas.

[050]"Homologia" refere-se à porcentagem de identidade entre dois polinucleotídeos ou dois polipeptídeos. A correspondência entre uma sequência e outra pode ser determinada por técnicas conhecidas na técnica. Por exemplo, a homologia pode ser determinada por uma comparação direta da informação da sequência entre duas moléculas polipeptídicas, alinhando a informação da sequência e utilizando programas de computador prontamente disponíveis. Alternativamente, a homologia pode ser determinada por hibridação de polinucleotídeos sob condições que promovam a formação

de duplexos estáveis entre regiões homólogas, seguidas de digestão com nuclease (ou nucleases) específica de fita única e determinação do tamanho dos fragmentos digeridos. Duas sequências de DNA ou dois polipeptídeos são "substancialmente homólogas" entre si quando pelo menos cerca de 80%, preferencialmente pelo menos cerca de 90% e mais preferencialmente pelo menos cerca de 95% dos nucleotídeos ou aminoácidos, respectivamente, coincidem sobre um comprimento definido das moléculas, conforme determinado pelos métodos acima.

[051]O termo "célula" é aqui utilizado em seu sentido mais amplo na técnica e refere-se a um corpo vivo que é uma unidade estrutural de tecido de um organismo multicelular, é cercado por uma estrutura de membrana que o isola do lado de fora, tem a capacidade de autorreplicante e possui informações genéticas e um mecanismo para expressá-las. As células aqui utilizadas podem ser células que ocorrem naturalmente ou células modificadas artificialmente (por exemplo, células de fusão, células geneticamente modificadas, etc.).

[052]O termo "célula-tronco" refere-se aqui a uma célula que, em condições adequadas, é capaz de se diferenciar em uma gama diversificada de tipos de células especializadas, enquanto em outras condições adequadas, é capaz de se autorrenovar e permanecer em um estado pluripotente essencialmente não diferenciado. O termo "célula-tronco" também abrange uma célula pluripotente, célula multipotente, célula precursora e célula progenitora. As células-tronco humanas exemplificadoras podem ser obtidas a partir de células-tronco hematopoiéticas ou mesenquimais obtidas a partir de tecido da medula óssea, células-tronco embrionárias obtidas a partir de tecido embrionário ou células germinativas embrionárias obtidas a partir de tecido genital de um feto. As células-tronco pluripotentes exemplificadoras também podem ser produzidas a partir de células somáticas reprogramando-as para um estado pluripotente pela expressão de certos

fatores de transcrição associados à pluripotência; essas células são chamadas de "células-tronco pluripotentes induzidas" ou "células iPS Cs ou iPS".

[053]Uma "célula-tronco embrionária (ES)" é uma célula pluripotente não diferenciada que é obtida de um embrião em um estágio inicial, como a massa celular interna no estágio de blastocisto ou produzida por meios artificiais (por exemplo, transferência nuclear) e pode dar origem a qualquer tipo de célula diferenciada em um embrião ou adulto, incluindo células germinativas (por exemplo, espermatozoides e óvulos).

[054]"Células-tronco pluripotentes induzidas (células iPSCs ou iPS)" são células geradas pela reprogramação de uma célula somática, expressando ou induzindo a expressão de uma combinação de fatores (aqui referidos como fatores de reprogramação). As células iPS podem ser geradas usando células somáticas fetais, pós-natais, recém-nascidas, juvenis ou adultas. Em certas modalidades, os fatores que podem ser usados para reprogramar células somáticas para células-tronco pluripotentes incluem, por exemplo, Oct4 (às vezes referidos como Oct3/4), Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog e Lin28. Em algumas modalidades, as células somáticas são reprogramadas expressando pelo menos dois fatores de reprogramação, pelo menos três fatores de reprogramação, pelo menos quatro fatores de reprogramação, pelo menos cinco fatores de reprogramação, pelo menos seis fatores de reprogramação ou pelo menos sete fatores de reprogramação para reprogramar uma célula somática a uma célula-tronco pluripotente.

[055]"Células progenitoras hematopoiéticas" ou "células precursoras hematopoiéticas" refere-se a células comprometidas com uma linhagem hematopoiética, mas capazes de diferenciação hematopoiética adicional e incluem células-tronco hematopoiéticas, células-tronco hematopoiéticas, células-tronco hematopoiéticas multipotenciais, progenitores mieloides comuns, progenitores mieloides comuns, progenitores megacariócitos, progenitores linfoides. As células-tronco hematopoiéticas

(HSCs) são células-tronco multipotentes que dão origem a todos os tipos de células sanguíneas, incluindo mieloides (monócitos e macrófagos, granulócitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos e mastócitos), eritrócitos, megacariócitos/plaquetas, células dendríticas) e linhagens linfoides (células T, células B, células NK) (ver, por exemplo, Doulatov *et al.*, 2012; Notta *et al.*, 2015). Um “progenitor multilinfoide” (MLP) é definido para descrever qualquer progenitor que dê origem a todas as linhagens linfoides (células B, T e NK), mas que podem ou não ter outros potenciais (mieloides) (Doulatov *et al.*, 2010) e é CD45RA⁺/CD10⁺/CD7⁻. Qualquer progenitor B, T e NK pode ser dito como MLP. Um “progenitor mieloide comum” (CMP) refere-se a um progenitor mieloide comum é definido pela expressão de células CD45⁺/CD31⁺/CD43⁺/CD34⁻ que podem dar origem a granulócitos, monócitos, megacariócitos e eritrócitos. As células progenitoras hematopoiéticas podem expressar CD34. As células progenitoras hematopoiéticas podem coexpressar CD133 e ser negativas para a expressão de CD38. As células precursoras hematopoiéticas incluem células precursoras hematopoiéticas CD34⁺/CD45⁺ e células precursoras hematopoiéticas CD34⁺/CD45⁺/CD43⁺. As células precursoras hematopoiéticas CD34⁺/CD43⁺/CD45⁺ podem ser altamente enriquecidas para progenitores mieloides. As células hematopoiéticas também incluem vários subconjuntos de células hematopoiéticas primitivas, incluindo: CD34⁻/CD133⁺/CD38⁻ (células precursoras hematopoiéticas primitivas), CD43(+)/CD235a(+)/CD41a(+/-) (eritromegacariopoiético), lin(-)/CD34(+)/CD43(+)/CD45(-) (multipotente) e lin(-)/CD34(+)/CD43(+)/CD45(+) (CD) (células mieloides), CD133⁺/ALDH⁺ (aldeído-hidrogenase). Prevê-se que qualquer um desses tipos de células hematopoiéticas primitivas ou células precursoras hematopoiéticas possa ser convertido em células iPS, como aqui descrito. Em alguns aspectos, as células podem incluir mastócitos, células de Langerhan,

osteoclastos, células NK, células T, células T CIK ou outros subtipos de células T, células NK e células B.

[056]Como usado aqui, o termo "célula (ou células) imunológicas" refere-se a células do sistema imunológico, incluindo, mas não se limitando a, células T, células NK, células T/NK, células dendríticas, macrófagos, células B, neutrófilos, eritrócitos, monócitos, basófilos, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos e qualquer combinação dos mesmos.

[057]Um "ativador" de uma célula T ou uma condição que ativará uma célula T refere-se a um estímulo que ativa células T e inclui antígenos, que podem ser apresentados nas células apresentadoras de antígeno ou em outras superfícies; ativadores policlonais, que se ligam a muitos complexos de receptores de células T (TCR), independentemente da especificidade, e incluem lectinas, por exemplo, concanavalina-A (Con-A) e fito-hemaglutinina (PHA) e agentes como anticorpos que se ligam especificamente a epítopos de estrutura invariante nas proteínas TCR ou CD3; e superantígenos, que estimulam um número significativo de células T, e incluem, por exemplo, enterotoxinas, como as enterotoxinas estafilocócicas.

[058]Os termos "linfócito T" e "célula T" são usados de forma intercambiável e se referem a uma célula que expressa um TCR capaz de reconhecer antígeno quando exibido na superfície de células ou matriz apresentadoras de antígeno, juntamente com uma ou mais moléculas de MHC ou, uma ou mais moléculas de MHC não clássicas.

[059]O termo "célula T" refere-se a linfócitos T, conforme definido na técnica, e destina-se a incluir timócitos, linfócitos T imaturos, linfócitos T maduros, linfócitos T em repouso ou linfócitos T ativados. As células T podem ser células T CD4⁺, células T CD8⁺, células T CD4⁺ CD8⁺ ou células CD4⁻ CD8⁻. As células T também podem ser células T auxiliares, como células T auxiliares 1 (TH1) ou T auxiliares 2 (TH2) ou células TH17, bem

como células T citotóxicas, células T reguladoras, células T natural killer, células T ingênuas, células T de memória ou células T gama delta (Wilson *et al.*, 2009; Wynn, 2005; Ladi *et al.*, 2006). As células T que diferem umas das outras por pelo menos um marcador, como CD4, são aqui referidas como "subconjuntos" de células T.

[060]"Células T CD4+" refere-se a um subconjunto de células T que expressam CD4 em sua superfície e estão associadas à resposta imunológica mediada por células. Elas são caracterizadas pelos perfis de secreção após estimulação, que podem incluir secreção de citocinas como IFN-gama, TNF-alfa, IL-2, IL-4 e IL-10. "CD4" são glicoproteínas de 55 kD definidas originalmente como antígenos de diferenciação nos linfócitos T, mas também encontradas em outras células, incluindo monócitos/macrófagos. Os antígenos CD4 são membros da família de supergene de imunoglobulina e estão implicados como elementos de reconhecimento associativo nas respostas imunes restritas à classe II do MHC (principal complexo de histocompatibilidade e complexidade). Nos linfócitos T, elas definem o subconjunto auxiliar/indutor.

[061]"Células T CD8 +" refere-se a um subconjunto de células T que expressam CD8 em sua superfície, são restritas ao MHC classe I e funcionam como células T citotóxicas. As moléculas "CD8" são antígenos de diferenciação encontrados nos tímócitos e nos linfócitos T citotóxicos e supressores. Os antígenos CD8 são membros da família de supergene de imunoglobulina e são elementos de reconhecimento associativo nas principais interações restritas à classe I do complexo de histocompatibilidade.

[062]"Célula-tronco pluripotente" refere-se a uma célula-tronco que tem o potencial de se diferenciar em todas as células que constituem um ou mais tecidos ou órgãos, ou preferencialmente, qualquer uma das três camadas germinativas: endoderme (revestimento interno do estômago, trato gastrointestinal, pulmões), mesoderme (músculo, osso, sangue, urogenital) ou ectoderma (tecidos epidérmicos e sistema nervoso).

[063]Como aqui utilizado, o termo "célula somática" refere-se a qualquer célula que não seja células germinativas, como um óvulo, um espermatozoide ou semelhante, que não transfere diretamente seu DNA para a próxima geração. Normalmente, as células somáticas têm pluripotência limitada ou inexistente. As células somáticas aqui utilizadas podem ser de ocorrência natural ou geneticamente modificadas.

[064]"Programação" é um processo que altera o tipo de progênie que uma célula pode produzir. Por exemplo, uma célula foi programada quando foi alterada para poder formar descendentes de pelo menos um novo tipo de célula, seja em cultura ou *in vivo*, em comparação com o que seria capaz de formar sob as mesmas condições sem programação. Isto significa que, após proliferação suficiente, é observada uma proporção mensurável de progênie com características fenotípicas do novo tipo de célula, se essencialmente nenhuma progênie puder se formar antes da programação; alternativamente, a proporção com características do novo tipo de célula é mensurável mais do que antes da programação. Este processo inclui diferenciação, desdiferenciação e transdiferenciação.

[065]"Diferenciação" é o processo pelo qual uma célula menos especializada se torna um tipo de célula mais especializada. "Desdiferenciação" é um processo celular no qual uma célula diferenciada parcial ou terminalmente reverte para um estágio inicial do desenvolvimento, como pluripotência ou multipotência. "Transdiferenciação" é um processo de transformação de um tipo de célula diferenciado em outro tipo de célula diferenciado. Normalmente, a transdiferenciação por programação ocorre sem que as células passem por um estágio intermediário de pluripotência - isto é, as células são programadas diretamente de um tipo de célula diferenciado para outro tipo de célula diferenciado. Sob certas condições, a proporção de progênie com características do novo

tipo de célula pode ser de pelo menos cerca de 1%, 5%, 25% ou mais em ordem crescente de preferência.

[066]"Reprogramação" é um processo que confere a uma célula uma capacidade mensurável aumentada de formar descendentes de pelo menos um novo tipo de célula, em cultura ou *in vivo*, do que teria nas mesmas condições sem reprogramação. Mais especificamente, a reprogramação é um processo que confere a uma célula somática um potencial pluripotente. Isto significa que, após proliferação suficiente, uma proporção mensurável de progênie com características fenotípicas do novo tipo de célula se essencialmente nenhuma progênie pudesse se formar antes da reprogramação; caso contrário, a proporção com características do novo tipo de célula é mensurável mais do que antes da reprogramação. Sob certas condições, a proporção de progênie com características do novo tipo de célula pode ser de pelo menos cerca de 1%, 5%, 25% ou mais em ordem crescente de preferência.

[067]O termo "programação direta" refere-se à programação de uma célula multipotente ou pluripotente, em oposição a uma célula somática diferenciada que não possui pluripotência, pelo fornecimento de um ou mais genes ou produtos genéticos determinantes de linhagem à célula multipotente ou pluripotente. Por exemplo, a programação direta pode descrever o processo de programação de ESCs ou iPSCs para células precursoras hematopoiéticas ou outras células precursoras, ou para células hematopoiéticas ou outras células somáticas diferenciadas.

[068]Como aqui utilizado, o termo "indivíduo" ou "indivíduo em necessidade do mesmo" refere-se a um mamífero, preferencialmente um ser humano, homem ou mulher, em qualquer idade que necessite de um transplante de células ou tecidos. Normalmente, o indivíduo precisa de transplante de células ou tecidos (também aqui referido como receptor) devido a um distúrbio ou condição patológica ou indesejada, estado ou

síndrome, ou uma anormalidade física, morfológica ou fisiológica que é passível de tratamento por meio de transplante de células ou de tecido.

[069] Como usado aqui, uma "interrupção" de um gene refere-se à eliminação ou redução da expressão de um ou mais produtos genéticos codificados pelo gene em questão em uma célula, em comparação com o nível de expressão do produto do gene na ausência da interrupção. Exemplos de produtos gênicos incluem mRNA e produtos de proteína codificados pelo gene. A interrupção em alguns casos é transitória ou reversível e em outros casos é permanente. A interrupção em alguns casos é de uma proteína ou mRNA funcional ou de comprimento total, apesar do fato de que um produto truncado ou não funcional pode ser produzido. Em algumas modalidades deste documento, a atividade ou função do gene, em oposição à expressão, é interrompida. A interrupção do gene é geralmente induzida por métodos artificiais, isto é, pela adição ou introdução de um composto, molécula, complexo ou composição e/ou pela interrupção do ácido nucleico ou associada ao gene, como no nível do DNA. Métodos exemplares para interrupção de genes incluem técnicas de silenciamento, knockdown, knockout e/ou interrupção de genes, como edição de genes. Os exemplos incluem tecnologia antissentido, como RNAi, siRNA, shRNA e/ou ribozimas, que geralmente resultam em redução transitória da expressão, bem como técnicas de edição de genes que resultam em inativação ou interrupção direcionada de genes, por exemplo, por indução de quebras e/ou recombinação homóloga. Exemplos incluem inserções, mutações e deleções. As interrupções resultam tipicamente na repressão e/ou ausência total de expressão de um produto normal ou "tipo selvagem" codificado pelo gene. Exemplos de tais interrupções gênicas são inserções, mutações de deslocamento de quadros e sem sentido, deleções, knock-in e knockout do gene ou parte do gene, incluindo deleções de todo o gene. Tais interrupções podem ocorrer na região de codificação, por exemplo, em um ou mais éxons,

resultando na incapacidade de produzir um produto completo, produto funcional ou qualquer outro produto, como por inserção de um códon de parada. Tais interrupções também podem ocorrer por interrupções no promotor ou intensificador ou outra região que afetam a ativação da transcrição, de modo a impedir a transcrição do gene. As rupturas de genes incluem direcionamento de genes, incluindo inativação de genes direcionados por recombinação homóloga.

[070]"Ligante Notch" é uma proteína capaz de se ligar a um polipeptídeo receptor Notch presente na membrana de várias células de mamíferos diferentes, como células-tronco hematopoiéticas. Os receptores Notch que foram identificados nas células humanas incluem Notch-1, Notch-2, Notch-3 e Notch-4. Os ligantes de Notch geralmente possuem um domínio DSL (D-Delta, S-Serrate e L-Lag2) compreendendo 20 a 22 aminoácidos no terminal amino e entre 3 a 8 repetições do tipo EGF (Furie e Furie, 1988; Knust *et al.*, 1987; Suzuki *et al.*, 1987) na superfície extracelular.

[071]"Super doadores" são aqui referidos como indivíduos homozigotos para certos genes MHC de classe I e II. Esses indivíduos homozigotos podem servir como super doadores e suas células, incluindo tecidos e outros materiais que compreendem suas células, podem ser transplantadas em indivíduos homozigotos ou heterozigotos para esse haplótipo. O super doador pode ser homozigoto para os alelos loco/loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ, respectivamente.

[072]O termo "receptores de antígeno quiméricos (CARs)", como usado aqui, pode se referir a receptores artificiais de células T, receptores de células T quiméricos ou imunorreceptores quiméricos, por exemplo, e engloba receptores de engenharia que enxertam uma especificidade artificial em uma célula efetiva imunológica específica. Os CARs podem ser empregados para conferir a especificidade de um anticorpo monoclonal em uma célula T, permitindo assim que um grande número de células T específicas seja

gerado, por exemplo, para uso em terapia celular adotiva. Em modalidades específicas, os CARs direcionam a especificidade da célula a um antígeno associado a um tumor, por exemplo. Em algumas modalidades, os CARs compreendem um domínio intracelular de ativação, um domínio transmembranar e um domínio extracelular que compreende uma região de ligação do antígeno associado ao tumor. Em aspectos particulares, os CARs compreendem fusões de fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) derivados de anticorpos monoclonais, fundidos a CD3-zeta, um domínio transmembranar e endodomínio. A especificidade de outros desenhos de CAR pode ser derivada de ligantes de receptores (por exemplo, peptídeos) ou de receptores de reconhecimento de padrões, como as dectinas. Em certos casos, o espaçamento do domínio de reconhecimento de antígeno pode ser modificado para reduzir a morte celular induzida por ativação. Em certos casos, os CARs compreendem domínios para sinalização coestimuladora adicional, como CD3 ζ , FcR, CD27, CD28, CD137, DAP10 e/ou OX40. Em alguns casos, as moléculas podem ser coexpressas com o CAR, incluindo moléculas coestimuladoras, genes repórteres para geração de imagens (por exemplo, para tomografia por emissão de pósitrons), produtos gênicos que ablam condicionalmente as células T após a adição de um pró-fármaco, receptores de alojamento, quimiocinas, receptores de quimiocinas, citocinas e receptores de citocinas.

[073]O termo "células apresentadoras de antígeno (APCs)" refere-se a uma classe de células capazes de apresentar um ou mais antígenos na forma de complexo peptídeo-MHC reconhecível por células efetoras específicas do sistema imunológico e, assim, induzir uma resposta imunológica celular eficaz contra o antígeno ou antígenos sendo apresentados. APCs podem ser células inteiras intactas, como macrófagos, células B, células endoteliais, células T ativadas e células dendríticas; ou outras moléculas, de ocorrência natural ou sintéticas, tais como moléculas MHC Classe I purificadas

complexadas com β 2-microglobulina. Embora muitos tipos de células possam ser capazes de apresentar antígenos em sua superfície celular para o reconhecimento de células T, apenas as células dendríticas têm a capacidade de apresentar antígenos em uma quantidade eficiente para ativar células T ingênuas para respostas de linfócitos T citotóxicos (CTL).

II. Células-tronco pluripotentes

[074] Em certas modalidades, as células-tronco pluripotentes são manipuladas para expressar um receptor antigênico, como um CAR. As células-tronco pluripotentes podem ser células-tronco incluindo, entre outras, células-tronco pluripotentes induzidas e células-tronco embrionárias. Em aspectos particulares, as células-tronco pluripotentes usadas aqui são células-tronco embrionárias humanas (ESCs) ou células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) que são capazes de proliferação a longo prazo *in vitro*, mantendo o potencial de se diferenciar em todos os tipos de células do corpo, incluindo as células precursoras hematopoiéticas da presente revelação.

A. Células-tronco embrionárias

[075] Em certos aspectos, as células-tronco pluripotentes como ESCs. As células ES são derivadas da massa celular interna dos blastocistos e têm uma alta capacidade de diferenciação *in vitro*. As células ES podem ser isoladas removendo a camada externa de trofoblasto de um embrião em desenvolvimento e cultivando as células de massa interna em uma camada alimentadora de células que não crescem. As células substituídas podem continuar a proliferar e produzir novas colônias de células ES que podem ser removidas, dissociadas, substituídas novamente e deixadas crescer. Este processo de "subcultura" de células ES indiferenciadas pode ser repetido várias vezes para produzir linhas celulares que contêm células ES indiferenciadas (Patentes nºs US 5.843.780; 6.200.806; 7.029.913). As células ES têm o potencial de proliferar enquanto

mantêm sua pluripotência. Por exemplo, as células ES são úteis na pesquisa de células e genes que controlam a diferenciação celular. A pluripotência das células ES combinada com a manipulação e seleção genética pode ser usada para estudos de análise de genes *in vivo* através da geração de camundongos transgênicos, quiméricos e knockout.

[076]Os métodos para a produção de células ES de camundongo são bem conhecidos. Em um método, um blastocisto pré-implantação da cepa 129 de camundongos é tratado com antissoro de camundongo para remover o trofoectoderma e a massa celular interna é cultivada em uma camada de células alimentadoras de fibroblastos embrionários de camundongo quimicamente inativados em meio contendo soro fetal de bezerro. As colônias de células ES indiferenciadas que se desenvolvem são subcultivadas nas camadas de alimentadores de fibroblastos embrionários de camundongos na presença de soro fetal de bezerro para produzir populações de células ES. Em alguns métodos, as células ES de camundongo podem ser cultivadas na ausência de uma camada alimentadora, adicionando o fator inibidor da citocina leucemia (LIF) ao meio de cultura que contém soro. Em outros métodos, as células ES de camundongo podem ser cultivadas em meio isento de soro na presença de proteína morfogênica óssea e LIF.

[077]As células ES humanas podem ser produzidas ou derivadas de um embrião de mamífero com zigoto ou blastocisto produzido pela fusão de um espermatozoide e óvulo, transferência nuclear, patogênese ou reprogramação da cromatina e subsequente incorporação da cromatina reprogramada em uma membrana plasmática para produzir uma célula embrionária por métodos previamente descritos (Thomson e Marshall, 1998; Reubinoff *et al.*, 2000). Em um método, os blastocistos humanos são expostos ao soro anti-humano e as células trofoectodermas são lisadas e removidas da massa celular interna que é cultivada em uma camada alimentadora de fibroblastos embrionários de

camundongo. Além disso, grupos de células derivadas da massa celular interna são quimicamente ou mecanicamente dissociados, substituídos e colônias com morfologia indiferenciada são selecionadas por micropipeta, dissociadas e substituídas. Em alguns métodos, as células ES humanas podem ser cultivadas sem soro cultivando as células ES em uma camada alimentadora de fibroblastos na presença de fator básico de crescimento de fibroblastos. Em outros métodos, as células ES humanas podem ser cultivadas sem uma camada de células alimentadoras cultivando as células em uma matriz de proteínas como MATRIGEL TM ou laminina na presença de meio "condicionado" contendo fator de crescimento básico de fibroblastos (Xu *et al.*, 2001).

[078]As células ES também podem ser derivadas de outros organismos, incluindo o macaco rhesus e o sagui, por métodos previamente descritos (Thomson e Marshall, 1998; Thomson *et al.*, 1995; Thomson e Odorico, 2000; Patente nº US 5.843.780), bem como de linhas de células humanas e camundongos estabelecidas. Por exemplo, linhas celulares ES humanas estabelecidas incluem MAOI, MA09, ACT-4, HI, H7, H9, H13, H14 e ACT30. Como outro exemplo, as linhas celulares ES de camundongo que foram estabelecidas incluem a linha celular CGR8 estabelecida a partir da massa celular interna dos embriões da cepa de camundongo 129, e as culturas de células CGR8 podem ser cultivadas na presença de LIF sem camadas alimentadoras.

[079]As células-tronco ES podem ser detectadas por marcadores de proteínas, incluindo fator de transcrição Oct4, fosfatase alcalina (AP), antígeno embrionário SSEA-1 de estágio específico, antígeno embrionário SSEA-3 de estágio específico, antígeno embrionário SSEA-3 de estágio específico, fator de transcrição NANOG, antígeno de rejeição de tumor 1-60 (TRA-1-60), antígeno de rejeição de tumor 1-81 (TRA-1-81), SOX2 ou REX1.

B.Células-tronco pluripotentes induzidas

[080]Em outros aspectos, as células-tronco pluripotentes aqui utilizadas são células-tronco pluripotentes induzidas (iPS), comumente abreviadas células iPS ou iPSCs. A indução da pluripotência foi alcançada originalmente em 2006 usando células de camundongo (Yamanaka *et al.* 2006) e em 2007 usando células humanas (Yu *et al.* 2007; Takahashi *et al.* 2007) reprogramando células somáticas através da introdução de fatores de transcrição que estão ligados à pluripotência. O uso de iPSCs contorna a maioria dos problemas éticos e práticos associados ao uso clínico em larga escala de células ES, e pacientes com transplantes autólogos derivados de iPSC podem não precisar de tratamentos imunossupressores por toda a vida para evitar a rejeição do enxerto.

[081]Com exceção das células germinativas, qualquer célula pode ser usada como ponto de partida para iPSCs. Por exemplo, os tipos de células podem ser queratinócitos, fibroblastos, células hematopoiéticas, células mesenquimais, células hepáticas ou células do estômago. As células T também podem ser utilizadas como fonte de células somáticas para reprogramação (Patente nº US 8.741.648). Não há limitação no grau de diferenciação celular ou na idade de um animal a partir do qual as células são coletadas; mesmo células progenitoras indiferenciadas (incluindo células-tronco somáticas) e finalmente células maduras diferenciadas podem ser usadas como fontes de células somáticas nos métodos aqui divulgados.

[082]As células somáticas podem ser reprogramadas para produzir iPSCs usando métodos conhecidos por um versado na técnica. Um versado na técnica pode produzir prontamente células-tronco pluripotentes induzidas, ver, por exemplo, o Pedido de Patente Publicado nº US 20090246875, Pedido de Patente Publicado nº US 2010/0210014; Pedido de Patente Publicado nº US 20120276636; Patente nº US 8.058.065; Patente nº US 8.129.187; Patente nº US 8.268.620; Publicação PCT nº WO 2007/069666 A1 e Patente nº US 8.268.620, que são aqui incorporadas por

referência. Geralmente, fatores de reprogramação nuclear são usados para produzir células-tronco pluripotentes a partir de uma célula somática. Em algumas modalidades, são utilizados pelo menos três ou pelo menos quatro de Klf4, c-Myc, Oct3/4, Sox2, Nanog e Lin28. Em outras modalidades, são utilizados Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4.

[083]As sequências de cDNA de camundongo e humano dessas substâncias de reprogramação nuclear estão disponíveis com referência aos números de acesso NCBI mencionados em WO 2007/069666 e Patente nº US 8.183.038, que são aqui incorporados por referência. Os métodos para introduzir uma ou mais substâncias de reprogramação, ou ácidos nucleicos que codificam essas substâncias de reprogramação, são conhecidos na técnica e divulgados, por exemplo, nas Patentes nºs US 8.268.620, 8.691.574, 8.741.648, 8.546.140, em Patente Publicada nº US 8.900.871 e Patente nº US 8.071.369, que estão aqui incorporadas por referência.

[084]Uma vez derivadas, as iPSCs podem ser cultivadas em um meio suficiente para manter a pluripotência. As iPSCs podem ser usadas com vários meios e técnicas desenvolvidas para cultivar células-tronco pluripotentes, mais especificamente, células-tronco embrionárias, como descrito na Patente nº US 7.442.548 e Publicação de Patente nº US 2003/0211603. No caso de células de camundongo, a cultura é realizada com a adição do fator inibidor da leucemia (LIF) como fator de supressão da diferenciação em um meio comum. No caso de células humanas, é desejável que o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) seja adicionado no lugar de LIF. Outros métodos para a cultura e manutenção de iPSCs, como seria conhecido por um versado na técnica, podem ser usados com os presentes métodos.

[085]Em certas modalidades, condições indefinidas podem ser usadas; por exemplo, células pluripotentes podem ser cultivadas em células alimentadoras de fibroblastos ou em um meio que foi exposto a células alimentadoras de fibroblastos, a fim

de manter as células-tronco em um estado indiferenciado. Em algumas modalidades, a célula é cultivada na copresença de fibroblastos embrionários de camundongo tratados com radiação ou um antibiótico para terminar a divisão celular, como células alimentadoras. Alternativamente, as células pluripotentes podem ser cultivadas e mantidas em um estado essencialmente indiferenciado usando um sistema de cultura definido e independente do alimentador, como um meio TESR™ (Ludwig *et al.*, 2006a; Ludwig *et al.*, 2006b) ou meio E8™/Essential 8™ (Chen *et al.*, 2011).

[086]Os plasmídeos foram projetados com uma série de objetivos em mente, como atingir um número alto de cópias regulado e evitar possíveis causas de instabilidade do plasmídeo em bactérias e fornecer meios para a seleção de plasmídeo compatíveis com o uso em células de mamíferos, incluindo células humanas. Foi dada especial atenção aos requisitos duplos de plasmídeos para uso em células humanas. Primeiro, eles são adequados para manutenção e fermentação em *E. coli*, para que grandes quantidades de DNA possam ser produzidas e purificadas. Segundo, eles são seguros e adequados para uso em pacientes e animais humanos. O primeiro requisito exige plasmídeos com alto número de cópias que podem ser selecionados e mantidos de forma estável com relativa facilidade durante a fermentação bacteriana. O segundo requisito exige atenção a elementos como marcadores selecionáveis e outras sequências de codificação. Em algumas modalidades, os plasmídeos que codificam um marcador são compostos de: (1) uma origem de replicação com número de cópias alto, (2) um marcador selecionável, como, mas não limitado a, o gene *neo* para seleção de antibióticos com canamicina, (3) transcrição sequências de terminação, incluindo o intensificador de tirosinase e (4) um local de multiclonagem para incorporação de vários cassetes de ácido nucleico; e (5) uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um marcador operacionalmente ligado ao promotor da tirosinase. Existem numerosos vetores de

plasmídeos que são conhecidos na técnica por induzir um ácido nucleico que codifica uma proteína. Estes incluem, mas não estão limitados a, os vetores divulgados na Patente nº US 6.103.470; Patente nº US 7.598.364; Patente nº US 7.989.425; e Patente nº US 6.416.998, que são aqui incorporadas por referência.

[087]Um sistema de entrega de genes episomal pode ser um plasmídeo, um vetor episomal baseado no vírus Epstein-Barr (EBV) (Patente US 8.546.140), um vetor baseado em leveduras, um vetor baseado em adenovírus, um vetor episomal baseado em vírus símio 40 (SV40) vetor, um vetor baseado no vírus do papiloma bovino (BPV) ou um vetor lentiviral. Um sistema de entrega de genes virais pode ser um vetor viral baseado em RNA ou em DNA.

1. Células para produção de iPSCs

[088]Certas modalidades da presente revelação dizem respeito a uma população inicial de células somáticas (por exemplo, células sanguíneas ou células da pele) que são reprogramadas para iPSCs. A população de células sanguíneas pode incluir células mononucleares do sangue periférico (PBMC), sangue total ou frações contendo populações mistas, células do baço, células da medula óssea, linfócitos infiltrantes de tumor, células obtidas por leucaférese, tecido de biópsia e linfonodos, por exemplo, linfonodos drenados de um tumor. Os doadores adequados incluem doadores imunizados, doadores não imunizados (ingênuos), doadores tratados ou não tratados. Um doador "tratado" é aquele que foi exposto a um ou mais modificadores biológicos. Um doador "não tratado" não foi exposto a um ou mais modificadores biológicos.

[089]Em alguns aspectos, a população de células sanguíneas compreende células T. As células T podem ser uma população purificada de células T ou, alternativamente, as células T podem estar em uma população com células de um tipo diferente, como células B e/ou outras células sanguíneas periféricas. As células T podem

ser uma população purificada de um subconjunto de células T, como células T CD4⁺, ou podem ser uma população de células T compreendendo diferentes subconjuntos de células T. Em outra modalidade, as células T são clones de células T que foram mantidas em cultura por longos períodos de tempo. Os clones de células T podem ser transformados em diferentes graus. Em uma modalidade específica, as células T são um clone de células T que prolifera indefinidamente em cultura.

[090]Em alguns aspectos, as células T são células T primárias. O termo "células T primárias" pretende incluir células T obtidas de um indivíduo, em oposição a células T que foram mantidas em cultura por longos períodos de tempo. Assim, as células T primárias são particularmente células T do sangue periférico obtidas de um indivíduo. Uma população de células T primárias pode ser composta principalmente por um subconjunto de células T. Alternativamente, a população de células T primárias pode ser composta de diferentes subconjuntos de células T.

[091]As células T podem ser de amostras de sangue previamente armazenadas, de um indivíduo saudável ou, alternativamente, de um indivíduo afetado por uma condição. A condição pode ser uma doença infecciosa, como uma condição resultante de uma infecção viral, uma infecção bacteriana ou uma infecção por qualquer outro micro-organismo ou uma doença hiperproliferativa, como câncer como melanoma. Em uma modalidade específica, as células T são de um indivíduo infectado com um vírus da imunodeficiência humana (HIV). Em ainda outra modalidade, as células T são de um indivíduo que sofre de ou é suscetível a uma doença autoimune ou patologias de célula T. As células T podem ser de origem humana, murina ou qualquer outra espécie de mamífero.

[092]Os métodos para obter populações de células compreendendo células T são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, as células mononucleares do sangue periférico

(PBMC) podem ser obtidas como descrito de acordo com métodos conhecidos na técnica. Exemplos de tais métodos são apresentados nos Exemplos e são discutidos por Kim *et al.* (1992); Biswas *et al.* (1990); Biswas *et al.* (1991).

[093]Em alguns aspectos, a população inicial de células sanguíneas compreende células-tronco hematopoiéticas (HSCs). Os HSCs normalmente residem na medula óssea, mas podem ser forçados para o sangue, um processo denominado mobilização usado clinicamente para coletar um grande número de HSCs no sangue periférico. Um agente mobilizador de escolha é o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). As células-tronco hematopoiéticas CD34⁺ ou progenitores que circulam no sangue periférico podem ser coletadas por técnicas de aférese no estado imperturbável ou após mobilização após a administração externa de fatores de crescimento hematopoiéticos como o G-CSF. O número de células-tronco ou progenitoras coletadas após a mobilização é maior que o obtido após a aférese no estado imperturbável. Em alguns aspectos, a fonte da população celular é um indivíduo cujas células não foram mobilizadas por fatores aplicados de forma extrínseca, porque não há necessidade de enriquecer células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras.

[094]Os métodos para obter células precursoras hematopoiéticas de populações de células também são bem conhecidos na técnica. As células precursoras hematopoiéticas podem ser expandidas usando várias citocinas, como hSCF, hFLT3 e/ou IL-3 (Akkina *et al.*, 1996), ou células CD34⁺ podem ser enriquecidas usando MACS ou FACS. Como mencionado acima, técnicas de seleção negativa também podem ser usadas para enriquecer células CD34⁺.

[095]As populações de células para uso nos métodos aqui descritos podem ser células de mamíferos, como células humanas, células de primatas não humanos, células de roedores (por exemplo, camundongo ou camundongo), células bovinas, células ovinas,

células porcinas, células equinas, células de ovelhas, células caninas e células felinas ou uma mistura das mesmas. As células de primatas não humanos incluem células de macaco rhesus. As células podem ser obtidas de um animal, por exemplo, um paciente humano, ou podem ser de linhas celulares. Se as células são obtidas de um animal, elas podem ser usadas como tal, por exemplo, como células não separadas (ou seja, uma população mista); elas podem ter sido estabelecidas na cultura primeiro, por exemplo, por transformação; ou elas podem ter sido submetidas a métodos de purificação preliminares. Por exemplo, uma população celular pode ser manipulada por seleção positiva ou negativa com base na expressão de marcadores da superfície celular; estimulada com um ou mais antígenos *in vitro* ou *in vivo*; tratada com um ou mais modificadores biológicos *in vitro* ou *in vivo*; ou uma combinação de qualquer um ou todos eles. Em uma modalidade ilustrativa, uma população de células é sujeita a seleção negativa para depleção de células não T e/ou subconjuntos de células T específicos. A seleção negativa pode ser realizada com base na expressão da superfície celular de uma variedade de moléculas, incluindo marcadores de células B, como CD19 e CD20; marcador de monócitos CD14; o marcador de células NK CD56. Alternativamente, uma população de células pode ser sujeita a seleção negativa para depleção de células hematopoiéticas não CD34⁺ e/ou subconjuntos de células hematopoiéticas particulares. A seleção negativa pode ser realizada com base na expressão da superfície celular de uma variedade de moléculas, como um coquetel de anticorpos (por exemplo, CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123, CD235a e CD41 (por exemplo, para células da linhagem de megacariócitos) que podem ser usadas para a separação de outros tipos de células, por exemplo, via MACS ou separação por coluna.

[096] Também é possível obter uma amostra de célula de um indivíduo e, em seguida, enriquecê-la para o tipo de célula desejado. Por exemplo, PBMCs e/ou células

hematopoiéticas CD34⁺ podem ser isoladas do sangue, como aqui descrito. A centrifugação de contrafluxo (elutriação) pode ser usada para enriquecer as células T de PBMCs. As células também podem ser isoladas de outras células usando uma variedade de técnicas, como isolamento e/ou ativação com um anticorpo que se liga a um epítipo na superfície celular do tipo de célula desejado, por exemplo, alguns kits de isolamento de células T usam anticorpo conjugado contendo para ativar as células e permitir a separação da coluna com as mesmas contagens. Outro método que pode ser usado inclui seleção negativa usando anticorpos para marcadores da superfície celular para enriquecer seletivamente um tipo de célula específico sem ativar a célula pelo envolvimento do receptor.

[097]As células da medula óssea podem ser obtidas a partir da crista ilíaca, fêmur, tíbia, coluna, costela ou outros espaços medulares. A medula óssea pode ser retirada do paciente e isolada através de várias separações e procedimentos de lavagem. Um procedimento conhecido para o isolamento de células da medula óssea compreende as seguintes etapas: a) separação centrífuga da suspensão da medula óssea em três frações e coleta da fração intermediária, ou buffycoat; b) a fração buffycoat da etapa (a) é centrifugada mais uma vez em um fluido de separação, geralmente Ficoll (uma marca comercial da Pharmacia Fine Chemicals AB), e uma fração intermediária que contém as células da medula óssea é coletada; e c) lavagem da fração coletada da etapa (b) para recuperação de células da medula óssea transfusionáveis.

[098]Se se deseja usar uma população de células enriquecidas em células T, essas populações de células podem ser obtidas de uma população mista de células por leucaférese e aférese mecânica usando um separador de células de fluxo contínuo. Por exemplo, as células T podem ser isoladas do revestimento buffy por qualquer método

conhecido, incluindo separação sobre gradiente Ficoll-Hypaque™, separação sobre um gradiente Percoll ou elutriação.

[099]Em certos aspectos, as células T são ativadas por agentes que se ligam aos receptores de células T para desencadear uma cascata de sinalização para a ativação das células T. Por exemplo, um anticorpo CD3 pode ser usado. Para expansão de células T para um número significativo e um estado de proliferação para reprogramação, uma citocina também pode ser usada, como IL-2. Em um certo aspecto, anti-CD3 e anti-CD28 podem ser usados para ativação de células T quando a coestimulação está envolvida. Em um aspecto alternativo, a reticulação do anti-CD3 pode ser aplicada, como o anti-CD3 ligado à placa. Se o anti-CD3 solúvel for usado para ativar as células T no PBMC, o anticorpo anti-CD3 solúvel pode se ligar a APCs no PBMC, que então apresenta o anticorpo às células T. Se o anticorpo anti-CD3 solúvel sozinho for usado em uma população de células T purificadas, a anergia resultaria pelas razões mencionadas acima. Um certo modelo compreende a cultura de células T na presença do anti-CD3 (OKT3) e IL2, o que é vantajoso e conveniente porque não há necessidade de usar contas caras e complicadas ou anticorpo ligado à placa; depois de adicionar OKT3 e IL2, o meio celular dos PBMCs ajudaria a ativar as células T. As células T superlotaram os outros tipos de células na cultura PBMC devido à expansão preferencial.

[0100]Em certos aspectos, a população inicial de células sanguíneas compreende células linfoblastoides, como a partir de linhas celulares linfoblastoides (LCLs). A geração de LCLs é conhecida na técnica, por exemplo, pela infecção de células B pelo vírus Epstein-Barr (EBV) (Frisan *et al.*, 2001).

2.Reprogramação de células somáticas

[0101]Em algumas modalidades, a população inicial de células (por exemplo, células T) é reprogramada para iPSCs, como pelos métodos descritos na Publicação de

Patente nº US 2014/0315304; aqui incorporada por referência na sua totalidade. Em certos aspectos da presente revelação, os fatores de reprogramação são expressos a partir de cassetes de expressão compreendidas em um ou mais vetores, como um vetor de integração ou um vetor episomal. Em um aspecto adicional, as proteínas de reprogramação podem ser introduzidas diretamente nas células somáticas por transdução de proteínas.

[0102]Alguém versado na técnica estaria bem equipado para construir um vetor através de técnicas recombinantes padrão (ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, 2001 e Ausubel *et al.*, 1996, ambos incorporados aqui por referência). Os vetores incluem, entre outros, plasmídeos, cosmídeos, vírus (bacteriófagos, vírus animais e vírus de plantas) e cromossomos artificiais (por exemplo, YACs), como vetores retrovirais (por exemplo, derivados de vetores do vírus da leucemia murina Moloney (MoMLV), MSCV, SFFV, MPSV, SNV, etc.), vetores lentivirais (por exemplo, derivados de HIV-1, HIV-2, SIV, BIV, FIV etc.), vetores adenovirais (Ad) incluindo competentes para replicação, formas deficientes de replicação e sem tripas, adeno vetores virais associados (AAV), vetores do vírus símio 40 (SV-40), vetores do vírus do papiloma bovino, vetores do vírus Epstein-Barr, vetores do vírus do herpes, vetores do vírus da vaccinia, vetores do vírus do sarcoma murino Harvey, vetores do vírus do tumor mamário murino, vetores de vírus de sarcoma de Rous.

a. Vetores Virais

[0103]Os vetores virais podem ser fornecidos em certos aspectos da presente revelação. Na geração de vetores virais recombinantes, genes não essenciais são tipicamente substituídos por um gene ou sequência codificadora para uma proteína heteróloga (ou não nativa). Um vetor viral é um tipo de construto de expressão que utiliza sequências virais para introduzir ácido nucleico e possivelmente proteínas em uma

célula. A capacidade de certos vírus infectarem células ou entrarem nas células via endocitose mediada por receptores e se integrarem nos genomas das células hospedeiras e expressarem genes virais de maneira estável e eficiente os tornaram candidatos atraentes para a transferência de ácidos nucleicos estranhos para as células (por exemplo, células de mamíferos). Exemplos não limitativos de vetores de vírus que podem ser usados para fornecer um ácido nucleico de certos aspectos da presente revelação são descritos abaixo.

[0104]Os retrovírus têm promessa como vetores de entrega de genes devido à sua capacidade de integrar seus genes no genoma hospedeiro, transferir uma grande quantidade de material genético estranho, infectar um amplo espectro de espécies e tipos de células e ser empacotados em linhas celulares especiais (Miller, 1992).

[0105]Para construir um vetor retroviral, um ácido nucleico é inserido no genoma viral no lugar de certas sequências virais para produzir um vírus com defeito de replicação. Para produzir vírions, uma linha celular de empacotamento contendo os genes gag, pol e env - mas sem a LTR e os componentes de empacotamento - é construída (Mann *et al.*, 1983). Quando um plasmídeo recombinante contendo um cDNA, juntamente com a LTR retroviral e as sequências de empacotamento, é introduzido em uma linha celular especial (por exemplo, por precipitação com fosfato de cálcio), a sequência de empacotamento permite que o transcrito de RNA do plasmídeo recombinante seja empacotado em partículas virais, que são então secretadas no meio de cultura (Nicolas e Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). O meio contendo os retrovírus recombinantes é então coletado, opcionalmente concentrado e utilizado para transferência de genes. Os vetores retrovirais são capazes de infectar uma ampla variedade de tipos de células. No entanto, integração e expressão estável requerem a divisão de células hospedeiras (Paskind *et al.*, 1975).

[0106]Os lentivírus são retrovírus complexos que, além dos genes retrovirais comuns gag, pol e env, contêm outros genes com função reguladora ou estrutural. Os vetores lentivirais são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Naldini *et al.*, 1996; Zufferey *et al.*, 1997; Blomer *et al.*, 1997; Patentes US 6.013.516 e 5.994.136).

[0107]Os vetores lentivirais recombinantes são capazes de infectar células que não se dividem e podem ser usados para transferência gênica *in vivo* e *ex vivo* e expressão de sequências de ácidos nucleicos. Por exemplo, lentivírus recombinante capaz de infectar uma célula não dividida - em que uma célula hospedeira adequada é transfectada com dois ou mais vetores portando as funções de empacotamento, como gag, pol e env, bem como rev e tat - é descrita na Patente US 5.994.136, aqui incorporada por referência.

b.Vetores Epissomais

[0108]O uso de vetores extracromossômicos (ou seja, epissomais) à base de plasmídeo ou lipossomo também pode ser fornecido em certos aspectos da presente revelação. Tais vetores epissomais podem incluir, por exemplo, vetores baseados em oriP e/ou vetores que codificam um derivado de EBNA-1. Esses vetores podem permitir que grandes fragmentos de DNA sejam introduzidos em uma célula e mantidos extracromossomos, replicados uma vez por ciclo celular, particionados em células filhas com eficiência e não provocam substancialmente nenhuma resposta imunológica.

[0109]Em particular, o EBNA-1, a única proteína viral necessária para a replicação do vetor de expressão baseado em oriP, não provoca uma resposta imunológica celular porque desenvolveu um mecanismo eficiente para contornar o processamento necessário para a apresentação de seus antígenos na classe MHC Moléculas I (Levitskaya *et al.*, 1997). Além disso, o EBNA-1 pode atuar em trans para melhorar a expressão do gene clonado, induzindo a expressão de um gene clonado até 100 vezes em algumas linhas

celulares (Langle-Rouault *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 1997). Finalmente, a fabricação de tais vetores de expressão baseados em oriP é barata.

[0110]Outros vetores extracromossômicos incluem outros vetores baseados no vírus do herpes linfotrófico. O vírus do herpes linfotrófico é um vírus do herpes que se replica em um linfoblasto (por exemplo, um linfoblasto humano B) e se torna um plasmídeo para uma parte do seu ciclo de vida natural. O vírus do herpes simplex (HSV) não é um vírus do herpes "linfotrófico". Exemplos de vírus do herpes linfotrófico incluem, mas não estão limitados a EBV, o vírus do sarcoma de Kaposi (KSHV); Herpes vírus saimiri (HS) e vírus da doença de Marek (MDV). Também são contempladas outras fontes de vetores de base epissomal, como ARS de levedura, adenovírus, SV40 ou BPV.

[0111]Alguém versado na técnica estaria bem equipado para construir um vetor através de técnicas recombinantes padrão (ver, por exemplo, Maniatis *et al.*, 1988 e Ausubel *et al.*, 1994, ambos incorporados aqui por referência).

[0112]Os vetores também podem compreender outros componentes ou funcionalidades que modulam ainda mais a entrega gênica e/ou a expressão gênica, ou que de outro modo fornecem propriedades benéficas para as células-alvo. Esses outros componentes incluem, por exemplo, componentes que influenciam a ligação ou direcionamento para células (incluindo componentes que mediam a ligação de tipo celular ou específica de tecido); componentes que influenciam a captação do ácido nucleico do vetor pela célula; componentes que influenciam a localização do polinucleotídeo dentro da célula após a captação (como agentes mediadores da localização nuclear); e componentes que influenciam a expressão do polinucleotídeo.

[0113]Tais componentes também podem incluir marcadores, tais como marcadores detectáveis e/ou de seleção que podem ser usados para detectar ou selecionar células que foram absorvidas e estão expressando o ácido nucleico entregue

pelo vetor. Tais componentes podem ser fornecidos como uma característica natural do vetor (como o uso de certos vetores virais que possuem componentes ou funcionalidades que mediam a ligação e a absorção), ou os vetores podem ser modificados para fornecer tais funcionalidades. Uma grande variedade de tais vetores é conhecida na técnica e geralmente está disponível. Quando um vetor é mantido em uma célula hospedeira, o vetor pode ser replicado de forma estável pelas células durante a mitose como uma estrutura autônoma, incorporada no genoma da célula hospedeira ou mantida no núcleo ou citoplasma da célula hospedeira.

c. Sistema baseado em transposon

[0114] Em certos aspectos, a entrega de fatores de programação pode usar um sistema transposon-transposase. Por exemplo, o sistema transposon-transposase pode ser o bem conhecido Sleeping Beauty, o sistema Frog Prince transposon-transposase (para obter uma descrição deste último, consulte, por exemplo, EP1507865), ou o sistema PiggyBac de transposon específico para TTAA.

[0115] Os transposons são sequências de DNA que podem se mover para diferentes posições dentro do genoma de uma única célula, um processo chamado transposição. No processo, eles podem causar mutações e alterar a quantidade de DNA no genoma. Os transposons também já foram chamados genes saltadores e são exemplos de elementos genéticos móveis.

[0116] Há uma variedade de elementos genéticos móveis, e eles podem ser agrupados com base em seu mecanismo de transposição. Os elementos genéticos móveis de classe I, ou retrotransposons, copiam a si mesmos sendo primeiro transcritos no RNA, depois transcritos de volta ao DNA pela transcriptase reversa e depois inseridos em outra posição no genoma. Os elementos genéticos móveis de Classe II movem-se

diretamente de uma posição para outra usando uma transposase para "recortar e colar" eles dentro do genoma.

[0117]Em modalidades particulares, os construtos (por exemplo, o construto de múltiplas linhagens) fornecidos na presente revelação usam um sistema de expressão PiggyBac. Os transposons de DNA de PiggyBac (PB) se mobilizam por meio de um mecanismo "recortar e colar", pelo qual uma enzima transposase (PB transposase), codificada pelo próprio transposon, excisa e reintegra o transposon em outros locais dentro do genoma. O PB transposase reconhece especificamente as repetições terminais invertidas PB (ITRs) que flanqueiam o transposon; liga-se a essas sequências e catalisa a excisão do transposon. O PB se integra nos locais da TTAA em todo o genoma, de maneira relativamente aleatória. Para a criação de mutações de armadilhas genéticas (ou adaptadas para a geração de animais transgênicos), a transposase é fornecida em trans em um plasmídeo e é cotransfectada com um plasmídeo contendo transposon doador, um transposon recombinante compreendendo uma armadilha gênica flanqueada pelos locais de ligação para a transposase (ITRs). A transposase irá catalisar a excisão do transposon do plasmídeo e subsequente integração no genoma. A integração dentro de uma região de codificação capturará os elementos necessários para a expressão da armadilha genética. O PB possui várias propriedades ideais: (1) preferencialmente se insere nos genes (50 a 67% das inserções atingem os genes) (2) não exibe salto local (ampla cobertura genômica) (3) não é sensível à inibição da superprodução em que níveis elevados da transposase causam diminuição da transposição 4) são retirados de forma limpa do local doador, sem deixar pegadas, diferentemente da Bela Adormecida.

d.Elementos Regulatórios

[0118]Os cassetes de expressão incluídos nos vetores de reprogramação úteis na presente revelação contêm preferencialmente (na direção 5' a 3') um promotor

transcricional eucariótico operacionalmente ligado a uma sequência de codificação de proteínas, sinais de emenda incluindo sequências intervenientes e uma sequência de terminação/poliadenilação transcricional.

(i) Promotor/melhoradores

[0119]Os construtos de expressão aqui fornecidos compreendem promotor para dirigir a expressão dos genes de programação. Um promotor geralmente compreende uma sequência que funciona para posicionar o local de início da síntese de RNA. O exemplo mais conhecido disso é a caixa TATA, mas em alguns promotores que não possuem uma caixa TATA, como, por exemplo, o promotor do gene da desoxinucleotidil transferase terminal de mamíferos e o promotor dos genes tardios do SV40, um elemento discreto sobre o início o site em si ajuda a fixar o local de iniciação. Elementos promotores adicionais regulam a frequência do início da transcrição. Normalmente, eles estão localizados na região de 30 a 110 pb a montante do local de início, embora vários promotores também demonstrem conter elementos funcionais a jusante do local de início. Para trazer uma sequência de codificação “sob o controle de” um promotor, posiciona-se a extremidade 5’ do local de iniciação da transcrição do quadro de leitura da transcrição “a jusante” (ou seja, 3’ de) do promotor escolhido. O promotor "a montante" estimula a transcrição do DNA e promove a expressão do RNA codificado.

[0120]O espaçamento entre os elementos promotores é frequentemente flexível, de modo que a função do promotor é preservada quando os elementos são invertidos ou movidos em relação um ao outro. No promotor tk, o espaçamento entre os elementos promotores pode ser aumentado para 50 bp antes que a atividade comece a declinar. Dependendo do promotor, parece que elementos individuais podem funcionar de forma cooperativa ou independente para ativar a transcrição. Um promotor pode ou não ser

utilizado em conjunto com um "intensificador", que se refere a uma sequência reguladora de ação cis envolvida na ativação transcricional de uma sequência de ácidos nucleicos.

[0121]Um promotor pode ser um naturalmente associado com uma sequência de ácidos nucleicos, tal como pode ser obtido isolando as sequências não codificantes 5' localizadas a montante do segmento codificante e/ou exão. Esse promotor pode ser chamado de "endógeno". Da mesma forma, um intensificador pode ser um naturalmente associado a uma sequência de ácidos nucleicos, localizado a jusante ou a montante dessa sequência. Alternativamente, certas vantagens serão obtidas posicionando o segmento de ácido nucleico codificante sob o controle de um promotor recombinante ou heterólogo, o qual se refere a um promotor que normalmente não está associado a uma sequência de ácidos nucleicos em seu ambiente natural. Um potenciador recombinante ou heterólogo refere-se também a um potenciador que normalmente não está associado a uma sequência de ácidos nucleicos no seu ambiente natural. Esses promotores ou potenciadores podem incluir promotores ou potenciadores de outros genes e promotores ou potenciadores isolados de qualquer outro vírus ou célula procariótica ou eucariótica e promotores ou potenciadores que não "ocorrem naturalmente", ou seja, contendo elementos diferentes de diferentes regiões reguladoras da transcrição, e/ou mutações que alteram a expressão. Por exemplo, os promotores mais comumente usados no construto do DNA recombinante incluem os sistemas promotores da β -lactamase (penicilinase), lactose e triptofano (trp). Além de produzir sequências de ácido nucleico de promotores e intensificadores sinteticamente, as sequências podem ser produzidas usando a tecnologia de clonagem recombinante e/ou de amplificação de ácido nucleico, incluindo PCR™, em conexão com as composições aqui divulgadas (ver Patentes nºs US 4.683.202 e 5.928.906, cada uma aqui incorporada por referência). Além disso, é contemplado que as sequências de controle que direcionam a transcrição e/ou expressão de sequências

dentro de organelas não nucleares, como mitocôndrias, cloroplastos e similares, também podem ser empregadas.

[0122]Naturalmente, será importante empregar um promotor e/ou intensificador que efetivamente direcione a expressão do segmento de DNA na organela, tipo de célula, tecido, órgão ou organismo escolhido para expressão. Aqueles versados na técnica da biologia molecular geralmente conhecem o uso de promotores, intensificadores e combinações de tipos de células para expressão de proteínas (ver, por exemplo, Sambrook *et al.* 1989, aqui incorporado por referência). Os promotores empregados podem ser constitutivos, específicos de tecido, induzíveis e/ou úteis sob as condições apropriadas para direcionar a expressão de alto nível do segmento de DNA introduzido, tal como é vantajoso na produção em larga escala de proteínas e/ou peptídeos recombinantes. O promotor pode ser heterólogo ou endógeno.

[0123]Além disso, qualquer combinação de promotor/intensificador (como, por exemplo, o EPDB do banco de dados do promotor eucariótico) também pode ser usada para direcionar a expressão. O uso de um sistema de expressão citoplasmática T3, T7 ou SP6 é outra modalidade possível. As células eucarióticas podem suportar a transcrição citoplasmática de certos promotores bacterianos se a polimerase bacteriana apropriada for fornecida, como parte do complexo de entrega ou como um construto de expressão genética adicional.

[0124]Exemplos não limitativos de promotores incluem promotores virais precoces ou tardios, como promotores precoces ou tardios de SV40, promotores precoces imediatos de citomegalovírus (CMV), promotores iniciais do vírus Rous Sarcoma (RSV); promotores de células eucarióticas, como, por exemplo, promotor de beta-actina (Ng, 1989; Quitsche *et al.*, 1989), promotor GADPH (Alexander *et al.*, 1988, Ercolani *et al.*, 1988), promotor de metalotioneína (Karin *et al.*, 1989; Richards *et al.*, 1984); e promotores

de elemento de resposta concatenados, tais como promotores de elemento de resposta AMP cíclico (cre), promotor de elemento de resposta de soro (sre), promotor de forbol éster (TPA) e promotores de elemento de resposta (tre) perto de uma caixa TATA mínima. Também é possível usar sequências promotoras do hormônio do crescimento humano (por exemplo, o promotor mínimo do hormônio do crescimento humano descrito em Genbank, acesso no.X05244, nucleotídeo 283-341) ou um promotor de tumor mamário de camundongo (disponível no ATCC, nº CAT ATCC 45007).

[0125]A expressão do transgene específico do tecido, especialmente para a expressão do gene repórter em células hematopoiéticas e precursores de células hematopoiéticas derivadas da programação, pode ser desejável como uma maneira de identificar células e precursores hematopoiéticos derivados. Para aumentar a especificidade e a atividade, foi contemplado o uso de elementos reguladores de ação cis. Por exemplo, um promotor específico de célula hematopoiética pode ser usado. Muitos desses promotores específicos de células hematopoiéticas são conhecidos na técnica, como promotores dos genes hematopoiéticos fornecidos na Tabela 1.

[0126]Em certos aspectos, os métodos da presente revelação também dizem respeito a sequências potenciadoras, isto é, sequências de ácido nucleico que aumentam a atividade de um promotor e que têm potencial para atuar em cis, e independentemente de sua orientação, mesmo a distâncias relativamente longas (até vários quilobases) longe do promotor-alvo). No entanto, a função potenciadora não é necessariamente restrita a longas distâncias, pois elas também podem funcionar em estreita proximidade com um determinado promotor.

[0127]Muitas sequências promotoras e potenciadoras de células hematopoiéticas foram identificadas e podem ser úteis nos métodos atuais. Ver, por exemplo, Patente US 5.556.954; Pedido de Patente US 20020055144; Pedido de Patente US 20090148425.

(ii) Sinais de Iniciação e Expressão Vinculada

[0128]Um sinal de iniciação específico também pode ser usado nos construtos de expressão fornecidas na presente revelação para tradução eficiente de sequências de codificação. Estes sinais incluem o códon de iniciação ATG ou sequências adjacentes. Sinais de controle de tradução exógenos, incluindo o códon de iniciação ATG, podem precisar ser fornecidos. Um versado na técnica seria prontamente capaz de determinar isso e fornecer os sinais necessários. É sabido que o códon de iniciação deve estar "dentro do quadro" com o quadro de leitura da sequência de codificação desejada para garantir a tradução de toda a inserção. Os sinais de controle de tradução exógenos e os códons de iniciação podem ser naturais ou sintéticos. A eficiência da expressão pode ser aumentada pela inclusão de elementos intensificadores de transcrição apropriados.

[0129]Em certas modalidades, os elementos de locais internos de entrada de ribossomo (IRES) são usados para criar mensagens multigênicas ou policistrônicas. Elementos IRES são capazes de ignorar o modelo de digitalização ribossomo da tradução dependente 5' Cap metilado e começar a tradução em locais internos (Pelletier e Sonenberg, 1988). Elementos IRES de dois membros da família dos picornavírus (poliomielite e encefalomiocardite) foram descritos (Pelletier e Sonenberg, 1988), bem como um IRES de uma mensagem de mamífero (Macejak e Sarnow, 1991). Os elementos IRES podem ser vinculados a quadros de leitura abertos heterólogos. Vários quadros de leitura abertos podem ser transcritos juntos, cada um separado por um IRES, criando mensagens policistrônicas. Em virtude do elemento IRES, cada quadro de leitura aberto é acessível aos ribossomos para uma tradução eficiente. Múltiplos genes podem ser expressos eficientemente usando um único promotor/intensificador para transcrever uma única mensagem (ver Patentes nºs US 5.925.565 e 5.935.819, cada uma aqui incorporada por referência).

[0130]Além disso, certos elementos de sequência 2A podem ser utilizados para criar ou coexpressão de genes de programação nos construtos fornecidas na presente revelação. Por exemplo, sequências de clivagem podem ser usadas para coexpressar genes ligando quadros de leitura abertos para formar um único cistron. Uma sequência de clivagem exemplar é o F2A (vírus da febre aftosa 2A) ou uma sequência "do tipo 2A" (por exemplo, vírus Thosa asigna 2A; T2A). Em modalidades particulares, um peptídeo de clivagem F2A é usado para ligar a expressão dos genes no construto de múltiplas linhagens.

e.Origens da replicação

[0131]Para propagar um vetor em uma célula hospedeira, ele pode conter uma ou mais origens dos locais de replicação (geralmente denominados "ori"), por exemplo, uma sequência de ácidos nucleicos correspondente ao oriP do EBV, conforme descrito acima, ou um oriP geneticamente modificado com uma função semelhante ou elevada na programação, que é uma sequência específica de ácido nucleico na qual a replicação é iniciada. Alternativamente, pode ser empregada uma origem de replicação de outro vírus de replicação extracromossômica, como descrito acima, ou uma sequência de replicação autônoma (ARS).

f.Seleção e marcadores selecionáveis

[0132]Em certas modalidades, as células que contêm um construto de ácido nucleico podem ser identificadas *in vitro* ou *in vivo*, incluindo um marcador no vetor de expressão. Tais marcadores conferem uma alteração identificável à célula, permitindo fácil identificação de células contendo o vetor de expressão. Geralmente, um marcador de seleção é aquele que confere uma propriedade que permite a seleção. Um marcador de seleção positivo é aquele em que a presença do marcador permite sua seleção, enquanto um marcador de seleção negativo é aquele em que sua presença impede sua seleção.

Um exemplo de um marcador de seleção positiva é um marcador de resistência a fármacos.

[0133] Normalmente, a inclusão de um marcador de seleção de drogas auxilia na clonagem e identificação de transformantes, por exemplo, genes que conferem resistência à neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol são marcadores de seleção úteis. Além dos marcadores que conferem um fenótipo que permite a discriminação de transformantes com base na implementação de condições, também são contemplados outros tipos de marcadores, incluindo marcadores rastreáveis como GFP, cuja base é a análise colorimétrica. Alternativamente, podem ser utilizadas enzimas rastreáveis como marcadores de seleção negativa, tais como o vírus do herpes simplex timidina quinase (tk) ou cloranfenicol acetiltransferase (CAT). Um versado na técnica também saberia empregar marcadores imunológicos, possivelmente em conjunto com a análise FACS. Não se acredita que o marcador utilizado seja importante, desde que seja capaz de ser expresso simultaneamente com o ácido nucleico que codifica um produto genético. Outros exemplos de seleção e marcadores rastreáveis são bem conhecidos de um versado na técnica.

[0134] A introdução de um ácido nucleico, como DNA ou RNA, nas células-tronco pluripotentes a serem programadas para células precursoras hematopoiéticas com a revelação atual pode usar quaisquer métodos adequados para a entrega de ácido nucleico para a transformação de uma célula, como descrito aqui ou como seria conhecido por um versado na técnica. Tais métodos incluem, mas não estão limitados a, entrega direta de DNA, como por transfecção *ex vivo* (Wilson *et al.*, 1989, Nabel *et al.*, 1989), por injeção (Patentes nºs US 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 e 5.580.859, cada uma aqui incorporada por referência), incluindo microinjeção (Harland e Weintraub, 1985; Patente nº US 5.789.215,

aqui incorporada por referência); por eletroporação (Patente nº US 5.384.253, incorporada aqui por referência; Tur-Kaspa *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984); por precipitação com fosfato de cálcio (Graham e Van Der Eb, 1973; Chen e Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); usando DEAE-dextrano seguido de polietileno glicol (Gopal, 1985); por carga sônica direta (Fechheimer *et al.*, 1987); por transfecção mediada por lipossomas (Nicolau e Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991) e mediada por receptores transfecção (Wu e Wu, 1987; Wu e Wu, 1988); por bombardeamento de microprojetos (pedidos PCT nºs WO 94/09699 e 95/06128; Patentes US 5.610.042; 5.322.783 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 e 5.538.880, e cada um aqui incorporado por referência); por agitação com fibras de carboneto de silício (Kaeppler *et al.*, 1990; Patentes nºs US 5.302.523 e 5.464.765, cada uma aqui incorporada por referência); por transformação mediada por *Agrobacterium* (Patentes US 5.591.616 e 5.563.055, cada uma aqui incorporada por referência); por captação de DNA mediada por dessecação/inibição (Potrykus *et al.*, 1985) e qualquer combinação de tais métodos. Através da aplicação de técnicas como essas, organela (ou organelas), célula (ou células), tecido (ou tecidos) ou organismo (ou organismos) podem ser transformados de maneira estável ou transitória.

C. Correspondência de haplótipos do MHC

[0135]O principal complexo de histocompatibilidade (MHC) é a principal causa de rejeição imunológica de transplantes de órgãos alogênicos. Existem três principais haplótipos de MHC de classe I (A, B e C) e três principais haplótipos de MHC de classe II (DR, DP e DQ). Os loci HLA são altamente polimórficos e estão distribuídos por 4 Mb no cromossomo 6. A capacidade de haplotipar os genes HLA na região é clinicamente importante, pois esta região está associada a doenças autoimunes e infecciosas e a compatibilidade dos haplótipos HLA entre doador e receptor pode influenciar os

resultados clínicos do transplante. Os HLAs correspondentes ao MHC classe I apresentam peptídeos de dentro da célula e os HLAs correspondentes ao MHC classe II apresentam antígenos de fora da célula para linfócitos T. A incompatibilidade de haplótipos de MHC entre o enxerto e o hospedeiro desencadeia uma resposta imunológica contra o enxerto e leva à sua rejeição. Assim, um paciente pode ser tratado com um imunossupressor para evitar a rejeição. Linhas de células-tronco compatíveis com HLA podem superar o risco de rejeição imunológica.

[0136]Devido à importância do HLA no transplante, os loci do HLA são geralmente tipificados por sorologia e PCR para identificar pares favoráveis de doador-receptor. A detecção sorológica de antígenos HLA de classe I e II pode ser realizada usando um teste de linfocitotoxicidade mediada por complemento com linfócitos T ou B purificados. Este procedimento é predominantemente usado para combinar os loci HLA-A e -B. A tipagem de tecidos com base molecular geralmente pode ser mais precisa que o teste sorológico. Métodos moleculares de baixa resolução, como os métodos SSOP (sondas oligonucleotídicas específicas da sequência), nos quais os produtos de PCR são testados contra uma série de sondas oligonucleotídicas, podem ser usados para identificar antígenos HLA, e atualmente esses métodos são os métodos mais comuns usados para Classe II- Digitação HLA. Técnicas de alta resolução, como métodos SSP (iniciador específico de sequência) que utilizam iniciadores específicos de alelos para amplificação por PCR, podem identificar alelos específicos de MHC.

[0137]A compatibilidade do MHC entre um doador e um receptor aumenta significativamente se as células do doador forem HLA homozigotas, ou seja, contêm alelos idênticos para cada proteína apresentadora de antígeno. A maioria dos indivíduos é heterozigótica para os genes MHC de classe I e II, mas certos indivíduos são homozigotos para esses genes. Esses indivíduos homozigotos podem servir como super

doadores e os enxertos gerados a partir de suas células podem ser transplantados em todos os indivíduos homozigotos ou heterozigotos para esse haplótipo. Além disso, se as células doadoras homozigotas tiverem um haplótipo encontrado em alta frequência em uma população, essas células poderão ter aplicação em terapias de transplante para um grande número de indivíduos.

[0138]Por conseguinte, em algumas modalidades, as PSCs dos presentes métodos podem ser produzidas a partir de células somáticas do indivíduo a ser tratado, ou outro indivíduo com o mesmo ou substancialmente o mesmo tipo de HLA que o do paciente. Em um caso, os principais HLAs (por exemplo, os três principais locais de HLA-A, HLA-B e HLA-DR) do doador são idênticos aos principais HLAs do destinatário. Em alguns casos, a célula somática não é ou pode ser um super doador; assim, unidades derivadas de um doador homozigótico do MHC de super podem ser usadas para gerar HPCs e, subsequentemente, as células imunitárias, tais como as células T. Assim, as células efetoras imunes derivadas de um super doador podem ser transplantadas em indivíduos que são homozigotos ou heterozigotos para esse haplótipo. Por exemplo, as células imunológicas podem ser homozigotas em dois alelos do HLA, como o HLA-A e o HLA-B. Como tal, as células imunológicas produzidas a partir de super doadores podem ser usadas nos métodos aqui divulgados, para produzir células imunológicas que podem potencialmente "corresponder" a um grande número de receptores em potencial.

D.Receptores antigênicos geneticamente modificados

[0139]As PSCs podem ser geneticamente modificadas para expressar receptores de antígenos, como TCRs ou CARs modificados. Por exemplo, as PSCs (por exemplo, autólogos ou alogênicos) são modificados para expressar um TCR ou CAR possuindo especificidade antigênica para um antígeno de câncer.

[0140]Métodos de modificação adequados são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Sambrook e Ausubel, *supra*. Por exemplo, as células podem ser transduzidas para expressar um TCR com especificidade antigênica para um antígeno de câncer usando técnicas de transdução descritas em Heemskerk *et al. Hum Gene Ther.* 19: 496-510 (2008) e Johnson *et al. Blood* 114: 535-46 (2009).

[0141]A eletroporação do RNA que codifica para as cadeias TCR α e β (ou γ e δ) de comprimento total pode ser usada como alternativa para superar problemas de longo prazo com a autorreatividade causada pelo emparelhamento de cadeias TCR retrovirais transduzidas e endógenas. Mesmo que esse emparelhamento alternativo ocorra na estratégia de transfecção transitória, as células T autorreativas possivelmente geradas perderão essa autorreatividade após algum tempo, porque as cadeias α e β do TCR introduzidas são expressas apenas transitoriamente. Quando a expressão de cadeias α e β do TCR introduzida é diminuída, restam apenas células T autólogas normais. Este não é o caso quando cadeias de TCR de comprimento total são introduzidas por transdução retroviral estável, que nunca perde as cadeias de TCR introduzidas, causando uma autorreatividade constantemente presente no paciente.

[0142]Em algumas modalidades, as células compreendem um ou mais ácidos nucleicos introduzidos por engenharia genética que codificam um ou mais receptores de antígeno e produtos geneticamente modificados de tais ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, os ácidos nucléicos são heterólogos, isto é, normalmente não estão presentes em uma célula ou amostra obtida da célula, como uma obtida de outro organismo ou célula, que por exemplo, normalmente não é encontrado na célula que está sendo projetada e/ou um organismo do qual essa célula é derivada. Em algumas modalidades, os ácidos nucléicos não ocorrem naturalmente, como um ácido úrico não encontrado na natureza (por exemplo, quimérico).

[0143]Em algumas modalidades, o CAR contém um domínio de reconhecimento de antígeno extracelular que se liga especificamente a um antígeno. Em algumas modalidades, o antígeno é uma proteína expressa na superfície das células. Em algumas modalidades, o CAR é um CAR do tipo TCR e o antígeno é um antígeno peptídico processado, como um antígeno peptídico de uma proteína intracelular, que, como um TCR, é reconhecido na superfície celular no contexto de uma grande histocompatibilidade molécula complexa (MHC).

[0144]Exemplos de receptores de antígeno, incluindo CARs e TCRs recombinantes, bem como métodos para projetar e introduzir os receptores nas células, incluem aqueles descritos, por exemplo, nos números de publicação de pedido de patente internacional WO200014257, WO2013126726, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, números de publicação do pedido de patente US US2002131960, US2013287748, US20130149337, Patentes n^{os}: US 6.451.995, 7.446.190, 8.252.592, 8.339.645, 8.398.282, 7.446.179, 6.410.319, 8.054.995, 7.346, 7.354, 7.346, 8.054, 7.346, 8.054, 7.346, 7.354, 7.346, 7.351, e pedido de patente EP número EP2537416, e/ou os descritos por Sadelain *et al.*, *Cancer Discov.* Abril de 2013; 3 (4): 388-398; Davila *et al.* (2013) *PLoS ONE* 8 (4): e61338; Turtle *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, outubro de 2012; 24 (5): 633-39; Wu *et al.*, *Cancer*, 18 de março de 2012 (2): 160-75. Em alguns aspectos, os receptores de antígeno geneticamente modificados incluem um CAR como descrito na Patente n^o: US 7.446.190 e aqueles descritos na Publicação de Pedido de Patente Internacional n^o: WO/2014055668 A1.

1.Receptores de Antígenos Quiméricos

[0145]Em algumas modalidades, o CAR compreende: a) um domínio de sinalização intracelular, b) um domínio transmembranar e c) um domínio extracelular compreendendo uma região de ligação ao antígeno.

[0146]Em algumas modalidades, os receptores de antígeno manipulados incluem CARs, incluindo CARs ativadores ou estimuladores, CARs coestimulatórios (ver WO2014/055668) e/ou CARs inibitórios (iCARs, ver Fedorov *et al.*, 2013). Os CARs geralmente incluem um domínio de ligação ao antígeno extracelular (ou ligante) ligado a um ou mais componentes de sinalização intracelular, em alguns aspectos via ligantes e/ou domínio (ou domínios) transmembranar. Tais moléculas normalmente imitam ou aproximam um sinal através de um receptor de antígeno natural, um sinal através desse receptor em combinação com um receptor coestimulatório e/ou um sinal através de um receptor coestimulatório sozinho.

[0147]Certas modalidades da presente revelação dizem respeito ao uso de ácidos nucleicos, incluindo ácidos nucléicos que codificam um polipeptídeo CAR específico para antígeno, incluindo um CAR que foi humanizado para reduzir a imunogenicidade (hCAR), compreendendo um domínio de sinalização intracelular, um domínio transmembranar e um domínio extracelular compreendendo um ou mais motivos de sinalização. Em certas modalidades, o CAR pode reconhecer um epítipo que compreende o espaço compartilhado entre um ou mais antígenos. Em certas modalidades, a região de ligação pode compreender regiões determinantes complementares de um anticorpo monoclonal, regiões variáveis de um anticorpo monoclonal e/ou seus fragmentos de ligação ao antígeno. Em outra modalidade, essa especificidade é derivada de um peptídeo (por exemplo, citocina) que se liga a um receptor.

[0148]Está contemplado que os ácidos nucleicos do CAR humano podem ser genes humanos utilizados para melhorar a imunoterapia celular para pacientes humanos.

Em uma modalidade específica, a invenção inclui um cDNA CAR completo ou uma região de codificação. As regiões ou o domínio de ligação ao antígeno podem compreender um fragmento das cadeias VH e VL de um fragmento variável de cadeia única (scFv) derivado de um anticorpo monoclonal humano específico, como os descritos na Patente US 7.109.304, aqui incorporada por referência. O fragmento também pode ser qualquer número de diferentes domínios de ligação ao antígeno de um anticorpo humano específico ao antígeno. Em uma modalidade mais específica, o fragmento é um scFv específico de antígeno codificado por uma sequência que é otimizada para uso de códon humano para expressão em células humanas.

[0149]O arranjo pode ser multimérico, como um diacorpo ou multímeros. Os multímeros são provavelmente formados pelo emparelhamento cruzado da porção variável das cadeias leve e pesada em um diacorpo. A porção de dobradiça do construto pode ter várias alternativas, de ser totalmente excluída, a manutenção da primeira cisteína, a uma substituição de prolina em vez de serina, a ser truncada até a primeira cisteína. A parte Fc pode ser excluída. Qualquer proteína que seja estável e/ou dimerize pode servir a esse propósito. Pode-se usar apenas um dos domínios Fc, por exemplo, o domínio CH2 ou CH3 da imunoglobulina humana. Pode-se também usar a região de dobradiça, CH2 e CH3 de uma imunoglobulina humana que foi modificada para melhorar a dimerização. Pode-se também usar apenas a parte da dobradiça de uma imunoglobulina. Também se pode usar porções de CD8alfa.

[0150]Em algumas modalidades, o ácido nucleico do CAR compreende uma sequência que codifica outros receptores coestimuladores, como um domínio transmembranar e um domínio de sinalização intracelular CD28 modificado. Outros receptores coestimuladores incluem, mas não estão limitados a, um ou mais CD28, CD27, OX-40 (CD134), DAP10 e 4-1BB (CD137). Além de um sinal primário iniciado por CD3ζ,

um sinal adicional fornecido por um receptor coestimulatório humano inserido em um CAR humano é importante para a ativação completa das células NK e pode ajudar a melhorar a persistência *in vivo* e o sucesso terapêutico da imunoterapia adotiva.

[0151]Em algumas modalidades, o CAR é construído com uma especificidade para um antígeno específico (ou marcador ou ligante), como um antígeno expresso em um tipo de célula específico a ser alvo de terapia adotiva, por exemplo, um marcador de câncer e/ou um antígeno destinado a induzir uma resposta de amortecimento, como um antígeno expresso em um tipo de célula normal ou não doente. Assim, o CAR inclui tipicamente em sua porção extracelular uma ou mais moléculas de ligação ao antígeno, como um ou mais fragmentos, domínios ou porções de ligação ao antígeno, ou um ou mais domínios variáveis de anticorpo e/ou moléculas de anticorpo. Em algumas modalidades, o CAR inclui uma porção ou partes de ligação ao antígeno de uma molécula de anticorpo, como um fragmento de anticorpo de cadeia única (scFv) derivado das cadeias variável pesada (VH) e variável leve (VL) de um anticorpo monoclonal (mAb).

[0152]Em certas modalidades do receptor de antígeno quimérico, a porção específica do antígeno do receptor (que pode ser referida como um domínio extracelular compreendendo uma região de ligação ao antígeno) compreende um antígeno associado ao tumor ou um domínio de ligação ao antígeno específico do patógeno. Os antígenos incluem antígenos de carboidratos reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões, como a dectina-1. Um antígeno associado a um tumor pode ser de qualquer tipo, desde que seja expresso na superfície celular das células tumorais. Modalidades exemplificativas de antígenos associados a tumores incluem CD19, CD20, antígeno carcinoembrionário c, alfafetoproteína, CA-125, MUC-1, CD56, EGFR, c-Met, AKT, Her2, Her3, antígeno tumoral epitelial, antígeno associado a melanoma, p53 mutado, ras mutado, e assim por diante.

[0153]A sequência do quadro de leitura aberto que codifica o receptor quimérico pode ser obtida a partir de uma fonte de DNA genômico, uma fonte de cDNA ou pode ser sintetizada (por exemplo, por meio de PCR) ou combinações dos mesmos. Dependendo do tamanho do DNA genômico e do número de íntrons, pode ser desejável usar cDNA ou uma combinação dos mesmos, pois é descoberto que os íntrons estabilizam o mRNA. Além disso, pode ser ainda mais vantajoso usar regiões não codificantes endógenas ou exógenas para estabilizar o mRNA.

[0154]Está contemplado que o construto quimérico possa ser introduzido nas células imunológicas como DNA nu ou em um vetor adequado. Os métodos de transfecção estável de células por eletroporação usando DNA nu são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Patente 6.410.319. DNA nu geralmente se refere ao DNA que codifica um receptor quimérico contido em um vetor de expressão plasmídica em orientação adequada para expressão.

[0155]Alternativamente, um vetor viral (por exemplo, um vetor retroviral, vetor adenoviral, vetor viral adeno-associado ou vetor lentiviral) pode ser usado para introduzir o construto quimérico nas células imunológicas. Os vetores adequados para uso de acordo com o método da presente revelação não são replicantes nas células imunológicas. Sabe-se um grande número de vetores baseados em vírus, em que o número de cópias do vírus mantido na célula é baixo o suficiente para manter a viabilidade da célula, como, por exemplo, vetores baseados em HIV, SV40, EBV, HSV ou BPV.

[0156]Em alguns aspectos, o componente de ligação ou reconhecimento específico ao antígeno está ligado a um ou mais domínios de sinalização transmembranar e intracelular. Em algumas modalidades, o CAR inclui um domínio transmembranar fundido ao domínio extracelular do CAR. Em uma modalidade, o domínio transmembranar

que naturalmente está associado a um dos domínios no CAR é usado. Em alguns casos, o domínio transmembranar é selecionado ou modificado por substituição de aminoácidos para evitar a ligação de tais domínios aos domínios transmembranares da mesma ou de diferentes proteínas da membrana superficial para minimizar as interações com outros membros do complexo receptor.

[0157]O domínio transmembranar em algumas modalidades é derivado de uma fonte natural ou de uma fonte sintética. Onde a fonte é natural, em alguns aspectos, o domínio é derivado de qualquer proteína ligada à membrana ou transmembrana. As regiões transmembranares incluem aquelas derivadas de (isto é, compreendem pelo menos as regiões transmembranares da) cadeia alfa, beta ou zeta do receptor de células T, CD28, CD3 zeta, CD3 épsilon, CD3 gama, CD3 delta, CD45, Moléculas CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357, NKG2D e moléculas DAP. Alternativamente, o domínio transmembranar em algumas modalidades é sintético. Em alguns aspectos, o domínio transmembranar sintético compreende resíduos predominantemente hidrofóbicos, como leucina e valina. Em alguns aspectos, um triplete de fenilalanina, triptofano e valina será encontrado em cada extremidade de um domínio transmembranar sintético.

[0158]Em certas modalidades, as tecnologias de plataforma aqui divulgadas para modificar geneticamente células imunológicas, como células NK, compreendem (i) transferência de genes não virais usando um dispositivo de eletroporação (por exemplo, um nucleofector), (ii) CARs que sinalizam através de endodomínios (por exemplo, CD28/CD3- ζ , CD137/CD3- ζ ou outras combinações), (iii) CARs com comprimentos variáveis de domínios extracelulares que conectam o domínio de reconhecimento de antígeno à superfície celular e, em alguns casos, (iv) antígeno artificial apresentar células

(aAPC) derivadas de K562 para poder expandir robusta e numericamente as células imunológicas ao CAR + (Singh *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011).

2.Receptor de células T (TCR)

[0159]Em algumas modalidades, os receptores de antígeno geneticamente modificados incluem TCRs recombinantes e/ou TCRs clonados a partir de células T de ocorrência natural. Um "receptor de célula T" ou "TCR" refere-se a uma molécula que contém as cadeias variáveis α e β (também conhecidas como TCR α e TCR β , respectivamente) ou cadeias variáveis γ e δ (também conhecidas como TCR γ e TCR δ , respectivamente) e que é capaz de se ligar especificamente a um peptídeo antigênico ligado a um receptor MHC. Em algumas modalidades, o TCR está na forma $\alpha\beta$.

[0160]Tipicamente, os TCRs que existem nas formas $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ são geralmente estruturalmente semelhantes, mas as células T que as expressam podem ter locais ou funções anatômicas distintas. Um TCR pode ser encontrado na superfície de uma célula ou na forma solúvel. Geralmente, um TCR é encontrado na superfície das células T (ou linfócitos T), onde geralmente é responsável pelo reconhecimento de antígenos ligados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Em algumas modalidades, um TCR também pode conter um domínio constante, um domínio transmembranar e/ou uma cauda citoplasmática curta (ver, por exemplo, Janeway *et al.*, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3^a Ed., Current Biology Publications, página 433, 1997). Por exemplo, em alguns aspectos, cada cadeia do TCR pode possuir um domínio variável da imunoglobulina N-terminal, um domínio constante da imunoglobulina, uma região transmembranar e uma cauda citoplasmática curta na extremidade C-terminal. Em algumas modalidades, um TCR está associado a proteínas invariantes do complexo CD3 envolvidas na mediação da transdução de sinal. Salvo indicação em contrário, o termo "TCR" deve ser entendido como abrangendo fragmentos

funcionais de TCR. O termo também abrange TCRs intactos ou completos, incluindo TCRs na forma $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$.

[0161]Assim, para fins deste documento, a referência a um TCR inclui qualquer TCR ou fragmento funcional, como uma porção de ligação ao antígeno de um TCR que se liga a um peptídeo antigênico específico ligado a uma molécula de MHC, isto é, Complexo MHC-peptídeo. Uma "porção de ligação ao antígeno" ou um fragmento de ligação ao antígeno "de um TCR, que pode ser usado de forma intercambiável, refere-se a uma molécula que contém uma porção dos domínios estruturais de um TCR, mas que liga o antígeno (por exemplo, complexo MHC- peptídeo) ao qual o TCR completo se liga. Em alguns casos, uma porção de ligação ao antígeno contém os domínios variáveis de um TCR, como a cadeia α variável e a cadeia β variável de um TCR, suficientes para formar um local de ligação para a ligação a um complexo específico de peptídeo MHC, como geralmente onde cada cadeia contém três regiões determinantes de complementaridade.

[0162]Em algumas modalidades, os domínios variáveis das cadeias de TCR se associam para formar alças ou regiões determinantes de complementaridade (CDRs) análogas às imunoglobulinas, que conferem reconhecimento de antígeno e determinam a especificidade do peptídeo, formando o local de ligação da molécula do TCR e determinando a especificidade do peptídeo. Tipicamente, como as imunoglobulinas, as CDRs são separadas por regiões estruturais (FRs) (ver, por exemplo, Jores *et al.*, 1990; Chothia *et al.*, 1988; Lefranc *et al.*, 2003). Em algumas modalidades, a CDR3 é a principal CDR responsável pelo reconhecimento do antígeno processado, embora também tenha demonstrado que a CDR1 da cadeia alfa interage com a parte do terminal N do peptídeo antigênico, enquanto a CDR1 da cadeia beta interage com o terminal C parte do peptídeo. Pensa-se que o CDR2 reconheça a molécula do MHC. Em algumas

modalidades, a região variável da cadeia β pode conter uma região adicional de hipervariabilidade (HV4).

[0163]Em algumas modalidades, as cadeias de TCR contêm um domínio constante. Por exemplo, como imunoglobulinas, a porção extra celular das cadeias de TCR (por exemplo, cadeia α , cadeia β) pode conter dois domínios de imunoglobulina, um domínio variável (por exemplo, V_α ou V_β ; tipicamente os aminoácidos 1 a 116 em Kabat numeração de Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services", Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5ª ed.) no N-terminal, e um domínio constante (ex., uma cadeia de domínio constante ou um C, tipicamente aminoácidos 117-259 baseado em Kabat, de cadeia β domínio constante ou C_β , tipicamente, os aminoácidos 117 a 295 com base em Kabat) adjacentes à membrana celular. Por exemplo, em alguns casos, a porção extracelular do TCR formada pelas duas cadeias contém dois domínios constantes proximais à membrana e dois domínios variáveis distantes à membrana contendo CDRs. O domínio constante do domínio TCR contém sequências de conexão curtas nas quais um resíduo de cisteína forma uma ligação dissulfeto, fazendo um elo entre as duas cadeias. Em algumas modalidades, um TCR pode ter um resíduo de cisteína adicional em cada uma das cadeias α e β , de modo que o TCR contenha duas ligações dissulfeto nos domínios constantes.

[0164]Em algumas modalidades, as cadeias de TCR podem conter um domínio transmembranar. Em algumas modalidades, o domínio transmembranar é carregado positivamente. Em alguns casos, as cadeias de TCR contêm uma cauda citoplasmática. Em alguns casos, a estrutura permite que o TCR se associe a outras moléculas como o CD3. Por exemplo, um TCR contendo domínios constantes com uma

região transmembranar pode ancorar a proteína na membrana celular e associar-se a subunidades invariantes do aparelho ou complexo de sinalização CD3.

[0165] Geralmente, o CD3 é um complexo multiproteico que pode possuir três cadeias distintas (γ , δ e ϵ) em mamíferos e na cadeia. Por exemplo, em mamíferos, o complexo pode conter uma cadeia CD3 γ , uma cadeia CD3 δ , duas cadeias CD3 ϵ , e um homodímero de cadeias CD3 ζ . O CD3 γ , CD3 δ e cadeias CD3 ϵ são proteínas da superfície celular altamente relacionadas da superfamília de imunoglobulina contendo um único domínio de imunoglobulina. As regiões transmembranares do CD3 γ , CD3 δ e cadeias CD3 ϵ são negativamente carregadas, o que é uma característica que permite que estas cadeias se associem com as cadeias de receptor de célula T carregadas positivamente. As caudas intracelulares do CD3 γ , CD3 δ e cadeias CD3 ϵ contêm cada um um único motivo conservado conhecido como um motivo de ativação baseado imunorreceptor de tirosina ou ITAM, ao passo que cada cadeia tem três CD3 ζ . Geralmente, os ITAMs estão envolvidos na capacidade de sinalização do complexo TCR. Essas moléculas acessórias têm regiões transmembranares com carga negativa e desempenham um papel na propagação do sinal do TCR para a célula. As cadeias CD3 e ζ , juntamente com o TCR, formam o que é conhecido como complexo receptor de células T.

[0166] Em algumas modalidades, o TCR pode ser um heterodímero de duas cadeias α e β (ou opcionalmente γ e δ) ou pode ser um construto de TCR de cadeia única. Em algumas modalidades, o TCR é um heterodímero c que contém duas cadeias separadas (cadeias α e β ou cadeias γ e δ) que estão ligadas, como por uma ligação dissulfeto ou ligações dissulfeto. Em algumas modalidades, um TCR para um antígeno-alvo (por exemplo, um antígeno de câncer) é identificado e introduzido nas células. Em algumas modalidades, o ácido nucleico que codifica o TCR pode ser obtido a partir de uma variedade de fontes, como por amplificação por reação em cadeia da polimerase

(PCR) de sequências de DNA do TCR disponíveis publicamente. Em algumas modalidades, o TCR é obtido a partir de uma fonte biológica, como células de uma célula T (por exemplo, célula T citotóxica), hibridomas de células T ou outras fontes publicamente disponíveis. Em algumas modalidades, as células T podem ser obtidas a partir de células isoladas *in vivo*. Em algumas modalidades, um clone de células T de alta afinidade pode ser isolado de um paciente, e o TCR é isolado. Em algumas modalidades, as células T podem ser um hibridoma ou clone de célula T cultivado. Em algumas modalidades, o clone TCR para um antígeno-alvo foi gerado em camundongos transgênicos manipulados com genes do sistema imunológico humano (por exemplo, o sistema de antígeno leucocitário humano, ou HLA). Em algumas modalidades, a exibição de fagos é usada para isolar TCRs contra um antígeno-alvo. Em algumas modalidades, o TCR ou sua porção de ligação ao antígeno pode ser gerado sinteticamente a partir do conhecimento da sequência do TCR.

3.Células apresentadoras de antígenos

[0167]As APCs, que incluem macrófagos, linfócitos B e células dendríticas, são diferenciadas pela expressão de uma molécula de MHC específica. As APCs internalizam o antígeno e reexpressam uma parte desse antígeno, juntamente com a molécula do MHC em sua membrana celular externa. O MHC é um grande complexo genético com múltiplos loci. Os loci do MHC codificam duas classes principais de moléculas de membrana do MHC, denominadas MHCs de classe I e II. Os linfócitos T auxiliares reconhecem geralmente antígenos associados com moléculas MHC de classe II, e os linfócitos T citotóxicos reconhecem antígenos associados às moléculas MHC de classe I. Em humanos, o MHC é chamado de complexo HLA e, em camundongos, o complexo H-2.

[0168]Em alguns casos, as aAPCs são úteis na preparação de composições terapêuticas e produtos de terapia celular das modalidades. Para obter orientações gerais

sobre a preparação e uso de sistemas de apresentação de antígenos, consulte, por exemplo, as patentes nºs US 6.225.042, 6.355.479, 6.362.001 e 6.790.662.

[0169]Os sistemas aAPC podem compreender pelo menos uma molécula de assistência exógena. Qualquer número e combinação adequados de moléculas auxiliares podem ser empregados. A molécula auxiliar pode ser selecionada a partir de moléculas auxiliares, tais como moléculas coestimuladoras e moléculas de adesão. Moléculas coestimuladoras exemplares incluem CD86, CD64 (FcγRI), ligando 41BB e IL-21. As moléculas de adesão podem incluir glicoproteínas de ligação a carboidratos, como selectinas, glicoproteínas de ligação transmembranar, como integrinas, proteínas dependentes de cálcio, como caderinas, e proteínas da superfamília de imunoglobulina transmembrana de passagem única (Ig), como moléculas de adesão intercelular (ICAMs), que promovem, por exemplo, contato célula a célula ou célula a matriz. Moléculas de adesão exemplares incluem LFA-3 e ICAMs, como ICAM-1. Técnicas, métodos e reagentes úteis para seleção, clonagem, preparação e expressão de moléculas auxiliares exemplares, incluindo moléculas coestimuladoras e moléculas de adesão, são exemplificadas em, por exemplo, as patentes nºs US 6.225.042, 6.355.479 e 6.362.001.

4. Antígenos

[0170]Entre os antígenos direcionados pelos receptores de antígeno geneticamente modificados estão aqueles expressos no contexto de uma doença, condição ou tipo de célula a ser direcionada por meio da terapia celular adotiva. Entre as doenças e condições estão doenças e distúrbios proliferativos, neoplásicos e malignos, incluindo câncer e tumores, incluindo câncer hematológico, câncer do sistema imunológico, como linfomas, leucemias e/ou mielomas, como B, T e leucemias mieloide, linfomas e mielomas múltiplos. Em algumas modalidades, o antígeno é seletivamente expresso ou superexpressado nas células da doença ou condição, por exemplo, o tumor

ou células patogênicas, em comparação com células ou tecidos normais ou não direcionados. Em outras modalidades, o antígeno é expresso em células normais e/ou é expresso nas células manipuladas.

[0171]Qualquer antígeno adequado pode ser útil no presente método. Antígenos exemplificadores incluem, mas não estão limitados a, moléculas antigênicas de agentes infecciosos, auto-antígenos, antígenos associados a tumores/câncer e neoantígenos de tumores (Linnemann *et al.*, 2015).

[0172]Os antígenos associados ao tumor podem ser derivados de câncer de próstata, mama, colorretal, pulmão, pancreático, renal, mesotelioma, ovário ou melanoma. Antígenos associados a tumores exemplares ou antígenos derivados de células tumorais incluem MAGE 1, 3 e MAGE 4 (ou outros antígenos MAGE); PRAME; BAGE; RAGE, Lage (também conhecido como NY-ESO-1); SÁBIO; e HAGE ou GAGE. Estes exemplos não limitativos de antígenos tumorais são expressos em uma ampla gama de tipos de tumores, como melanoma, carcinoma de pulmão, sarcoma e carcinoma de bexiga. Ver, por exemplo, Patente nº US 6.544.518. Os antígenos associados ao tumor de câncer de próstata incluem, por exemplo, antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), antígeno específico da próstata (PSA), fosfatos de ácido prostático, NKX3.1 e antígeno epitelial da próstata com seis transmembranas (STEAP).

[0173]Outros antígenos associados a tumores incluem Plu-1, HASH-1, HasH-2, Cripto e Criptina. Além disso, um antígeno tumoral pode ser um hormônio auto peptídico, como o hormônio liberador de hormônio gonadotrofina de comprimento total (GnRH), um peptídeo curto de 10 aminoácidos, útil no tratamento de muitos cânceres.

[0174]Os antígenos tumorais incluem antígenos tumorais derivados de cânceres que são caracterizados pela expressão de antígeno associado ao tumor, como a expressão de HER-2/neu. Os antígenos de interesse associados ao tumor incluem

antígenos de tumor específicos para a linhagem, como os antígenos da linhagem melanócito-melanoma MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, tirosinase e proteína relacionada à tirosinase. Antígenos ilustrativos associados a tumores incluem, mas não estão limitados a, antígenos tumorais derivados de ou compreendendo qualquer um ou mais de, p53, Ras, c-Myc, serina/treonina quinases citoplasmáticas (por exemplo, A-Raf, B-Raf e C-Raf, cinases dependentes de ciclina), MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, tirosinase, TRP-1, TRP -2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, Fosfoinositida 3-cinases (PI3Ks), receptores TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, antígeno tumoral de Wilms (WT1), AFP, -catenina/m, Caspase-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM -1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, Anexo II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, BCR-ABL, fator regulatório de interferon 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR, transdutor de sinal de cálcio associado a tumor 1 (TACSTD1) TACSTD2, tirosina-quinases receptoras (por exemplo, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (em particular, EGFRvIII), receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR)), tirosina quinases citoplasmáticas (por exemplo, família src, família syk-ZAP70), ligadas a integrinas quinase (ILK), transdutores de sinal e ativadores da transcrição STAT3, STATS e STATE, fatores induzíveis à hipóxia (por exemplo, HIF-1 e HIF-2), fator nuclear-Kappa B (NF-B), receptores Notch (por exemplo, Notch1 -4), c-Met, alvos em mamíferos de rapamicina (mTOR), WNT, quinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) e suas subunidades reguladoras, PMSA, PR-3, MDM2, mesotelina, carcinoma de células renais-5T4, SM22-alfa, anidrases carbônicas I (CAI) e IX (CAIX) (também conhecido como G250), STEAD, TEL/AML1, GD2, proteinase

3, hTERT, pontos de interrupção de translocação do sarcoma, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (gene de fusão EPR TM2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de androgênio, ciclina B1, ácido polissialílico, MYCN, RhoC, GD3, fucosil GM1, mesoteliano, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, RGSs, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, proteína do esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, legumaina, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, antígeno relacionado ao Fos 1, CBX2, CLDN6, SPANX, TPTE, ACTL8, ANKRD30A, CDKN2A, MAD2L1, CTAG1B, SUNC1, LRRN1 e idiotipo.

[0175]Os antígenos podem incluir regiões epitópicas ou peptídeos epitópicos derivados de genes mutados em células tumorais ou de genes transcritos em diferentes níveis nas células tumorais em comparação com células normais, como enzima telomerase, survivina, mesotelina, ras mutado, rearranjo bcr/abl, Her2/neu, p53 mutado ou de tipo selvagem, citocromo P450 1B1 e sequências de íntron expressas de maneira anormal, como N-acetilglucosaminiltransferase-V; rearranjos clonais de genes de imunoglobulina que geram idiotipos únicos em mieloma e linfomas de células B; antígenos tumorais que incluem regiões epitópicas ou peptídeos epitópicos derivados de processos oncovirais, como as proteínas E6 e E7 do vírus do papiloma humano; proteína LMP2 do vírus da barra de Epstein; proteínas oncofetais não mutadas com uma expressão seletiva de tumor, como antígeno carcinoembrionário e alfa-fetoproteína.

[0176]Em outras modalidades, um antígeno é obtido ou derivado de um micro-organismo patogênico ou de um micro-organismo patogênico oportunista (também chamado aqui de microrganismo de doença infecciosa), como vírus, fungo, parasita e bactéria. Em certas modalidades, os antígenos derivados de um micro-organismo incluem proteínas completas.

III. Células efectoras imunológicas

A. Células precursoras hematopoiéticas

[0177]As PSCs da presente revelação projetadas para expressar um receptor antigênico, como um CAR, podem ser diferenciadas para HPCs por métodos conhecidos na técnica. Em um método, os CAR-PSCs são diferenciados para CD34⁺ HPCs por diferenciação direta. Em outro método, os CAR-PSCs são diferenciados para CD34⁺ HPCs por meio de programação direta.

1. Diferenciação Direcionada

[0178]Certas modalidades da presente revelação dizem respeito à diferenciação de CAR-PSCs para HPCs. Os CAR-PSCs podem ser diferenciados em HPCs por métodos conhecidos na técnica, como descrito na Patente nº US 8.372.642, que é incorporada por referência aqui. Em um método, combinações de BMP4, VEGF, ligante Flt3, IL-3 e GM-CSF podem ser usadas para promover a diferenciação hematopoiética. Em certas modalidades, a exposição sequencial de culturas celulares a um primeiro meio para preparar PSCs para diferenciação, um segundo meio que inclui BMP4, VEGF e FGF, seguido por cultura em um terceiro meio que inclui ligante Flt3, SCF, TPO, IL-3 e IL-6 podem diferenciar células pluripotentes em HPCs e células hematopoiéticas. O segundo meio definido também pode compreender heparina. Além disso, a inclusão de FGF-2 (50 ng/ml) nos meios contendo BMP4 e VEGF pode melhorar a eficiência da geração de células precursoras hematopoiéticas a partir de células pluripotentes. Além disso, a inclusão de um inibidor do glicogênio sintase-cinase 3 (GSK3) (por exemplo, CHIR99021, BIO e SB-216763) no primeiro meio definido pode melhorar ainda mais a produção de HPCs.

[0179]Geralmente, a diferenciação de células pluripotentes em células precursoras hematopoiéticas pode ser realizada usando condições definidas ou não definidas. Será apreciado que as condições definidas são geralmente preferenciais em modalidades em que as células resultantes se destinam a ser administrados a um

indivíduo humano. Células estaminais ematopoiéticas H podem ser derivadas a partir de células estaminais pluripotentes em condições definidas (por exemplo, utilizando um meio TeSR), e células hematopoiéticas podem ser geradas a partir de corpos embrionários derivados a partir de células pluripotentes. Em outras modalidades, as células pluripotentes podem ser cocultivadas em células OP9 ou células de fibroblastos embrionários de camundongo e subsequentemente diferenciadas.

[0180]As células pluripotentes podem formar corpos embrionários ou agregados como parte do processo de diferenciação. A formação de "corpos embrionários" (EBs), ou aglomerados de células em crescimento, a fim de induzir diferenciação geralmente envolve agregação *in vitro* de células-tronco pluripotentes humanas em EBs e permite a diferenciação espontânea e aleatória de células-tronco pluripotentes humanas em múltiplos tecidos tipos que representam origens endoderma, ectoderma e mesoderme. EBs tridimensionais podem assim ser usados para produzir alguma fração de células hematopoiéticas e células endoteliais.

[0181]EBs podem ser formados usando o seguinte protocolo. Os iPSCs indiferenciados adaptados ao crescimento livre do alimentador em placas revestidas com MATRIGEL TM podem ser colhidos em confluência usando tratamento com EDTA 0,5M por cerca de 8 a 10 minutos em temperatura ambiente. O EDTA é aspirado após a incubação e os EBs podem ser formados coletando as células em meios SFD contendo inibidor de rocha ou blebistatina. O meio pode ser alterado no dia seguinte para meio de diferenciação EB1 contendo diferentes formulações de citocinas. As células são plaqueadas a uma densidade de 0,25 a 0,5 milhões de células por ml para promover a formação de agregados.

[0182]Para promover a formação de agregados, as células podem ser transferidas para placas de baixa adesão para uma incubação durante a noite em meio de

diferenciação livre de soro (SFD), consistindo em 75% de IMDM (Gibco), 25% de F12 modificado de Ham (Cellgro) suplementado com 0,05% de Ham N2 e B-27 sem suplementos de AR, 1-glutamina 200 mM, sal de magnésio de ácido ascórbico-2-fosfato 0,05 mg/ml (Asc 2-P) (WA2O) e $4,5 \times 10^{-4}$ MTG. No dia seguinte, as células podem ser coletadas de cada poço e centrifugadas. As células podem ser ressuspensas em " meio de diferenciação EB ", que consiste em meio basal de SFD suplementado com cerca de 50 ng/ml de fator morfogenético ósseo (BMP4), cerca de 50 ng/ml de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e 50 ng/ml de FGF durante os primeiros quatro dias de diferenciação. As células são alimentadas pela metade a cada 48 horas. No quinto dia de diferenciação, o meio é substituído por um segundo meio, composto por meio SFD suplementado com 50 ng/ml de fator de célula-tronco (SCF), cerca de 50 ng/ml de ligante Flt-3 (Flt-3L), 50 ng/ml interleucina-6 (IL-6), 50 ng/ml de interleucina-3 (IL-3), 50 ng/ml de trombopoietina (TPO). As células são alimentadas pela metade a cada 48 horas com novos meios de diferenciação. As mudanças de mídia são realizadas girando as culturas de diferenciação a 300 g por 5 minutos e aspirando metade do volume das culturas diferenciadoras e reabastecendo-as com novos meios. Em certas modalidades, o meio de diferenciação EB pode incluir cerca de BMP4 (por exemplo, cerca de 50 ng/ml), VEGF (por exemplo, cerca de 50 ng/ml) e, opcionalmente, FGF-2 (por exemplo, cerca de 25-75 ng/ml ou cerca de 50 ng/ml). O sobrenadante pode ser aspirado e substituído por meio de diferenciação fresco. Como alternativa, as células podem ser alimentadas pela metade a cada dois dias com mídia nova. As células podem ser colhidas em diferentes momentos no processo de diferenciação.

[0183]As HPCs podem ser cultivadas a partir de células-tronco pluripotentes usando um meio definido. Os métodos para a diferenciação de células pluripotentes em células-tronco CD34⁺ hematopoiéticas usando um meio definido são descritos, por

exemplo, no Pedido US 12/715.136, que é incorporado por referência na sua totalidade. Prevê-se que esses métodos possam ser utilizados com a presente revelação.

[0184]Por exemplo, um meio definido pode ser usado para induzir diferenciação hematopoiética de CD34⁺. O meio definido pode conter os fatores de crescimento BMP 4, VEGF, ligante Flt3, IL-3 e/ou GMCSF. As células pluripotentes podem ser cultivadas em um primeiro meio definido compreendendo BMP4, VEGF e, opcionalmente, FGF-2, seguido por cultura em um segundo meio compreendendo (ligante Flt3, IL-3 e GMCSF) ou (ligante Flt3, IL-3, IL-6 e TPO). O primeiro e o segundo meios também podem compreender um ou mais dentre SCF, IL-6, G-CSF, EPO, FGF-2 e/ou TPO. Condições substancialmente hipóxicas (por exemplo, menos de 20% de O₂) podem promover ainda mais a diferenciação hematopoiética ou endotelial.

[0185]As células podem ser substancialmente individualizadas por meios mecânicos ou enzimáticos (por exemplo, usando uma tripsina ou TrypLE™). Um inibidor de ROCK (por exemplo, H1152 ou Y-27632) também pode ser incluído no meio. Prevê-se que essas abordagens possam ser automatizadas usando, por exemplo, automação robótica.

[0186]Em certas modalidades, condições substancialmente hipóxicas podem ser usadas para promover a diferenciação de células pluripotentes em células progenitoras hematopoiéticas. Como seria reconhecido por um versado na técnica, um teor de oxigênio atmosférico inferior a cerca de 20,8% seria considerado hipóxico. As células humanas em cultura podem crescer em condições atmosféricas com conteúdo de oxigênio reduzido em comparação ao ar ambiente. Esta hipoxia relativa pode ser conseguida pela diminuição do oxigênio atmosférico exposta ao meio de cultura. As células embrionárias geralmente se desenvolvem *in vivo* sob condições reduzidas de oxigênio, geralmente entre cerca de 1% e cerca de 6% de oxigênio atmosférico, com dióxido de carbono nos níveis ambientais.

Sem desejar ser limitado pela teoria, prevê-se que condições hipóxicas possam imitar um aspecto de certas condições embrionárias de desenvolvimento. Como mostrado nos exemplos abaixo, condições hipóxicas podem ser usadas em certas modalidades para promover diferenciação adicional de células pluripotentes, como iPSC ou hESC, em um tipo de célula mais diferenciado, como HPCs.

[0187]As condições hipóxicas a seguir podem ser utilizadas para promover a diferenciação de células pluripotentes em células progenitoras hematopoiéticas. Em certas modalidades, um conteúdo de oxigênio atmosférico inferior a cerca de 20%, inferior a cerca de 19%, inferior a cerca de 18%, inferior a cerca de 17%, inferior a cerca de 16%, inferior a cerca de 15%, inferior a cerca de 14%, menos de cerca de 13%, menos de cerca de 12%, menos de cerca de 11%, menos de cerca de 10%, menos de cerca de 9%, menos de cerca de 8%, menos de cerca de 7%, menos de cerca de 6%, menos que cerca de 5%, cerca de 5%, cerca de 4%, cerca de 3%, cerca de 2% ou cerca de 1% podem ser utilizados para promover a diferenciação em células precursoras hematopoiéticas. Em certas modalidades, a atmosfera hipóxica compreende cerca de 5% de gás oxigênio.

[0188]Independentemente do meio específico utilizado em qualquer expansão celular progenitora hematopoiética, o meio utilizado é de preferência suplementado com pelo menos uma citocina em uma concentração de cerca de 0,1 ng/ml a cerca de 500 ng/ml, mais usualmente 10 ng/ml a 100 ng/ml. Citocinas adequadas, incluem, entre outras, ligante c-kit (KL) (também chamado fator de aço (Stl), fator de crescimento de mastócitos (MGF) e fator de células-tronco (SCF)), IL-6, G-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-1a, IL-11 MIP-1a, LIF, ligando c-mpl/TPO e ligando flk2/flk3 (Flt2L ou Flt3L). Particularmente, a cultura incluirá pelo menos um dos SCF, Flt3L e TPO. Mais particularmente, a cultura incluirá SCF, Flt3L e TPO.

[0189]Em uma modalidade, as citocinas estão contidas na mídia e reabastecidas por perfusão do meio. Alternativamente, ao usar um sistema de biorreator, as citocinas podem ser adicionadas separadamente, sem perfusão do meio, como uma solução concentrada através de portas de entrada separadas. Quando citocinas são adicionadas sem perfusão, elas geralmente são adicionadas como uma solução de 10 × a 100 × em uma quantidade igual a um décimo a 1/100 do volume nos biorreatores com citocinas frescas sendo adicionadas aproximadamente a cada 2 a 4 dias. Além disso, citocinas frescas concentradas também podem ser adicionadas separadamente, além disso, a citocinas nos meios perfundidos.

[0190]Em algumas modalidades, as HPCs exibem Proteína de Ligação a Metil-CpG 2 (MeCP2) interrompida e são cultivadas sob condições para promover a diferenciação mieloide ou diferenciação linfoide. Em alguns aspectos, as HPCs expressam um MeCP2 não funcional que não tem essencialmente nenhuma ligação ao DNA metilado. Em certos aspectos, os HPCs não expressam MeCP2 em níveis suficientes para afetar a atividade de ligação ao DNA de MeCP2. Em aspectos particulares, o MeCP2 não é funcional em virtude de um truncamento ou mutação no gene MeCP2. Em alguns aspectos, a obtenção de HPCs que exibem MeCP2 interrompido compreende o contato das HPCs com siRNA, shRNA ou um inibidor de molécula pequena de MeCP2.

(i) Método exemplificativo de diferenciação 3D

[0191]Um método exemplar para diferenciação de PSC para HPCs é mantido em condições livres de alimentador, como em placas revestidas com MATRIGEL™ ou Vitronectina em meio Essential 8 (E8). Os agregados são feitos de PSCs, particularmente subconfluentes, como <80% de confluência) a uma densidade de 0,5 a 1 milhão de células por ml no meio Essential 3 (E3) (por exemplo, contendo apenas 3 de 8

componentes do meio E8: Meio básico DMEM/F12, ácido ascórbico (por exemplo, 100 a 500 μM), 2-fosfato de magnésio e selenito de sódio) suplementado com 50 ng/ml de FGF2, 50 ng/ml de VEGF, 2 μM CHIR99021 (inibidor da GSK-3) e blebistatina (inibidor da miosina II) (por exemplo, 2 a 10 μM , como 10 μM). A formação agregada, e as etapas subsequentes, são realizadas durante a cultura de 24 horas em frascos de fixação ultrabaixa (ULA) sob agitação contínua.

[0192]Os agregados de células formadas (isto é, EBS) são depois transferidos para meio de diferenciação sem soro (por exemplo, 50% de IMDM, 50% de meio F12 de Ham, 100 $\mu\text{g/ml}$ de álcool polivinílico, 100 $\mu\text{g/ml}$ de albumina de soro humano recombinante, 1x suplemento de aminoácido não essencial (Invitrogen), 0,1x suplemento lipídico quimicamente definido (Invitrogen), 125 μM de ácido ascórbico 2-fosfato de magnésio, 0,25 μM de ácido linoleico, suplementos de oligoelementos A (0,3x), B (0,2x) e C (0,1x) (Corning), cloreto de sódio 5 mM, 100 μM de monotioglicerol, 20 μM de etanolamina, 100 ng de heparina/ml, e 10 ng/ml IGF-1), suplementado com citocinas indutoras de mesoderme hematopoiéticas - 25 ng/ml BMP4, VEGF a 50 mg/ml e FGF2 a 50 ng/ml. As culturas são continuadas, por 4 dias, com mudança média completa no segundo dia.

[0193]Para apoiar a diferenciação e expansão dos progenitores hematopoiéticos CD34⁺, os agregados celulares são posteriormente transferidos para o meio de diferenciação sem soro (como acima) suplementado com citocinas de suporte hematopoiéticas, como 50 ng/ml de SCF, 20 mg/ml de TPO, 10 ng/ml FLT3L, 20 ng/ml de IL-3 e 25 ng/ml de BMP4. As culturas são continuadas, por 4 dias, com mudança média completa no segundo dia.

[0194]As culturas são colhidas após o processo de diferenciação, como 9 dias. A suspensão de célula única é obtida através da digestão de agregados celulares

diferenciados, como no Accutase. Células CD34⁺ isoladas, tais como isoladas por MACS, são então plaqueadas em culturas de diferenciação T/NK ou criopreservadas para uso posterior dentro de 1 hora após o isolamento.

(ii) Método exemplificativo de diferenciação 2D

[0195]Em um método exemplificador alternativo, as PSCs são submetidas a um protocolo de diferenciação 2D para produção de HPCs. Primeiro, as PSCs são aclimatadas a condições hipóxicas, como para 5 a 10 passagens, em condições sem alimentador, como em MATRIGEL™- ou revestido com vitronectina em mídia Essencial 8 (E8). As PSCs são individualizadas e plaqueadas em placas de 6 poços revestidas com PureCoat Amine (Corning Inc.) a uma densidade de 25.000/cm² na presença de meio de definição livre de soro (SFD) suplementado com 5 uM de blebistatina (por exemplo, 2 a 10 µM, como 10 µM) .O meio basal SFD pode conter 75% de IMDM (Invitrogen 12200-069) (com glutamina e 25 mM de HEPES + P/S), 25% de presunto F12 (Mediatech 10-080-CV), 0,5% de suplemento de N2 (Invitrogen 17502- 048), suplemento B27 a 1% sem ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA a 0,05%, ácido ascórbico 50 µg/ml e monotioglicol 4,5 × 10⁻⁴ M suplementado com 50 ng/ml de BMP-4, VEGF e bFGF.

[0196]A indução da diferenciação hematopoiética é iniciada no dia 1 por cultura, por exemplo, em meio basal SFD contendo 75% de IMDM (Invitrogen 12200-069) (com glutamina e 25 mM de HEPES + P/S), 25% de Hams F12 (Mediatech 10- 080-CV), suplemento N2 a 0,5% (Invitrogen 17502-048), suplemento B27 a 1% sem ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA a 0,05%, ácido ascórbico 50 ug/ml e monotioglicol 4,5 × 10⁻⁴ M suplementado com 50 ng/ml de BMP4, VEGF e bFGF. No dia 2, o meio é aspirado e as células são colocadas em meio EB1 fresco (por exemplo, meio basal SFD contendo 75% de IMDM (Invitrogen 12200-069) (com glutamina e 25 mM de HEPES + P/S), 25% de Hams F12 (Mediatech 10-080-CV), suplemento N2 a 0,5% (Invitrogen 17502-048),

suplemento B27 a 1% sem ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA a 0,05%, ácido ascórbico a 50 µg/ml e $4,5 \times 10^{-4}$ M Monotioglicol -4 M suplementado com 50 ng/ml de BMP4, VEGF e bFGF) por mais 48 horas.

[0197]Nos dias 5 a 10, o meio é aspirado e as células são colocadas na mídia EB2 pelas próximas 48 horas. O meio EB2 pode compreender meio basal fresco de SFD contendo 75% de IMDM (Invitrogen 12200-069) (com glutamina e 25 mM de HEPES + P/S), 25% de Hams F12 (Mediatech 10-080-CV), 0,5% de suplemento de N2 (Invitrogen 17502-048), suplemento B27 a 1% sem ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA a 0,05%, ácido ascórbico 50 µg/ml e monotioglicol $4,5 \times 10^{-4}$ M suplementado com 50 ng/ml de Flt-3 Ligante, IL3, IL6, SCF e TPO, cada um a 50 ng/ml e 5000U/ml de heparina. As células são colhidas no dia 7, 8, 9, 10 de diferenciação usando TrypLE e coradas para a presença de marcadores de HPC e progenitores linfoides.

2. Programação Direta

[0198]Certas modalidades da presente revelação fornecem HPCs pela programação direta dos CAR-PSCs através da expressão de uma combinação de genes de programação importantes para diferenciação/função de células hematopoiéticas. Em um método, as PSCs são modificadas para expressar pelo menos três genes de programação de precursores hematopoiéticos, como um gene ETS (por exemplo, ETC2 ou ERG), um gene de desenvolvimento hematopoiético (por exemplo, GATA2) e um gene de homoeobox (por exemplo, HOXA9), como descrito em PCT/US2016/057893, incorporado aqui por referência na sua totalidade. Em aspectos particulares, os genes ETV2/ERG, GATA2 e HOXA9 são coexpressos por um vetor, como um vetor PiggyBac não induzível, usando um promotor Tight bidirecional que é transfectado para os PS-CAR.

[0199]Além disso, os EGH-CAR-PSCs podem ser modificados ainda mais para expressar genes adicionais para potencial de enxerto a longo prazo. Genes

exemplificadores incluem HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1, HOXA4, ZNF414, KLF4, ZNF131, BCL2, ETV6, ZNF350 e/ou RBAK. Por exemplo, as PSCs podem ser transfectadas com um ou mais vetores para expressar HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1 e HOXA4.

[0200]De preferência, os genes ETV2/GAT2/HOXA9 são expressos por apenas um período de tempo suficiente para encaminhar as PSCs para as células precursoras hematopoiéticas. Por conseguinte, os genes de programação dos precursores hematopoiéticos podem estar sob o controle de um promotor indutível. Assim, a expressão dos genes de programação dos precursores hematopoiéticos pode ser induzida nas PSCs por um período de tempo suficiente para encaminhar o programa para as células precursoras hematopoiéticas de múltiplas linhagens. O período de tempo pode ser de 1 a 20 dias, como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 dias. Alternativamente, os genes de programação dos precursores hematopoiéticos podem ser introduzidos nas PSCs por um vetor episomal. Assim, os genes de programação dos precursores hematopoiéticos podem ser expressos com paciência nas PSCs.

B.Diferenciação de Células Linfoides

[0201]As HPCs podem então ser diferenciadas ainda mais para células da linhagem linfóide, incluindo células T, células NK e células T/NK. Em alguns aspectos, as HPCs durante a diferenciação são isoladas nos dias 7-12, como nos dias 8-11, para diferenciação das células linfóides. As HPCs nesta fase podem ser identificadas pela expressão de CD34 e CD43. Além disso, as HPCs com potencial linfóide podem expressar CD144, DLL4, CD7 e CD235 em níveis baixos, que diminuem no dia 11, implicando que um certo nível limite de expressão desses marcadores é necessário para preparar as células para a diferenciação linfóide na presença de DLL4.

[0202]Em alguns aspectos, as HPCs isoladas nos dias 7-11, como dia 7, dia 8, dia 9, dia 10 ou dia 11 do processo de diferenciação, podem ser diferenciadas em células linfoides, como células T e NK. Em alguns aspectos, o momento da origem dos progenitores linfoides coincide com o declínio dos progenitores hematoendoteliais e o surgimento de progenitores eritroides durante a diferenciação da HPC. Em aspectos particulares, as HPCs do dia 9 podem ter uma eficiência aumentada na geração de células T. HPCs capazes de diferenciação linfóide podem ser isoladas e/ou identificadas pela expressão de certos marcadores. Por exemplo, células com expressão superficial de CD34 e/ou CD43, expressando particularmente CD34 e CD43, podem ser selecionadas para diferenciação linfóide, como por classificação MACS.

[0203]Marcadores adicionais para a detecção de células progenitoras linfoides incluem DLL4, CD144, CD31, CD34, CD43^{lo}, CD45^{lo/-}, CD235, CD7, Fik-1, APNLR. Em aspectos particulares, a presença de CD34/CD7, CD235/CD7, DLL4/CD34, DLL4/CD31, DLL4/CD144, ou populações positivas duplas CD34/CD43^{lo} é usada para identificar células progenitoras linfoides. A expressão CD144 nas HPCs cora com CD31, CD34 e DLL4. A expressão de CD7 nas HPCs cora com CD235, CD34 e CD43. Assim, as HPCs que coexpressam CD144 e CD7 demonstra precursores de captura de potencial linfóide que expressam ligante Notch ligado à membrana (DLL4) junto com marcadores hematoendoteliais e criam a assinatura fenotípica para progenitores linfoides emergentes capazes de gerar linhagens de hematopoiese definitiva *in vitro*. Em aspectos particulares, as HPCs podem ser ainda classificadas em células com potencial linfóide aprimorado pela classificação dos marcadores de superfície, incluindo CD31, CD34, CD144, CD43, CD45, CD6, CD335, Fik-1 e DLL4. Em alguns aspectos, as frações positivas de CD114/CD34, CD144/CD45, CD144/CD7 e CD144/CD34/CD45/CD7 de HPCs são diferenciadas para

células linfóides. Em aspectos particulares, as frações CD144/CD7 positivas de HPCs são diferenciadas para células linfóides.

[0204]As HPCs podem ser cultivadas em condições definidas, livres de alimentador, para diferenciação linfóide. Um meio de cultura pode conter um ou mais componentes da matriz, como retronectina, fibronectina ou um peptídeo RGD. Sem desejar estar vinculado a nenhuma teoria, um componente da matriz pode fornecer um suporte sólido para o crescimento de células-tronco embrionárias. Em certas modalidades, um componente da matriz pode ser aplicado a uma superfície de cultura e contatado com o meio de cultura antes da semeadura das células no meio. Por exemplo, as células podem ser cultivadas em um meio definido (por exemplo, um meio TeSR) em placas revestidas com fibronectina ou MATRIGEL™ antes de separar mecanicamente as células em aglomerados ou individualizar células e induzir diferenciação em células precursoras hematopoiéticas.

[0205]Vários componentes da matriz podem ser usados para cultivar células pluripotentes, incluindo colágeno (por exemplo, colágeno IV), laminina, vitronectina, MATRIGEL™, gelatina, polilisina, trombospondina (por exemplo, TSP-1, -2, -3, -4 e/ou -5) e/ou PRONECTIN-F™. Em certas modalidades, o uso de apenas MATRIGEL™, colágeno IV ou laminina com células previamente cultivadas com TeSR pode ser evitado devido a possíveis efeitos adversos na viabilidade celular; no entanto, essas composições podem ser vantajosamente usadas em combinação com outros componentes da matriz. Combinações desses componentes da matriz podem fornecer benefícios adicionais para promover o crescimento e a viabilidade celular. Em certas modalidades, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais dos componentes da matriz acima podem ser usados para cultivar células, por exemplo, antes da diferenciação hematopoiética.

[0206]Em algumas modalidades, o ácido ascórbico pode ser usado para melhorar a diferenciação linfóide. O meio definido pode ser suplementado com cerca de 10 µM a cerca de 1 mM de ácido ascórbico, como 100 a 500 µM, como cerca de 50 µM a cerca de 100 µM, como cerca de 95 µM. O ácido ascórbico pode ser selecionado dentre vários ascorbatos, como fosfato de magnésio e ácido ascórbico. Em algumas modalidades, a nicotinamida (por exemplo, ácido nicotínico) pode ser usada para aprimorar a diferenciação linfóide, como em uma concentração de cerca de 0,1 mM a cerca de 5 mM.

[0207]Em alguns aspectos, as HPCs são diferenciadas para células linfóides, como células T, alterando a atividade endógena de um ligante Notch, administrando uma substância que aumenta a produção do ligante Notch em um indivíduo. O método também inclui cultivar as células em um meio, em que o meio inclui uma quantidade eficaz de um ligante Notch e uma ou mais citocinas selecionadas do grupo que consiste em IL-7, IL-15, SCF, Flt-3 e IL-3. Em algumas modalidades particulares, o meio pode incluir ainda IL-6. Em algumas modalidades, o ligante Notch é um ligante Notch delta4 (DLL4), como a quimera DLL4: Fc.

[0208]Um ligante Notch é selecionado que promove e mantém a diferenciação e proliferação de células da linhagem de células T. Um ligante Notch pode ser de origem humana ou pode ser derivado de outras espécies, incluindo espécies de mamíferos, como roedores, cães, gatos, porcos, ovelhas, vacas, cabras e primatas. Exemplos particulares de ligantes Notch incluem a família Delta. A família Delta inclui Delta-1 (número de acesso Genbank AF003522, *Homo sapiens*), Delta-3 (número de acesso Genbank AF084576, *Rattus norvegicus*), tipo Delta 1 (número de acesso Genbank NM - 005618 e NP - 005609, *Homo sapiens*; nº de acesso Genbank X80903, I48324, *M. musculus*), tipo Delta 3 (número de acesso Genbank NM - 053666, N - 446118, *Rattus norvegicus*), Delta-4 (número de acesso Genbank AF273454, BAB18580, *Mus musculus*; número de acesso

Genbank AF279305, AAF81912, *Homo sapiens*) e tipo Delta 4 (número de acesso Genbank Q9NR61, AAF76427, AF253468, NM - 019074, *Homo sapiens*; número de acesso Genbank NM - 019454, *mus musculus*). Os ligantes Notch estão disponíveis comercialmente ou podem ser produzidos por técnicas de DNA recombinante e purificados em vários graus.

[0209]O método inclui ainda a etapa de manutenção das células HPC na cultura descrita acima por um período de tempo suficiente para produzir células NK diferenciadas. Em algumas modalidades, as células NK diferenciadas emergem nas culturas junto com as células T, no entanto, as células NK podem parar de proliferar após a semana 6. Em geral, a determinação de um aumento no número de células NK e/ou seu estado de diferenciação é avaliada usando métodos convencionais conhecidos pelos versados na técnica. Por exemplo, as células cultivadas podem ser monitoradas por citometria de fluxo para o desenvolvimento de células NK pela coloração das células com anticorpos anti-CD56 e anti-CD3. O anticorpo anti-CD3, como OKT3, pode estar presente em uma concentração de 0,5 a 2 µg. Células que são CD56⁺/CD3⁻ seriam indicativas de células NK diferenciadas.

[0210]Em aspectos particulares, a diferenciação linfóide para células T CD3⁺ ou células CD56⁺ CD3⁻ NK é realizada por cultura hipóxica 2D em placas revestidas com retronectina e DLL4. Em aspectos particulares, uma placa tratada com cultura de não tecido pode ser revestida com proteína quimérica DLL4: Fc e retronectina (fragmento de fibronectina CH-296; Takara Shuzo, Japão) para uso na diferenciação linfóide de HPCs. A diferenciação pode compreender um primeiro período de diferenciação de células T/NK seguido por um segundo período de expansão de células T ou NK. O primeiro período de diferenciação pode ser de cerca de 1 semana a cerca de 2 semanas, e o segundo período de expansão também pode ser de cerca de 1 semana a cerca de 2 semanas. Assim, o

período completo de diferenciação e expansão linfóide pode ser de cerca de 2 a 4 semanas.

[0211]Em algumas modalidades, o processo de diferenciação linfóide pode compreender cocultura com células-alvo antígeno-específicas, como células tumorais antígeno-específicas, para aumentar a atividade citotóxica das células T e das células NK. Em aspectos particulares, o período de expansão da diferenciação linfóide pode compreender cocultura com células-alvo antígeno-específicas. Por exemplo, células CD19-CAR-T ou células NK podem ser cocultivadas com células tumorais CD19+ (por exemplo, células CD19+ Daudi) durante o período de expansão, como por uma a três semanas, particularmente duas semanas. Em alguns aspectos, o período de expansão pode ainda compreender a adição de citocinas, como IL2, IL15 e/ou IL21, particularmente IL2, para melhorar a expansão. A concentração das citocinas pode ser otimizada, como 10 a 50 μ M.

C.Cultura de células

[0212]Em certas modalidades, condições substancialmente hipóxicas podem ser usadas para promover a diferenciação de HPCs para linhagens mielóides ou linfóides. Em certas modalidades, um conteúdo de oxigênio atmosférico inferior a cerca de 20%, inferior a cerca de 19%, inferior a cerca de 18%, inferior a cerca de 17%, inferior a cerca de 16%, inferior a cerca de 15%, inferior a cerca de 14%, menos de cerca de 13%, menos de cerca de 12%, menos de cerca de 11%, menos de cerca de 10%, menos de cerca de 9%, menos de cerca de 8%, menos de cerca de 7%, menos de cerca de 6%, menos que cerca de 5%, cerca de 5%, cerca de 4%, cerca de 3%, cerca de 2% ou cerca de 1% podem ser utilizados para promover a diferenciação em células precursoras hematopoiéticas. Em certas modalidades, a atmosfera hipóxica compreende cerca de 5% de gás oxigênio.

[0213]Como aqui descrito, um ou mais meios de cultura definidos podem ser vantajosamente utilizados para promover a diferenciação de HPCs para linhagens mieloides e linfoides; em particular, a eliminação de produtos animais, como camadas de soro e camundongo, pode reduzir os riscos associados à exposição de células a produtos de origem animal e permitir a geração de células que poderiam ser administradas com mais segurança a um indivíduo humano. Como o desenvolvimento tradicional da cultura de células-tronco se baseou em produtos séricos e camadas de alimentadores de camundongos para diferenciar células-tronco em vários tipos de células, esses procedimentos tradicionais limitaram a escala na qual a diferenciação pode ser conduzida, maior variabilidade biológica e potencial contaminação e dificultaram seriamente o uso de células ES em terapias de tradução nas quais elas poderiam ser úteis.

[0214]Geralmente, as células da presente revelação são cultivadas em um meio de cultura, que é uma solução tamponada rica em nutrientes capazes de sustentar o crescimento celular. Os meios de cultura adequados para isolar, expandir e diferenciar células-tronco pluripotentes em células precursoras hematopoiéticas e células hematopoiéticas de acordo com o método aqui descrito incluem, mas não se limitam ao meio de Eagle modificado por Dulbecco com alta glicose (DMEM), DMEM/F-15, RPMI 1640, meio Iscove Dubelcco modificado (IMDM) e Opti-MEM SFM (Invitrogen Inc.). O meio definido quimicamente compreende um meio essencial mínimo, como o meio de Dulbecco modificado da Iscove (IMDM) (Gibco), suplementado com albumina sérica humana, lipoproteína ExCyte humana, transferrina, insulina, vitaminas, aminoácidos essenciais e não essenciais, piruvato de sódio, glutamina e um mitogênio também é adequado. Como usado aqui, um mitogênio se refere a um agente que estimula a divisão de uma célula. Um agente pode ser um produto químico, geralmente alguma forma de proteína que incentiva uma célula a iniciar a divisão celular, desencadeando mitose. Em

uma modalidade, meios livres de soro, como os descritos em número de série US 08/464.599 e WO 96/39487, e um “meio completo”, conforme descrito na Patente 5.486.359 são contemplados para uso com os métodos aqui descritos. Em algumas modalidades, o meio de cultura é suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), soro autólogo humano, soro AB humano ou plasma rico em plaquetas suplementado com heparina (2 U/ml).

[0215]As células imunológicas podem ser geradas pela cultura de células-tronco pluripotentes ou células precursoras hematopoiéticas em um meio sob condições que aumentam o nível intracelular de fatores suficientes para promover a diferenciação das células em linhagens mieloides ou linfoides. O meio também pode conter um ou mais agentes de diferenciação e maturação de células hematopoiéticas, como vários tipos de fatores de crescimento. Esses agentes podem ajudar a induzir as células a se comprometerem com um fenótipo mais maduro - ou preferencialmente promover a sobrevivência das células maduras - ou ter uma combinação de ambos os efeitos. Os agentes de diferenciação e maturação de D podem incluir fatores de crescimento solúveis (hormônios peptídicos, citocinas, complexos ligando-receptor e outros compostos) que são capazes de promover o crescimento de células da linhagem celular hematopoiética. Exemplos não limitativos de tais agentes incluem, entre outros, fatores de crescimento hematopoiético ou endotelial, como fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de células-tronco (SCF), trombopoietina (TPO), ligante FLT-3 (FLT3L), interleucina-3 (IL-3), interleucina-6 (IL-6), interleucina-9 (IL-9) ou fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) ou isoformas ou variantes dos mesmos.

IV. Usos de células imunológicas antígeno-específicas

[0216]As células efectoras imunológicas antígeno-específicas fornecidas por métodos e composições de certos aspectos podem ser usadas em uma variedade de aplicações. Estes incluem, mas não estão limitados a, transplante ou implantação das células *in vivo*; rastreamento de compostos citotóxicos, agentes cancerígenos, fatores reguladores/crescimento de mutagênicos, compostos farmacêuticos, etc., *in vitro*; elucidar o mecanismo de doenças e lesões hematológicas; estudar o mecanismo pelo qual drogas e/ou fatores de crescimento operam; diagnosticar e monitorar câncer em um paciente; terapia de genes; e a produção de produtos biologicamente ativos, para citar apenas alguns.

A. Triagem de compostos de teste

[0217]As células imunológicas desta revelação podem ser usadas para rastrear fatores (como solventes, fármacos de pequenas moléculas, peptídeos e polinucleotídeos) ou condições ambientais (como condições de cultura ou manipulação) que afetam as características das células linfoides aqui fornecidas.

[0218]Aplicações de triagem particulares desta revelação se referem ao teste de compostos farmacêuticos na pesquisa de fármacos. O leitor se refere geralmente ao livro didático *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997 e Patente nº US 5.030.015. Em certos aspectos, as células mieloides e linfoides desempenham o papel de células de teste para triagem de fármacos e ensaios de toxicidade, como já havia sido realizado anteriormente em células hematopoiéticas e precursores em cultura de curto prazo. A avaliação da atividade de compostos farmacêuticos candidatos geralmente envolve a combinação de células hematopoiéticas ou precursores fornecidos em certos aspectos com o composto candidato, determinando qualquer alteração na morfologia, fenótipo de marcador ou atividade metabólica das células que é atribuível ao composto (em comparação com células não tratadas ou células tratadas com um

composto inerte) e, em seguida, correlacionar o efeito do composto com a alteração observada. A triagem pode ser feita porque o composto é projetado para ter um efeito farmacológico nas células ou precursores hematopoiéticos, ou porque um composto projetado para ter efeitos em outros lugares pode ter efeitos indesejados nas células ou precursores hematopoiéticos. Dois ou mais fármacos podem ser testados em combinação (combinando-se com as células simultaneamente ou sequencialmente), para detectar possíveis efeitos de interação fármaco-fármaco.

B. Terapia Celular Adotiva

[0219]Em algumas modalidades, a presente revelação fornece métodos para imunoterapia compreendendo a administração de uma quantidade eficaz das células imunológicas da presente revelação. Em uma modalidade, uma doença ou distúrbio médico é tratado por transferência de uma população de células imunológicas que provoca uma resposta imunológica. Em certas modalidades da presente revelação, câncer ou infecção é tratado por transferência de uma população de células imunológicas que provoca uma resposta imunológica. São aqui fornecidos métodos para o tratamento ou retardamento da progressão do câncer em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de uma terapia celular específica ao antígeno. Os presentes métodos podem ser aplicados para o tratamento de distúrbios imunológicos, cânceres sólidos, cânceres hematológicos e infecções virais.

[0220]Os tumores para os quais os presentes métodos de tratamento são úteis incluem qualquer tipo de célula maligna, como as encontradas em um tumor sólido ou em um tumor hematológico. Os tumores sólidos exemplificativos podem incluir, mas não estão limitados a, um tumor de um órgão selecionado do grupo que consiste em pâncreas, cólon, ceco, estômago, cérebro, cabeça, pescoço, ovário, rim, laringe, sarcoma, pulmão, bexiga, melanoma, próstata e mama. Tumores hematológicos exemplares

incluem tumores da medula óssea, malignidades de células T ou B, leucemias, linfomas, blastomas, mielomas e similares. Outros exemplos de cânceres que podem ser tratados usando os métodos aqui fornecidos incluem, entre outros, câncer de pulmão (incluindo câncer de pequenas células, câncer de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão), câncer de peritônio, câncer de estômago ou estômago (incluindo câncer gastrointestinal e câncer de estroma gastrointestinal), câncer de pâncreas, câncer de colo do útero, câncer de ovário, câncer de fígado, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de cólon, câncer colorretal, carcinoma endometrial ou uterino, salivar carcinoma da glândula, câncer de rim ou renal, câncer de próstata, câncer vulvar, câncer de tireoide, vários tipos de câncer de cabeça e pescoço e melanoma.

[0221]O câncer pode ser especificamente do seguinte tipo histológico, embora não se limite a eles: neoplasia maligna; carcinoma; carcinoma indiferenciado; carcinoma de células gigantes e fusiformes; carcinoma de pequenas células; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfoepitelial; carcinoma basocelular; carcinoma de pilomatriz; carcinoma de células de transição; carcinoma de células de transição papilar; adenocarcinoma; gastrinoma maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular combinado e colangiocarcinoma; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide cístico; adenocarcinoma no pólipó adenomatoso; adenocarcinoma, polipose coli familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide maligno; adenocarcinoma ramoiolo-alveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromofóbico; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar e folicular; carcinoma esclerosante não encapsulante; carcinoma adrenal cortical; carcinoma endometoide; carcinoma de apêndice da pele;

adenocarcinoma apócrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células em anel de sinete; carcinoma do ducto infiltrado; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatório; doença de paget mamária; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma com metaplasia escamosa; timoma maligno; tumor estromal ovariano maligno; tecoma maligno; tumor de células da granulosa, maligno; androblastoma maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig maligno; tumor de células lipídicas maligno; paraganglioma maligno; paraganglioma extramamário, maligno; feocromocitoma; glomangiossarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de espalhamento superficial; melanoma maligno de lentigo; melanomas lentiginosos acrais; melanomas nodulares; melanoma maligno no nevo pigmentado gigante; melanoma de células epitelioides; nevo azul maligno; sarcoma; fibrossarcoma; histiocitoma fibroso maligno; mixossarcoma; lipossarcoma; leiomiossarcoma; rabdomiossarcoma; rabdomiossarcoma embrionário; rabdomiossarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor misto, maligno; tumor mulleriano misto; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesênquima maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filódico maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma maligno; disgerminoma; carcinoma embrionário; teratoma maligno; struma ovarii, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma maligno; hemangiossarcoma; hemangioendotelioma maligno; sarcoma de kaposi; hemangiopericitoma maligno; linfangiossarcoma; osteossarcoma; osteossarcoma justacortical; condrossarcoma; condroblastoma maligno; condrossarcoma mesenquimal; tumor de células gigantes do osso; sarcoma de ewing; tumor odontogênico maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma maligno; fibrossarcoma ameloblástico; pinealoma maligno; cordoma;

glioma maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplasmático; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebelar; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogênico olfativo; meningioma maligno; neurofibrossarcoma; neurilemmoma maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; doença de Hodgkin; Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno pequeno linfocítico; linfoma maligno de células grandes difuso; linfoma maligno folicular; micose fungoide; outros linfomas não Hodgkin especificados; Linfoma de células B; linfoma não Hodgkin (NHL) folicular de baixo grau; NHL linfocítico pequeno (SL); NHL de grau intermediário/folicular; NHL difuso de grau intermediário; NHL imunoblástico de alto grau; NHL linfoblástico de alto grau; NHL de células pequenas não clivadas de alto grau; doença volumosa NHL; linfoma de células do manto; linfoma relacionado à AIDS; Macroglobulinemia de Waldenstrom; histiocitose maligna; mieloma múltiplo; sarcoma de mastócitos; doença imunoproliferativa do intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia celular de linfossarcoma; leucemia mieloide; leucemia basofílica; leucemia eosinofílica; leucemia monocítica; leucemia de mastócitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; leucemia de células peludas; leucemia linfocítica crônica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); leucemia mieloide aguda (LMA); e leucemia mieloblástica crônica.

[0222]Para determinar a adequação das células aqui fornecidas para aplicações terapêuticas, as células podem primeiro ser testadas em um modelo animal adequado. Em um nível, as células são avaliadas quanto à sua capacidade de sobreviver e manter seu fenótipo *in vivo*. As células aqui fornecidas são administradas a animais imunodeficientes (como camundongos NOG, ou animais quimicamente imunodeficientes ou por irradiação) em um local propício para observação adicional, como sob a cápsula

renal, no baço, no lóbulo do fígado ou na medula óssea. Os tecidos são colhidos após um período de alguns dias a várias semanas ou mais e avaliados quanto à presença de tipos celulares iniciais, como eritrócitos. Isso pode ser realizado fornecendo às células administradas um marcador detectável (como proteína fluorescente verde ou β -galactosidase); ou medindo um marcador constitutivo específico para as células humanas administradas. Onde as células aqui fornecidas estão sendo testadas em um modelo de roedor, a presença e o fenótipo das células administradas podem ser avaliadas por imuno-histoquímica ou ELISA usando anticorpo específico para humanos, ou por análise RT-PCR usando primers e condições de hibridação que fazem com que a amplificação seja específica para sequências polinucleotídicas humanas. Marcadores adequados para avaliar a expressão gênica no nível de mRNA ou proteína são fornecidos em outras partes desta revelação.

[0223]As células imunológicas fornecidas pelos métodos da presente revelação podem ser testadas em vários modelos animais quanto à sua capacidade de tratar distúrbios e lesões hematológicas. Por exemplo, um modelo de camundongo com anemia falciforme ou um camundongo knockout para células T/B Rag-2 podem ser modelos animais particularmente úteis para testar as células mieloides e linfoides aqui divulgadas.

[0224]As células imunológicas fornecidas em certos aspectos da presente revelação que demonstram características funcionais ou eficácia desejáveis em modelos animais, também podem ser adequadas para administração direta a indivíduos humanos que dela necessitam. Para fins de hemostasia, as células podem ser administradas em qualquer local que tenha acesso adequado à circulação. As células hematopoiéticas ou seus precursores também podem ser entregues em um local de lesão ou doença.

[0225]As células fornecidas em certos aspectos desta revelação podem ser usadas para terapia de qualquer indivíduo que dela necessite. As condições humanas que

podem ser apropriadas para essa terapia incluem as várias anemias e hemoglobinopatias, além de doenças caracterizadas por um número reduzido de células hematopoiéticas (como, por exemplo, síndrome mielodisplásica, mielofibrose, neutropenia, agranulocitose, trombastenia de Glanzmann, trombocitopenia e síndrome da imunodeficiência adquirida). Para a terapia humana, a dose geralmente está entre cerca de 10^9 e 10^{12} células, e tipicamente entre cerca de 5×10^9 e 5×10^{10} células, fazendo ajustes para o peso corporal do indivíduo, natureza e gravidade da aflição e a capacidade replicativa das células administradas. A responsabilidade final pela determinação do modo de tratamento e da dose apropriada cabe ao clínico responsável.

[0226]Quantidades terapeuticamente eficazes de células imunológicas podem ser administradas por várias vias, incluindo administração parenteral, por exemplo, injeção intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal ou intra-articular ou infusão.

[0227]A quantidade terapeuticamente eficaz de células imunológicas para uso em terapia celular adotiva é a quantidade que alcança o efeito desejado em um indivíduo a ser tratado. Por exemplo, essa pode ser a quantidade de células imunológicas necessária para inibir o avanço ou causar regressão de uma doença autoimune ou aloimune, ou que é capaz de aliviar os sintomas causados por uma doença autoimune, como dor e inflamação. Pode ser a quantidade necessária para aliviar os sintomas associados à inflamação, como dor, edema e temperatura elevada. Também pode ser a quantidade necessária para diminuir ou impedir a rejeição de um órgão transplantado.

[0228]A população de células imunológicas pode ser administrada em regimes de tratamento consistentes com a doença, por exemplo, doses únicas ou poucas ao longo de um a vários dias para melhorar um estado da doença ou doses periódicas durante um período prolongado para inibir a progressão da doença e prevenir a recorrência da doença. A dose exata a ser empregada na formulação também dependerá da via de

administração e da gravidade da doença ou distúrbio, e deve ser decidida de acordo com o julgamento do médico e as circunstâncias de cada paciente. A quantidade terapêuticamente eficaz de células imunológicas dependerá do indivíduo a ser tratado, da gravidade e tipo da aflição e do modo de administração. Em algumas modalidades, as doses que poderiam ser usadas no tratamento de indivíduos humanos variam de pelo menos $3,8 \times 10^4$, pelo menos $3,8 \times 10^5$, pelo menos $3,8 \times 10^6$, pelo menos $3,8 \times 10^7$, pelo menos $3,8 \times 10^8$, pelo menos $3,8 \times 10^9$ ou pelo menos $3,8 \times 10^{10}$ células imunológicas/m². Em uma determinada modalidade, a dose utilizada no tratamento de seres humanos varia entre cerca de $3,8 \times 10^9$ a cerca de $3,8 \times 10^{10}$ células imunológicas/m². Em modalidades adicionais, uma quantidade terapêuticamente eficaz de células imunológicas pode variar de cerca de 5×10^6 células por kg de peso corporal a cerca de $7,5 \times 10^8$ células por kg de peso corporal, como cerca de 2×10^7 células a cerca de 5×10^8 células por kg de peso corporal, ou cerca de 5×10^7 células a cerca de 2×10^8 células por kg de peso corporal. A quantidade exata de células imunológicas é prontamente determinada por um versado na técnica com base na idade, peso, sexo e condição fisiológica do indivíduo. As doses efetivas podem ser extrapoladas a partir de curvas dose-resposta derivadas de sistemas de teste *in vitro* ou em modelo animal.

[0229]As células imunológicas podem ser administradas em combinação com um ou mais outros agentes terapêuticos para o tratamento do distúrbio imunomediado. As terapias combinadas podem incluir, mas não estão limitadas a, um ou mais agentes antimicrobianos (por exemplo, antibióticos, agentes antivirais e agentes antifúngicos), agentes antitumorais (por exemplo, fluorouracila, metotrexato, paclitaxel, fludarabina, etoposídeo, doxorrubicina ou vincristina), agentes depleção imune (por exemplo, fludarabina, etoposídeo, doxorrubicina ou vincristina), agentes imunossupressores (por exemplo, azatioprina ou glicocorticoides, como dexametasona ou prednisona), agentes

anti-inflamatórios (por exemplo, glicocorticoides como hidrocortisona, dexametasona ou prednisona ou agentes anti-inflamatórios não esteroides, como ácido acetilsalicílico, ibuprofeno ou naproxeno sódico), citocinas (por exemplo, interleucina-10 ou fator de crescimento transformador beta), hormônios (por exemplo, estrogênio) ou uma vacina. Além disso, agentes imunossupressores ou tolerogênicos, incluindo mas não limitados a inibidores de calcineurina (por exemplo, ciclosporina e tacrolimus); inibidores de mTOR (por exemplo, Rapamicina); micofenolato de mofetil, anticorpos (por exemplo, reconhecendo células CD3, CD4, CD40, CD154, CD45, IVIG ou B); agentes quimioterápicos (por exemplo, Metotrexato, Treosulfan, Busulfan); irradiação; ou quimiocinas, interleucinas ou seus inibidores (por exemplo, inibidores de BAFF, IL-2, anti-IL-2R, IL-4, JAK cinase) podem ser administrados. Tais agentes farmacêuticos adicionais podem ser administrados antes, durante ou após a administração das células imunológicas, dependendo do efeito desejado. Essa administração das células e do agente pode ser pela mesma rota ou por rotas diferentes, e no mesmo local ou em um local diferente.

C. Composições Farmacêuticas

[0230] Também são aqui fornecidas composições e formulações farmacêuticas compreendendo células imunológicas (por exemplo, células T ou células NK) e um veículo farmacêuticamente aceitável. A administração pode ser autóloga ou não autóloga. Por exemplo, células T e/ou células NK e composições compreendendo as mesmas podem ser obtidas de um indivíduo e administradas ao mesmo indivíduo ou a um indivíduo compatível diferente. As células imunológicas da presente revelação podem ser administradas via injeção localizada, incluindo administração de cateter, injeção sistêmica, injeção localizada, injeção intravenosa ou administração parentérica. Ao administrar uma

composição terapêutica da presente revelação, ela geralmente será formulada em uma forma injetável de dosagem unitária (por exemplo, solução, suspensão, emulsão).

[0231]As composições e formulações farmacêuticas como aqui descritas podem ser preparadas misturando os ingredientes ativos (como um anticorpo ou um polipeptídeo) com o grau de pureza desejado com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis opcionais (Remington's Pharmaceutical Sciences 22^a edição, 2012), em a forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os veículos farmacêuticamente aceitáveis são geralmente não tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregadas e incluem, mas não estão limitados a: tampões como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio; cloreto de benzetônio; fenol, butil ou álcool benzílico; parabenos alquil como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contraíons formadores de sal, como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos de proteínas Zn); e/ou surfactantes não iônicos, como polietilenoglicol (PEG). Veículos farmacêuticamente aceitáveis exemplificadores aqui incluem ainda agentes de dispersão de fármaco intersticiais, tais como glicoproteínas solúveis neutras-ativos de hialuronidase (sHASEGP), por exemplo, Ph-20 glicoproteínas hialuronidase solúveis em humanos, tais como rHuPH20 (Hylenex®, Baxter International, Inc.). Certos sHASEGPs e métodos de uso exemplificadores,

incluindo rHuPH20, são descritos nas Publicações de Patentes nºs US 2005/0260186 e 2006/0104968. Em um aspecto, um sHASEGP é combinado com uma ou mais glicosaminoglicanases adicionais, como condroitinases.

V. Exemplos

[0232]Os exemplos a seguir são incluídos para demonstrar modalidades preferidas da invenção. Deve ser apreciado por aqueles versados na técnica que as técnicas divulgadas nos exemplos a seguir representam técnicas descobertas pelo inventor para funcionar bem na prática da invenção e, portanto, podem ser consideradas como modos preferidos para sua prática. No entanto, aqueles versados na técnica devem, à luz da presente revelação, entender que muitas mudanças podem ser feitas nas modalidades específicas que são divulgadas e ainda obtêm um resultado semelhante ou semelhante sem se afastar do espírito e escopo da invenção.

Exemplo 1 - Derivação de células T/NK derivadas de PSC que expressam CAR anti-CD19

[0233]Para gerar células-tronco pluripotentes que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR), foram utilizados dois métodos separados. Em um método, as PSCs livres de transgene foram derivadas de células T usando vetores retrovirais para produzir células 1C (US20160257939; incorporadas aqui por referência na sua totalidade) ou vetores episossomais para produzir células E11. No segundo método, as PSCs foram transfectadas com um vetor de expressão PiggyBac que codifica os genes de programação hematopoiéticos ETV2/ERG, GATA2 e HOXA9 (ESCs H1 projetados com genes de programação hematopoiéticos ETV2-GATA2-HOXA9 (EGH) introduzidos por DOX induzíveis por DOX) para produzir células A16. As PSCs de ambos os métodos foram então geneticamente modificadas para expressar constitutivamente um receptor de antígeno quimérico CD19 anti-humano (CAR) de segunda geração composto pelo

domínio scFv de ligação a CD19 humano derivado de mAb FMC63, domínio coestimulador de CD28 e domínio de sinalização de CD3.

[0234]As PSCs não modificadas e CAR-modificadas foram diferenciadas em progenitores CD34⁺ T/NK por diferenciação dirigida a citocinas (1C, E11) ou programação induzida por EGH (A16) (Figuras 1A-B). Os progenitores isolados de CD34⁺ foram ainda diferenciados para células T CD3⁺ (1C, E11) e NK CD3-CD56⁺ (A16) usando cultura hipóxica de 4 semanas nas placas revestidas com DLL4/retronectina em StemSpan SFEM (Stem Cell Technologies) suplementado com ascórbico fosfato ácido de magnésio (0,25 mM), nicotinamida (2 mM) e citocinas (SCF, TPO, FLT3L, IL7, IL2). Em culturas T/NK paralelas, células Daudi tratadas com mitomicina C (linhagem celular linfoblastoide B CD19⁺ negativa de HLA de classe I deficiente de β 2-microglobulina) foram adicionados durante as últimas 2 semanas de diferenciação como uma fonte de ativação de CAR específico ao antígeno (CD19). As células T/NK geradas foram designadas como se segue: células T derivadas de 1C ou E11 - T, CAR-T, CAR-T/Ag (cocultura Daudi); células NK derivadas de A16 - NK, CAR-NK, CAR-NK/Ag (cocultura Daudi).

[0235]A expressão do CAR ao longo dos estágios de diferenciação foi avaliada por citometria de fluxo usando coloração com proteína L. As células T CD3⁺ foram coroadas com mAb CD3 anti-humano de camundongo de cadeia lambda (clone SP34-2). Após a diferenciação das células T/NK, a expressão do CAR foi significativamente silenciada, no entanto, as células T e NK positivas para CAR puderam ser seletivamente expandidas após a cultura de ativação com o antígeno específico do CAR (Ag; cocultura com células Daudi CD19⁺).

[0236]A função citotóxica das células T (1C) e NK (A16) derivadas de PSC foi avaliada por um ensaio de citotoxicidade *in vitro* usando células-alvo CD19⁺ Daudi e Raji que expressam luciferase. Os alvos foram incubados com efetores T/NK 24 horas na

razão de 1:1 e a atividade da luciferase foi quantificada em lisados de cultura pelo sistema de ensaio Steady-Glo luciferase (Promega). A porcentagem de citotoxicidade foi calculada pela fórmula: $(1 - (ET/T)) \times 100$, onde ET – efetores+cultura de alvos, T - apenas alvos.

[0237] Enquanto as células T/NK não modificadas não apresentavam atividade detectável, as células T (1C) e NK (A16) que expressam CAR exibiram citotoxicidade contra os alvos CD19⁺. A atividade citotóxica dependente de CAR foi aumentada significativamente após 2 semanas de cocultura T/NK com células-alvo CD19⁺ (Daudi) (variante CAR/Ag) (Figura 3A).

[0238] O potencial citolítico das células CAR-T foi confirmado por contagem de células-alvo em tempo real usando o sistema de análise de células vivas Incucyte S3 (Essen Bioscience). As células-alvo Raji CD19⁺ que expressam GFP foram incubadas com células T derivadas de PSC (E11 TiPSC) não modificadas e transfectadas com CAR, na razão de 1:1. A imagem por lapso de tempo e a contagem de células Raji GFP⁺ foram realizadas durante 9 horas. Uma diminuição significativa de células Raji viáveis (GFP⁺) foi detectada em cultura apenas com células CAR-T (Figura 3B).

[0239] As células CAR-T que foram geradas pela diferenciação de T/NK de 2 semanas seguida por 1 semana de culturas de expansão de células T induzidas por anti-CD3 de HPCs CD34⁺ derivadas de PSC (E11 TiPSC) foram incubadas 24 horas com células de mastocitoma P815 de camundongo transfectadas com antígeno CD19 humano (CD19⁺ P815) e P815 não transfectado para avaliar a produção de citocinas constitutiva e induzida por CAR, respectivamente. As citocinas foram medidas em sobrenadantes da cultura utilizando o teste de citocina multiplexada por citometria de fluxo LEGENDplex (BioLegend) (Figura 4). Células CAR-T demonstraram produção induzida por CAR específico de IFN γ , TNF α , IL2, IL13 e GM-CSF. As propriedades citotóxicas das células

CAR-T derivadas de PSC também foram reveladas pela secreção constitutiva de Granzima B.

[0240]Para testar a eficácia das células CAR-T *in vivo*, camundongos NSG de 8 semanas de idade foram injetados intraperitonealmente (ip) com 5×10^4 células Raji que expressam luciferase. No dia seguinte (dia 1), células T (derivadas de 1C) e NK (derivadas de A16) foram injetadas (ip) a uma dose de 10^7 /camundongo. As injeções de T/NK foram repetidas nos dias 3 e 5. Durante as injeções de T/NK (dias 1-5), todos os camundongos foram adicionalmente injetados (ip) com a combinação de citocinas IL2 e IL15 (ambas a 500 ng/camundongo). A progressão do tumor em camundongos foi monitorada por imagem bioluminescente *in vivo* a cada 2 semanas (Figura 5A). Os camundongos anestesiados injetados (ip) com 150 mg/kg de luciferina InVivo-Glo (Promega) foram analisados dentro de 15 minutos após a injeção de luciferina usando o imageador *in vivo* Pearl Trilogy (LiCor). As curvas de sobrevivência nos diferentes grupos de camundongos tratados com células T (1C) ou NK (A16) derivadas de PSC são mostradas na Figura 5B.

[0241]Os tumores detectados em 2 semanas foram significativamente suprimidos e a sobrevida média dos camundongos foi ~ 2x prolongada por um curso de tratamento (3 injeções com intervalos de 2 dias) com células T ou NK derivadas de PSC que expressam CAR. O potencial oncolítico *in vivo* pode ser significativamente melhorado por cocultura anterior de células T ou NK derivadas de PSC que expressam CAR e células tumorais positivas para antígeno *in vitro*.

Exemplo 2 - Métodos de diferenciação direta

[0242]Diferenciação de PCS para progenitores linfo-hematopoiéticos CD34⁺: As PSCs derivadas de células T do Exemplo 1 (TiPSCs 1C e E11 derivadas de células T de sangue periférico por reprogramação retroviral e epissomal, respectivamente) foram

diferenciadas para progenitores hematopoiéticos CD34⁺ através de cultura de suspensão agregada. As PSCs foram mantidas sob condições livres de alimentador nas placas de 6 poços revestidas com Matrigel™ ou Vitronectina em meio Essential 8 (E8). Os agregados foram feitos a partir de unidades subconfluentes (<80% de confluência) a uma densidade de 0,5 milhões de células por ml em meio E8 suplementado com 2 µM de CHIR99021 (inibidor de GSK-3) e 5 µM de blebistatina (inibidor da miosina-II). A formação agregada foi realizada durante 6 horas de cultura nos frascos de fixação ultrabaixa (ULA) sob agitação contínua na plataforma oscilante a 15 a 20 rpm (incluindo todas as etapas de cultura subsequentes).

[0243]A cultura com agregados de células de pré-formados foi gradualmente transferida para meio de diferenciação hematopoiética sem soro (HDM: meio 50% de IMDM, 50% de Hams F12, 100 µg/ml de álcool polivinílico, 100 µg/ml de albumina de soro humano recombinante, 1x de suplemento de aminoácido não essencial (Invitrogen), 0,1x de suplemento lipídico quimicamente definido (Invitrogen), ácido ascórbico 125 µM de 2-fosfato de magnésio, 0,25 µM de ácido linoleico, suplementos de oligoelementos A (0,3x), B (0,2x) e C (0,1x) (Corning), 5 mM de cloreto de sódio, 100 µM monotioglicerol, 20 µM de etanolamina, 100 ng de heparina/ml, e 10 ng/ml IGF-1), suplementado com 2 µM CHIR99021, 50 ng/ml de VEGF e 50 ng/ml de FGF2 por adições de volumes médios iguais às 6 e 24 horas. No dia 2, os agregados celulares foram sedimentados por 15 minutos, o meio foi aspirado e as culturas foram transferidas para HDM suplementado com citocinas indutoras de mesoderme hematopoiética - 25 ng/ml de BMP4, 50 ng/ml de BMP4, 50 ng/ml de VEGF e 50 ng/ml de FGF2. As culturas foram continuadas por 3 dias com mudança de meio completo todos os dias.

[0244]Para apoiar a diferenciação e expansão dos progenitores hematopoiéticos CD34⁺, os agregados celulares foram transferidos para o HDM suplementado com

citocinas de suporte hematopoiéticas - 50 ng/ml de SCF, 50 ng/ml de TPO, 50 ng/ml de TPO, 20 ng/ml de FLT3L e 20 ng/ml de IL-3. As culturas foram continuadas por 3 a 5 dias com mudança de meio completo todos os dias. Para melhorar o processo de transição hematopoiética, os seguintes componentes de aprimoramento podem ser adicionados: IL11 (5-20 ng/ml), 8Br-cAMP (100 a 300 μ M) e/ou VEGF (20 a 50 ng/ml).

[0245]As HPCs identificadas em suspensão como células individuais flutuantes ou pequenos grupos foram colhidas após o processo de diferenciação de 2+3+3-5 dias (total de 8 a 10 dias). HPCs foram isolados por filtração de toda a cultura de diferenciação através de coadores de células de 70 μ m e 30 μ m (Corning). As HPCs coletadas do filtrado por centrifugação foram lavadas uma vez em HDM e ressuspensas em TCDM (meio de diferenciação de células T). Para enriquecer as HPCs com potencial T/NK, o isolamento da fração CD34⁺ HPC pode ser realizado por classificação celular ativada por ímã (MACS), utilizando microesferas CD34 diretas (Myltenyi Biotec), de acordo com as recomendações do fabricante. As HPCs foram semeadas em culturas de diferenciação T/NK ou criopreservadas para uso posterior dentro de 1 hora após o isolamento.

[0246]Culturas de diferenciação T/NK: Para a diferenciação T/NK, placas de plástico tratadas com cultura de não tecido foram revestidas com proteína química ligando Notch hDLL4-Fc e RetroNectin diluída em PBS (a 0,5 μ g/cm² cada). Antes do revestimento celular, a solução de revestimento foi aspirada, as placas lavadas uma vez com PBS e preenchidas com 0,25 ml/cm² de meio de diferenciação de células T (TCDM) consistindo em StemSpan SFEM (Stem Cell Technologies), GlutaMax (1/100), fosfato de magnésio e ácido ascórbico (250 μ M), nicotinamida (2 mM) e citocinas SCF, TPO, FLT3L e IL7 (a 50 ng/ml cada). HPCs derivadas de PSC foram colocadas em placas a 5.000 células/cm² de densidade e cultivadas em hipóxico (5% de O₂) incubadora de CO₂ durante 2 semanas, com a adição de volume de cultura TCDM igual no dia 3 e a troca de

um volume de cultura de metade a cada segundo dia seguinte. O total de células diferenciadas foi colhido por ressuspensão suave e coleta de células não aderentes, seguida por coleta de células pouco aderidas por 5 a 10 minutos de tratamento com PBS-EDTA (0,5 mM). Para continuar o processo de diferenciação e melhorar o rendimento das células T/NK, a cultura de diferenciação das células T pode ser repetida replaqueando as células colhidas em placas DLL4/retronectina recém-preparadas a 10.000 células/cm² de densidade, até o rendimento desejado de T/NK células é alcançada. A eficiência da diferenciação T/NK também pode ser melhorada pela adição dos seguintes componentes aprimoradores ao TCDM: CHIR99021 (1 a 3 µM), IL2 (2 a 10 ng/ml), IL12 (10 a 50 ng/ml).

[0247]Culturas de expansão de células T: Para a expansão de células T, as placas de cultura tratada não tecida foram revestidas com mAb anti-CD3 (clone OKT3), hDLL4-Fc e RetroNectina diluída em PBS (a 0,5 µg/cm² cada). Antes do revestimento celular, a solução de revestimento foi aspirada, as placas lavadas uma vez com PBS e preenchidas com 0,25 ml/cm² de meio de expansão de células T (TCEM) consistindo em StemSpan SFEM (Stem Cell Technologies), Glutamax (1/100), fosfato de magnésio e ácido ascórbico (250 µM), nicotinamida (2 mM) e citocinas SCF, TPO, FLT3L, IL7 (a 50 ng/ml cada) e IL2, IL15 (a 10 ng/ml cada). Também foi possível adicionar IL21 (5 a 20 ng/ml) para melhorar a expansão. As células colhidas a partir de culturas de diferenciação T/NK foram plaqueadas a 10.000 células/cm² de densidade e cultivadas em incubadora CO₂ hipóxica (5% de O₂) até 2 semanas com adição do volume de cultura TCEM igual no dia 3 e a troca de um volume de meio volume de cultura todo segundo dia seguinte. As células T expandidas foram colhidas por ressuspensão suave e coleta de células não aderentes.

Exemplo 3 - Caracterização do método de diferenciação direta

[0248]As PSCs foram primeiramente diferenciadas para CD34⁺ HPCs em cultura de agregados de células em suspensão através de etapas sucessivas de iniciação de diferenciação induzida por WNT, indução de mesoderme e diferenciação de HPC durante 8 a 10 dias (Figura 1B). A fração de HPC foi isolada por filtração. Não foi realizada a classificação de MACs de CD34⁺ HPCs, embora possa ser opcionalmente realizada utilizando esferas paramagnéticas CD34 diretas (Myltenyi Biotec). As HPCs foram então transferidas para placas revestidas com DLL4-Fc⁺ retronectina humana para diferenciação de T/NK durante 2 a 4 semanas. As células T podem ainda ser expandidas durante 1 a 2 semanas em cultura nas placas revestidas com mAb anti-CD3 (clone OKT3).

[0249]As células CD34⁺ derivadas de PSC (1C TiPSC) após 2 semanas em condições de diferenciação de T/NK desenvolveram uma população típica de células linfoides definida por parâmetros FSC/SSC baixos (Figura 1D, plotagem de pontos esquerda). Essa população linfóide continha principalmente células T CD3⁺ e NK CD56⁺ CD3⁻ (Figura 1D, plotagem de pontos do meio). A população de células T incluía células simples e duplas positivas para CD4⁺ e CD8⁺, bem como uma proporção significativa de células duplas negativas (Figura 1D, gráfico de pontos à direita).

[0250]Os rendimentos de cada tipo de célula respectivo foram calculados como uma razão de saída para inserir números absolutos de células em cada estágio da derivação celular. Por exemplo, o rendimento de 1,5 CD34⁺ HPC indica que, em média, 1,5 (saída) CD34⁺ HPCs podem ser derivadas de 1 (entrada) PSC. Por conseguinte, o rendimento de 102 células T indica que 102 células T (de saída) podem ser derivadas de 1 (entrada) CD34⁺ HPCs (Figura 1E).

[0251]As células T derivadas de PSC (1C TiPSC) (CD3⁺) foram diferenciadas e expandidas durante 4 semanas e expressaram α/β TCR (não γ/δ ou invariante V α 24 NKT TCR) e marcadores típicos de células T CD5, CD27 e CD7 (Figura 1F). Eles também

expressaram marcadores citotóxicos associados a T/NK (CD161, CD94) e de ativação (CD69).

[0252]Os anticorpos anti-CD3 imobilizados (iCD3) foram minimamente necessários e suficientes para alcançar a expansão de células T derivadas de PSC (Figura 1G, gráfico de barras). A estimulação solúvel com mAb de CD3 e CD28 (sCD3, sCD28) não foi eficaz isoladamente ou em combinação (sCD3+ sCD28) ou quando adicionada à iCD3 (iCD3+ sCD28). As células T que proliferam nas culturas de expansão adquiriram uma morfologia característica de linfoblastos de formato irregular (Figura 1G, fotografia). Em contraste com a população de células de entrada relativamente heterogênea, as células colhidas a partir das 2 semanas de expansão de células T eram essencialmente células T CD3⁺ puras, que também expressavam CD56 e adquiriam expressão CD8 (Figura 1G, gráficos de pontos de citometria de fluxo). Assim, o método de diferenciação dirigida produziu células T eficientemente.

** *

[0253]Todos os métodos divulgados e reivindicados neste documento podem ser feitos e executados sem experimentação indevida à luz da presente revelação. Embora as composições e métodos desta invenção tenham sido descritos em termos de modalidades preferenciais, será evidente para os versados na técnica que variações podem ser aplicadas aos métodos e nas etapas ou na sequência de etapas do método descrito aqui sem se afastar do conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, será aparente que certos agentes que estão relacionados quimicamente e fisiologicamente podem ser substituídos pelos agentes aqui descritos, enquanto os mesmos ou semelhantes resultados seriam alcançados. Todos esses substitutos e modificações semelhantes aparentes para os versados na técnica são considerados dentro do espírito, escopo e conceito da invenção, conforme definido pelas reivindicações anexas.

Referências

As referências a seguir, na medida em que fornecem detalhes processuais ou outros exemplos exemplificadores complementares aos aqui estabelecidos, são especificamente incorporadas aqui por referência.

Akkina *et al.*, *J. Virol.*, 70:2581-2585, 1996.

Alexander *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85:5092-5096, 1988.

Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., MA, 1996.

Biswas *et al.*, *Annals NY Acad. Sci.*, 590:582-583, 1990.

Biswas, *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 29:2228-2233, 1991.

Blomer *et al.*, *J. Virol.*, 71(9):6641-6649, 1997.

Chen e Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.

Chen *et al.*, *Nature Methods* 8:424-429, 2011.

Chothia *et al.*, *EMBO J.* 7:3745, 1988.

Doulatov *et al.*, *Cell Stem Cell.* 10:120-36, 2012.

Ercolani *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:15335-15341, 1988.

Evans, *et al.*, *In: Cancer Principles and Practice of Oncology*, Devita *et al.* (Eds.), Lippincot-Raven, NY, 1054-1087, 1997.

Fechheimer *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.

Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.

Frisan *et al.*, *Epstein-Barr Virus Protocols*, Part III, 125-127, 2001

Furie e Furie, *Cell* 53: 505-518, 1988.

Graham e Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.

Publicação Internacional nº WO 2007/069666

Publicação Internacional nº PCT/US2016/057893

- Publicação Internacional nº PCT/US2016/057899
- Publicação Internacional nº WO 94/09699
- Publicação Internacional nº WO 95/06128
- Publicação Internacional nº WO 96/39487
- Jores *et al.*, *PNAS U.S.A.* 87:9138, 1990.
- Kaepler *et al.*, *Plant Cell Reports* 9: 415-418, 1990.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Karin *et al.* *Cell*, 36:371-379, 1989.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kim *et al.*, *J. Virol.*, 66:3879-3882, 1992.
- Knust *et al.*, *EMBO J.* 761-766, 1987.
- Ladi *et al.*, *Nature Immunology*, 7: 338 – 343, 2006.
- Langle-Rouault *et al.*, *J. Virol.*, 72(7):6181–6185, 1998.
- Lefranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27:55, 2003.
- Levitskaya *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(23):12616–12621, 1997.
- Linnemann, C. *et al.* *Nat Med* 21, 81–85, 2015.
- Ludwig *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 24(2):185-187, 2006b.
- Ludwig *et al.*, *Nat. Methods*, 3(8):637-46, 2006a.
- Macejak e Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Maniatis, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.
- Nabel *et al.*, *Science*, 244(4910):1342-1344, 1989.
- Naldini *et al.*, *Science*, 272(5259):263-267, 1996. Zufferey *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 15(9):871-875,

Ng, *Nuc. Acid Res.*, 17:601-615, 1989.

Nicola, *et al.*, *Blood*, 54:614-627, 1979.

Nicolas e Rubenstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Lab. Press, 2001.

Rodriguez e Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, páginas 494-513, 1988.

Nicolau e Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.

Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.

Notta *et al.*, *Science*, 218-221, 2011.

Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.

Publicação de Patente nº EP1507865

Pelletier e Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.

Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, **199(2)**:169-177, 1985.

Potter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.

Quitsche *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:9539-9545, 1989.

Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd edition, 2012.

Reubinoff *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 18:399-404, 2000.

Richards *et al.*, *Cell*, 37:263-272, 1984.

Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.

Sambrook e Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. Cold Spring Harbor 1997.

Suzuki *et al.*, *EMBO J.* 6:1891-1897, 1987.

Takahashi *et al.*, *Cell*, 131:861-872, 2007.

Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.

Thomson e Marshall, *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38:133-165, 1998.

Thomson e Odorico, *J. Trends. Biotechnol.*, 18:53-57, 2000.

Thomson et al. Proc. Natl. Acad. Scie. USA, 92:7844-7848, 1995.

Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.

Pedido de Patente nº US 08/464.599

Pedido de Patente nº US 12/715.136

Pedido de Patente nº US 61/088.054

Patente nº US 4.683.202

Patente nº US 5.030.015

Patente nº US 5.302.523

Patente nº US 5.322.783

Patente nº US 5.384.253

Patente nº US 5.464.765

Patente nº US 5.486.359

Patente nº US 5.538.877

Patente nº US 5.538.880

Patente nº US 5.550.318

Patente nº US 5.556.954

Patente nº US 5.563.055

Patente nº US 5.580.859

Patente nº US 5.589.466

Patente nº US 5.591.616

Patente nº US 5.610.042

Patente nº US 5.656.610

Patente nº US 5.702.932

Patente nº US 5.736.524

Patente nº US 5.780.448

Patente nº US 5.789.215

Patente nº US 5.843.780

Patente nº US 5.843.780

Patente nº US 5.928.906

Patente nº US 5.945.100

Patente nº US 5.981.274

Patente nº US 5.994.136

Patente nº US 5.994.624

Patente nº US 6.013.516

Patente nº US 6.200.806

Patente nº US 6.225.042

Patente nº US 6.355.479

Patente nº US 6.362.001

Patente nº US 6.544.518

Patente nº US 6.790.662

Patente nº US 7.029.913

Patente nº US 8.058.065

Patente nº US 8.129.187

Patente nº US 8.268.620

Patente nº US 8.268.620

Patente nº US 8.372.642

Patente nº US 8.741.648

Publicação de Patente nº US 20020055144

Publicação de Patente nº US 20050260186

Publicação de Patente nº US 20060104968

Publicação de Patente nº US 20090148425

Publicação de Patente nº US 20090246875

Publicação de Patente nº US 2010/0210014

Publicação de Patente nº US 20120276636

Publicação de Patente nº US 2014/0315304

Publicação de Patente nº US 20160257939

Wilson et al., *Nature Reviews Immunology*, 9: 91-105, 2009.

Wilson *et al.*, *Science*, 244:1344-1346, 1989.

Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.

Wynn, *Nature Immunology*, 6:1069 – 1070, 2005.

Xu *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 19:971-974, 2001.

Yamanaka *et al.*, *Cell*, 131(5):861-72, 2007

REIVINDICAÇÕES:

1. Método para produzir células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) projetar células-tronco pluripotentes (PSCs) para expressar um receptor de antígeno quimérico (CAR), produzindo, assim, PS-PSCs;

(b) diferenciar ou programar antecipadamente os CAR-PSCs para células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺ (HPCs);

(c) diferenciar adicionalmente as HPCs CD34⁺ em células T e/ou células NK; e

(d) expandir as células T e/ou células NK, em que a expansão compreende cocultura com células-alvo antígeno-específicas, produzindo desse modo células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as PSCs da etapa (a) são células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) ou células-tronco embrionárias (ESCs).

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as iPSCs são reprogramadas a partir de células T.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa (b) compreende realizar diferenciação direta.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a diferenciação direta compreende:

(a) gerar corpos embrionários (EBs) na presença de blebistatina, um inibidor da GSK-3, FGF2 e VEGF;

(b) colocar em contato os EBs com BMP-4, VEGF e FGF2 para induzir a indução de mesoderme; e

(c) diferenciar os EBs na presença do ligante Flt-3, IL3, SCF e TPO, produzindo HPCs.

6.Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a diferenciação da etapa (c) é essencialmente livre de BMP4.

7.Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a diferenciação da etapa (c) está livre de BMP4.

8.Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a diferenciação da etapa (c) compreende ainda a presença de IL-11, cAMP e/ou VEGF.

9.Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a diferenciação da etapa (c) compreende ainda a presença de IL-11, cAMP e VEGF.

10.Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o inibidor de GSK-3 é CHIR99021.

11.Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a diferenciação direta compreende:

(a) cultivar PSCs individualizadas em uma superfície revestida com amina na presença de blebistatina, BMP4, VEGF e bFGF;

(b) iniciar a diferenciação colocando em contato as PSCs com BMP-4, VEGF e FGF2; e

(c) diferenciar adicionalmente as PSCs na presença do ligante Flt-3, IL3, IL6, SCF, TPO e heparina, produzindo assim HPCs,

em que o método não compreende a formação de EBs.

12.Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as PSCs são essencialmente livres de transgene.

13.Método, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as PSCs são humanas.

14.Método, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células T são células T CD4⁺, células T CD8⁺, células T citotóxicas, células T reguladoras, células T natural killer, células T ingênuas, células T de memória ou células T gama delta.

15.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as PSCs da etapa (a) são adicionalmente projetadas para expressar ERG/ETV2, GATA2 e HOXA9 sob o controle de um único promotor indutível.

16.Método, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda manipular PSCs para expressar HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1 e HOXA4.

17.Método, de acordo com a reivindicação 15 ou reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a programação da etapa (b) compreende a indução da expressão de ERG/ETV2, GATA2 e HOXA9 por um período de tempo suficiente para produzir HPCs e terminar a indução da expressão antes da etapa (c).

18.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o método compreende cultivar as células sob condições definidas sem alimentador.

19.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa (b) compreende ainda a seleção de células que expressam CD34 e CD43 antes da diferenciação para células T e/ou células NK antígeno-específicas.

20.Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a seleção compreende realizar a classificação de células magneticamente ativadas (MACS).

21.Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células que expressam CD34 e CD43 compreendem pelo menos 35% da população total de células.

22.Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células que expressam CD34 e CD43 compreendem pelo menos 65% da população total de células.

23.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos 5% das HPCs expressam o CAR.

24.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos 10% das HPCs expressam o CAR.

25.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos 15% das HPCs expressam o CAR.

26.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a diferenciação da etapa (c) compreende a cultura de HPCs em uma superfície revestida com retronectina e Notch DLL-4 na presença de ácido ascórbico e nicotinamida em condições hipóxicas.

27.Método, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a cultura compreende ainda SCF, ligante FLT-3, TPO e IL7.

28.Método, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a cultura compreende ainda um inibidor de GSK-3, IL-2 e/ou IL-12.

29.Método, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a cultura compreende ainda um inibidor de GSK-3, IL-2 e IL-12.

30.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a expansão da etapa (d) compreende ainda a cultura de células T antígeno-específicas na presença de anticorpo anti-CD3, IL-2 e IL-15.

31.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a expansão da etapa (d) compreende ainda a cultura de células T antígeno-específicas na presença de anticorpo anti-CD3, IL-2, IL-15 e IL-21.

32.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a expansão da etapa (d) compreende ainda a cultura das células T antígeno-específicas na presença de anticorpo anti-CD3, ligante FLT3, IL-7, IL-2, IL-15 e/ou IL-21.

33.Método, de acordo com a reivindicação 33, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a expansão da etapa (d) compreende ainda um ou dois componentes adicionais selecionados a partir do grupo que consiste em SCF e TPO.

34.Método, de acordo com a reivindicação 26, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos 1,5% das CD34⁺ HPC diferenciadas são células T CD3⁺ CAR⁺.

35.Método, de acordo com a reivindicação 26, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos 2% das CD34⁺ HPC diferenciadas são células NK CD3⁻ CAR⁺.

36.Método, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos 2% das CD34⁺ HPCs expandidas são células T CD3⁺ CAR⁺.

37.Método, de acordo com a reivindicação 26, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos 10% das CD34⁺ HPCs expandidas são células NK CD3⁻ CAR⁺.

38. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o CAR e as células-alvo antígeno-específicas são direcionadas para o mesmo antígeno.

39.Método, de acordo com a reivindicação 38, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o antígeno é CD19.

40.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que as células-alvo antígeno-específicas são células tumorais.

41.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que as células-alvo antígeno-específicas são humanas.

42.Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 41, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células-alvo antígeno-específicas são HLA classe I negativas.

43.Método, de acordo com a reivindicação 42, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos 5% das células T efetoras antígeno-específicas exibem atividade citotóxica contra células-alvo.

44.Método, de acordo com a reivindicação 42, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos 40 por cento das células NK efetoras antígeno-específicas exibem atividade citotóxica contra células-alvo.

45.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o CAR é codificado pelo DNA integrado ao genoma das PSCs.

46.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o CAR compreende um domínio de sinalização intracelular, um domínio transmembranar e um domínio extracelular compreendendo uma região de ligação ao antígeno.

47.Método, de acordo com a reivindicação 46, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os domínios de sinalização intracelular compreendem CD3 ζ e CD28.

48.Método, de acordo com a reivindicação 46, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região de ligação ao antígeno é um F(ab')₂, Fab', Fab, Fv ou scFv.

49.Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as PSCs são HLA homozigotas.

50.Método, de acordo com a reivindicação 49, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as PSCs homozigotas de HLA são homozigotas para um ou mais alelos dos loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ.

51.Método, de acordo com a reivindicação 49, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as PSCs homozigotas de HLA são homozigotas para dois dos alelos dos loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ.

52.Método, de acordo com a reivindicação 51, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as PSCs homozigotas de HLA são homozigotas para HLA-A e HLA-B.

53.Método, de acordo com a reivindicação 49, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as PSCs homozigotas de HLA são homozigotas para HLA-A, HLA-B e HLA-C.

54.Método para produzir células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

- (a) projetar PSCs para expressar um CAR, produzindo, assim, CAR-PSCs;
- (b) cultivar as CAR-PSCs na presença de blebistatina, um inibidor da GSK-3, FGF2 e VEGF, gerando assim EBs;
- (c) colocar em contato os EBs com BMP-4, VEGF e FGF2 para induzir a indução de mesoderme;
- (d) diferenciar os EBs na presença do ligante Flt-3, IL3, SCF e TPO, produzindo assim CDC⁺ HPCs;
- (e) diferenciar adicionalmente as CD34⁺ HPCs em células T e/ou células NK; e
- (f) expandir as células T e/ou células NK, em que a expansão compreende cocultura com células-alvo antígeno-específicas, produzindo desse modo células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas.

55.Método, de acordo com a reivindicação 54, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o inibidor de GSK-3 é CHIR99021.

56.Método para produzir células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

- (a) projetar PSCs para expressar um CAR, produzindo, assim, PS-CAR;

(b) cultivar CAR-PSCs individualizadas em uma superfície revestida com amina na presença de blebistatina, BMP4, VEGF e bFGF;

(c) iniciar a diferenciação colocando em contato os CAR-PSCs com BMP-4, VEGF e FGF2;

(d) diferenciar adicionalmente as CAR-PSCs na presença do ligante Flt-3, IL3, IL6, SCF, TPO e heparina, produzindo assim HPCs;

(e) diferenciar as HPCs para células T e/ou células NK; e

(f) expandir as células T e/ou células NK, em que a expansão compreende cocultura com células-alvo antígeno-específicas, produzindo assim células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas,

em que o método não compreende a formação de EBs.

57.Método para produzir células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas

CARACTERIZADO pelo fato de que compreende:

(a) projetar PSCs para expressar um CAR, produzindo, assim, CAR-PSCs;

(b) diferenciar os CAR-PSCs das CD34⁺ HPCs;

(c) selecionar para CD34⁺ CD43⁺ HPCs;

(d) diferenciar adicionalmente as HPCs CD34⁺ CD43⁺ para células T e/ou células NK; e

(e) expandir as células T e/ou células NK, em que a expansão compreende cocultura com células-alvo antígeno-específicas, produzindo assim células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas.

58.População de células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas

CARACTERIZADA pelo fato de que é produzida de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 57.

59.Composição farmacêutica **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende as células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas produzidas de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 57.

60.Composição **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende as células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas produzidas de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 57 para o tratamento de câncer em um indivíduo.

61.Método para tratamento de câncer em um indivíduo **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade eficaz de células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas produzidas de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58 ao indivíduo.

62.Método, de acordo com a reivindicação 61, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o câncer expressa um antígeno tumoral e as células T e/ou células NK efectoras antígeno-específicas são direcionadas ao dito antígeno tumoral.

63.Método, de acordo com a reivindicação 61, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o indivíduo é humano.

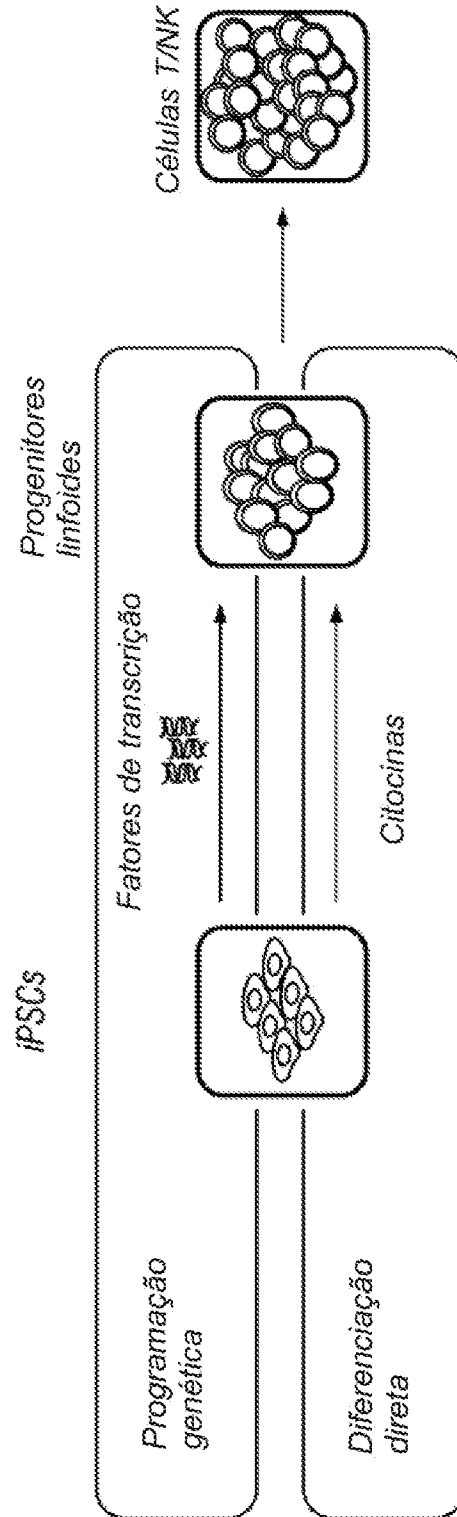


FIG. 1A

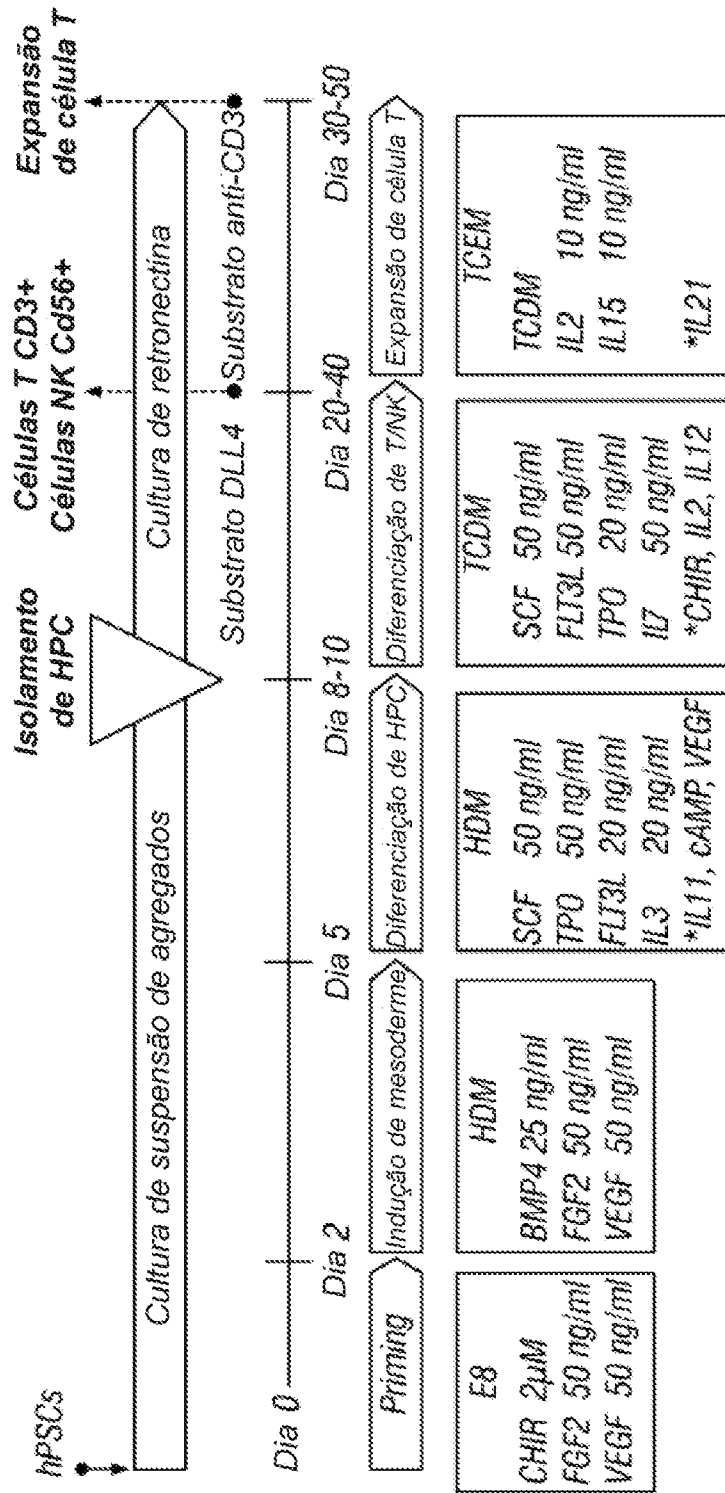


FIG. 1B

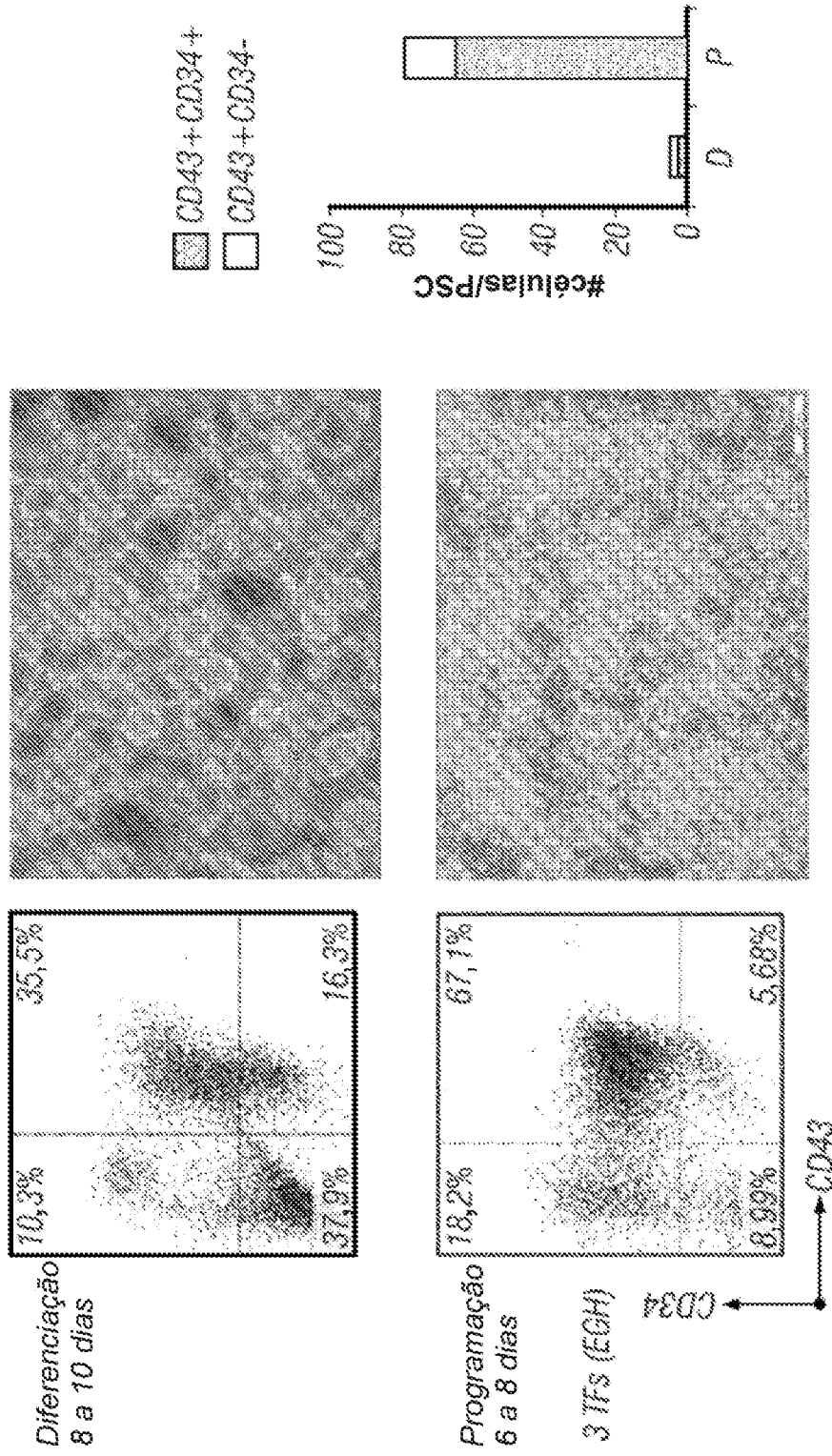


FIG. 1C

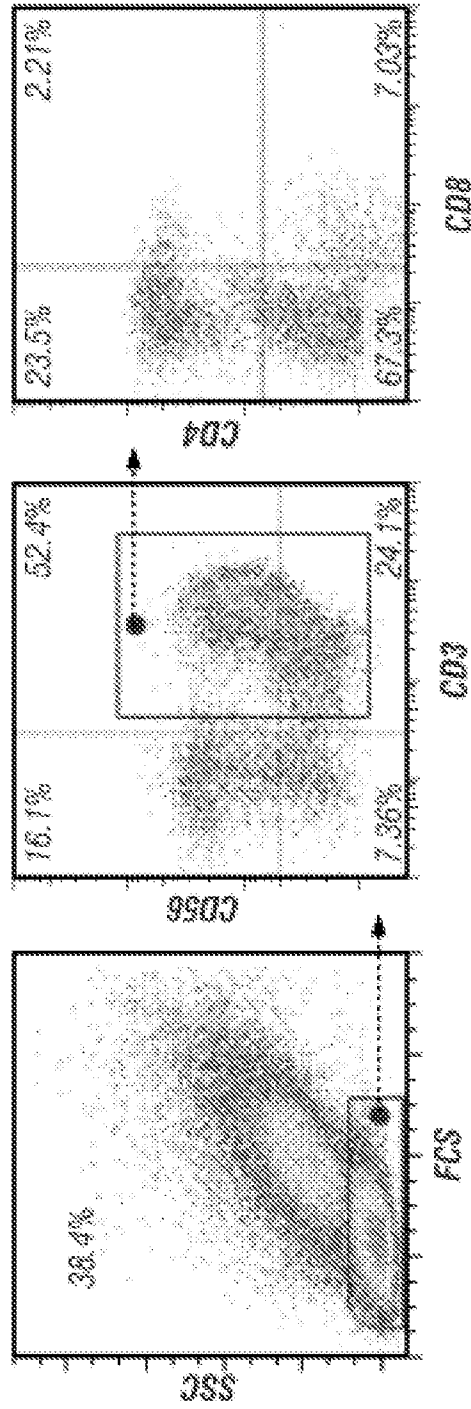


FIG. 1D

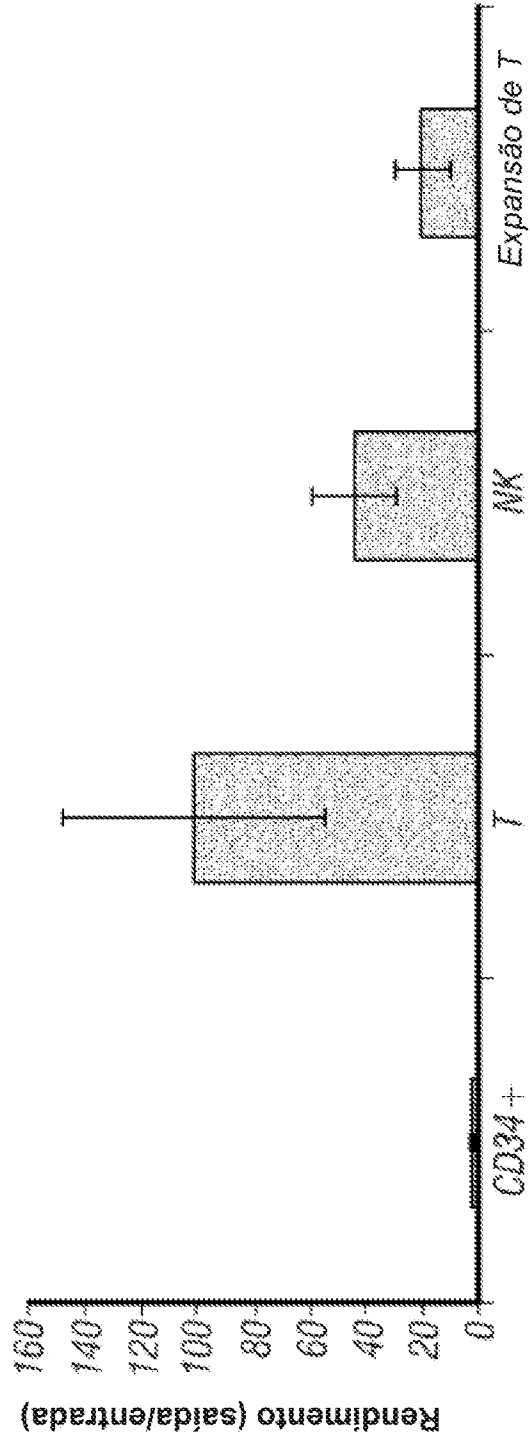


FIG. 1E

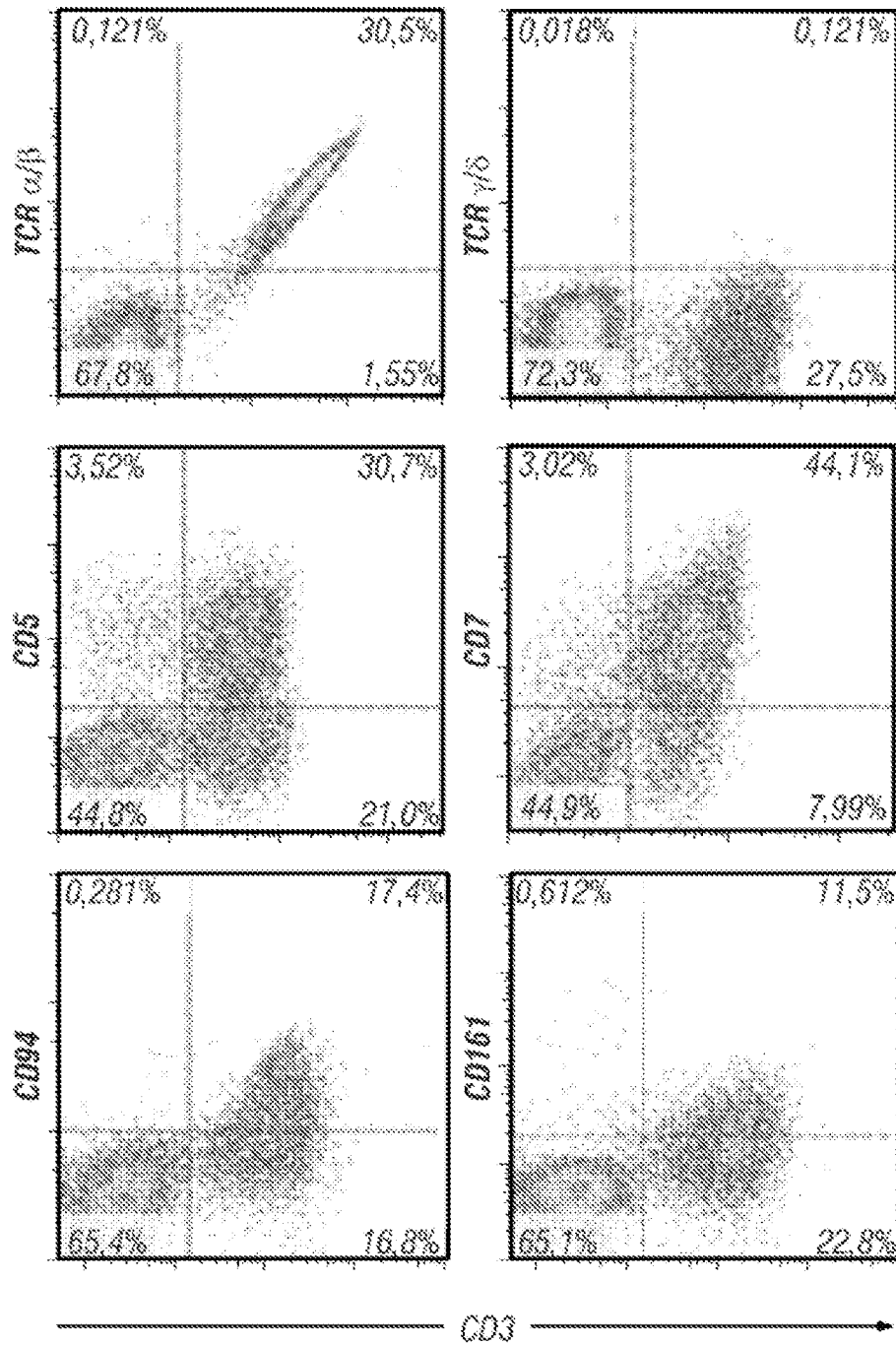


FIG. 1F

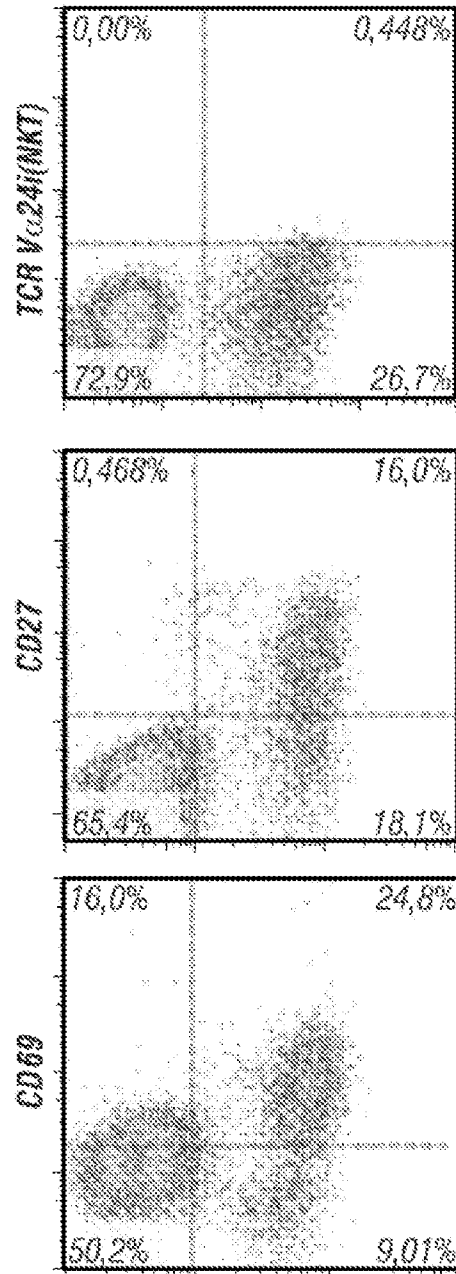
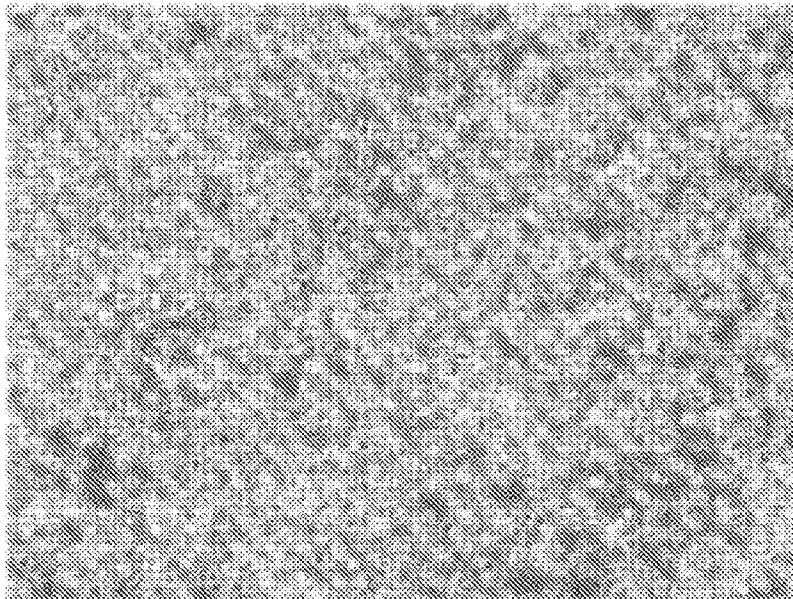
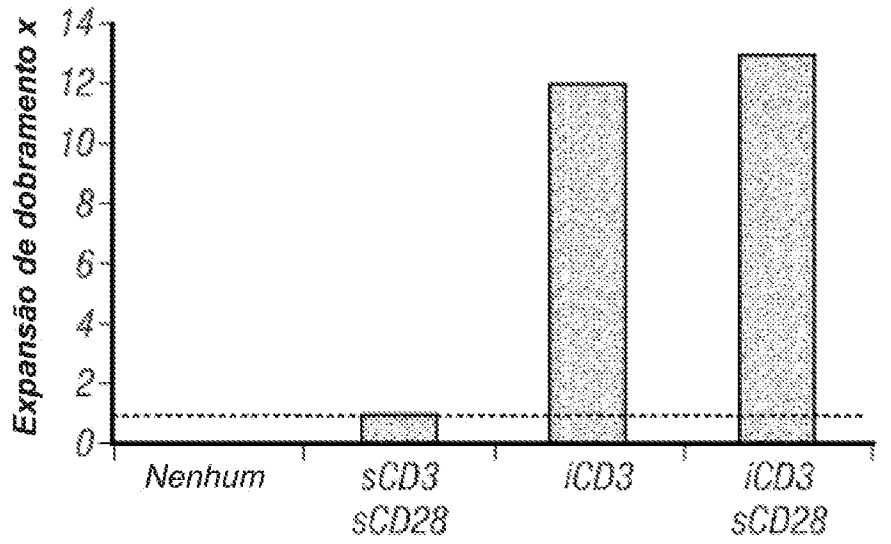
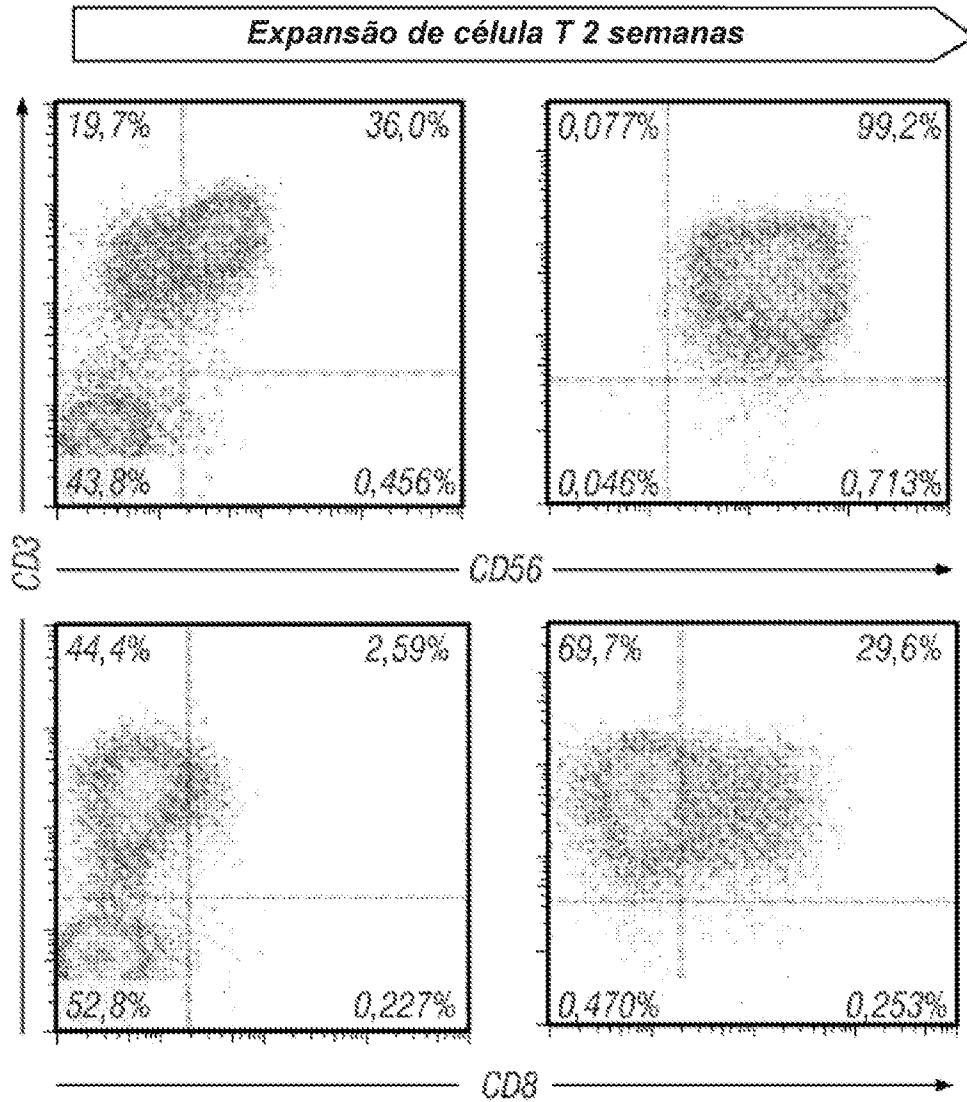


FIG. 1F
(CONT.)

**FIG. 1G**

**FIG. 1G****(CONT.)**

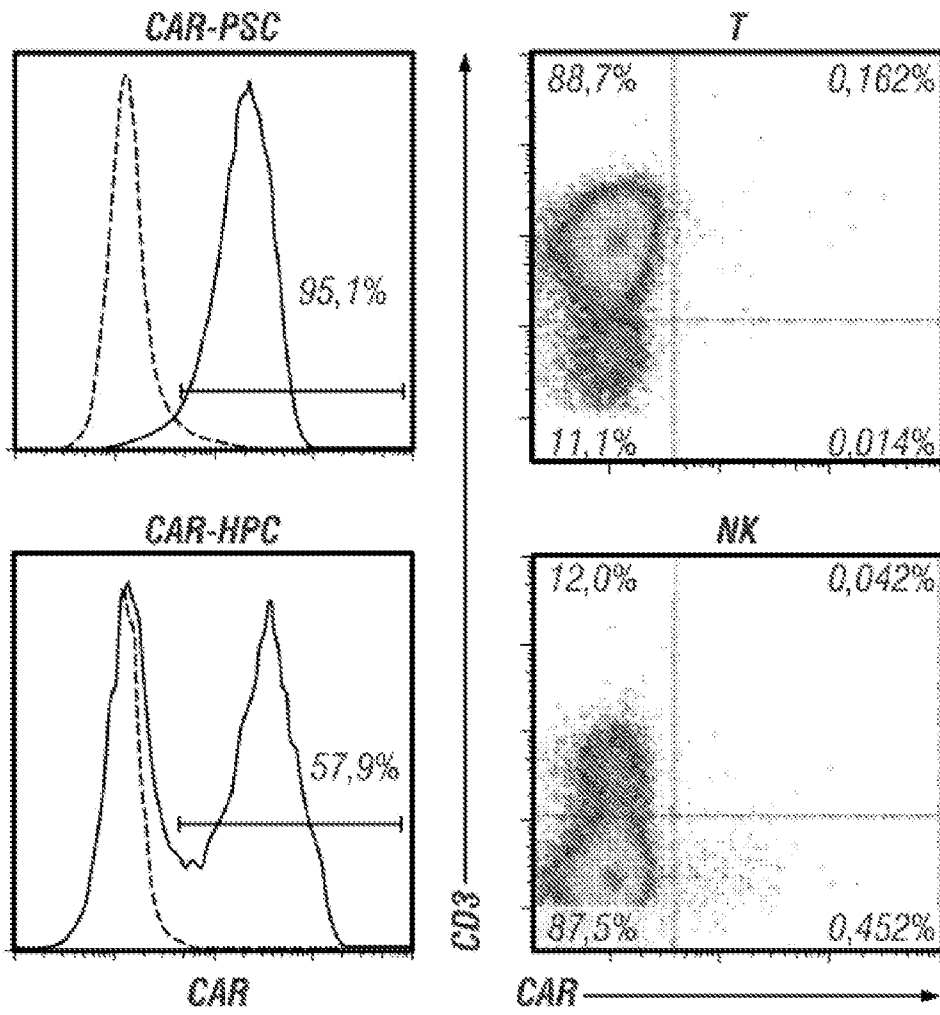


FIG. 2

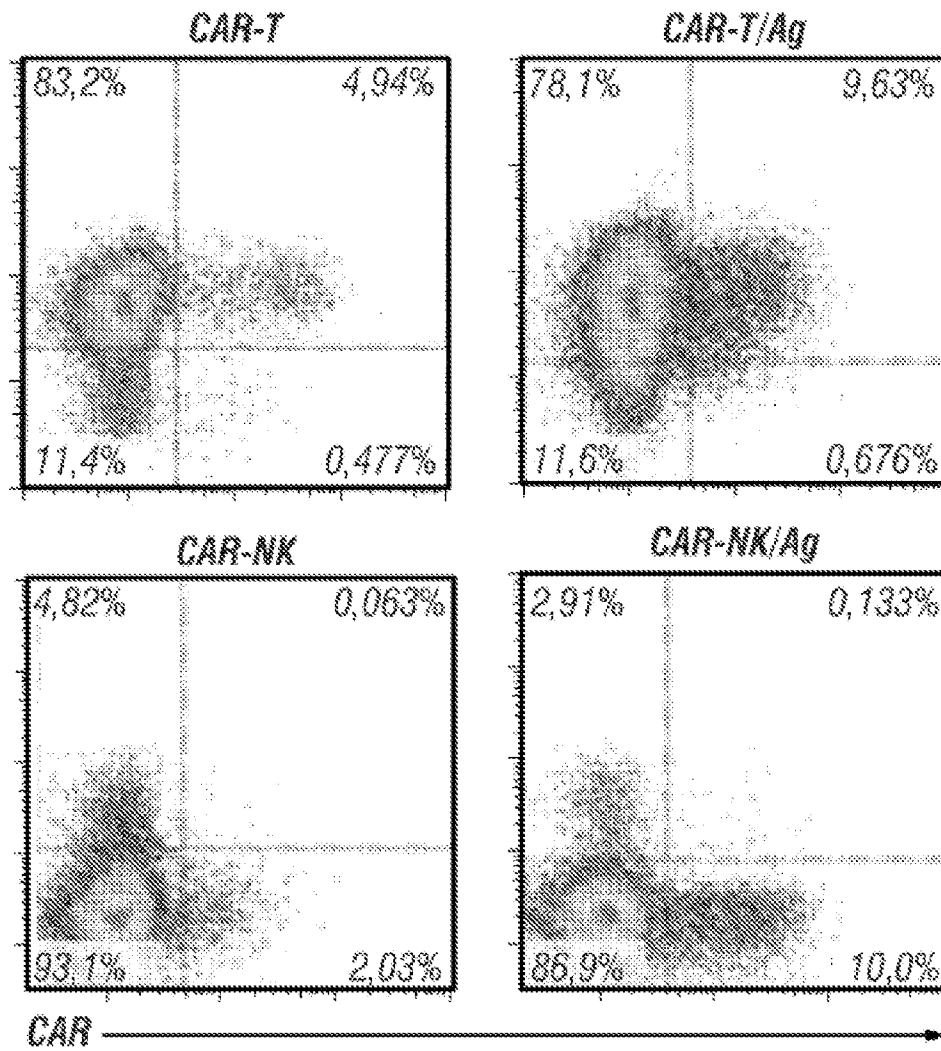


FIG. 2
(CONT.)

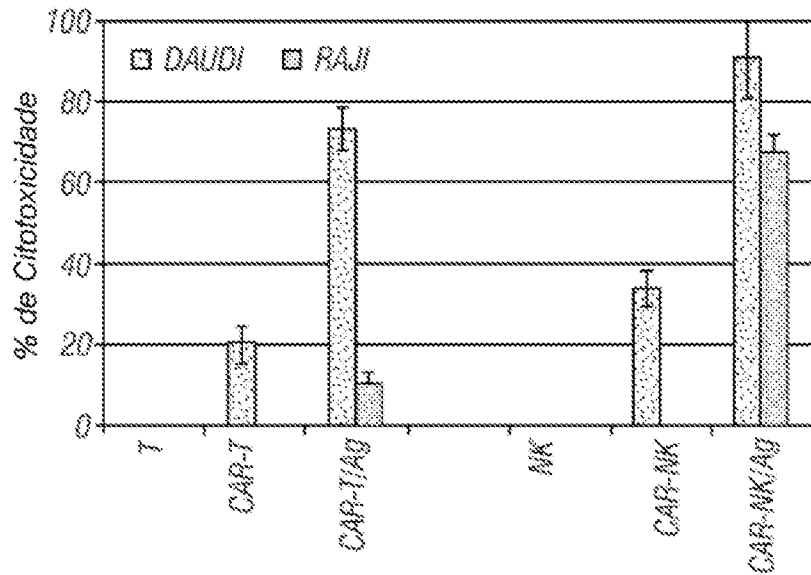


FIG. 3A

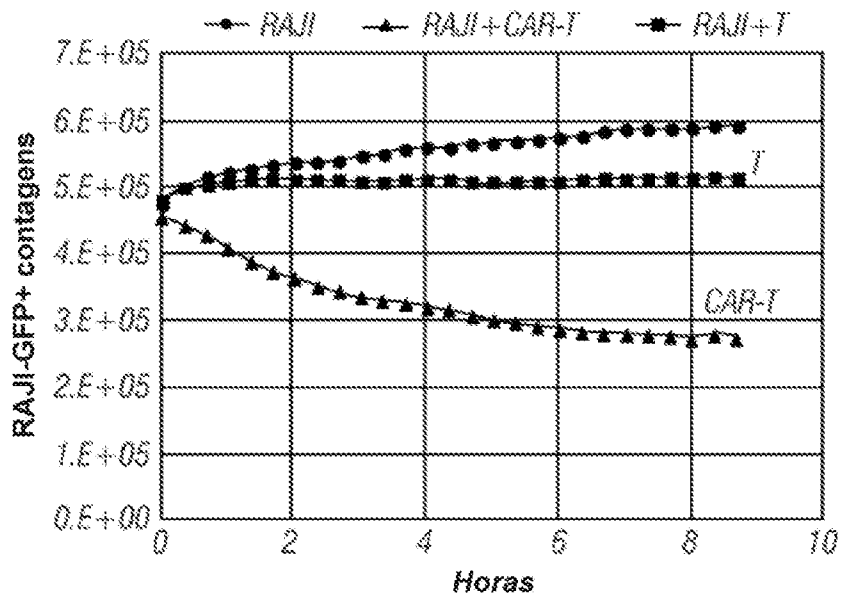


FIG. 3B

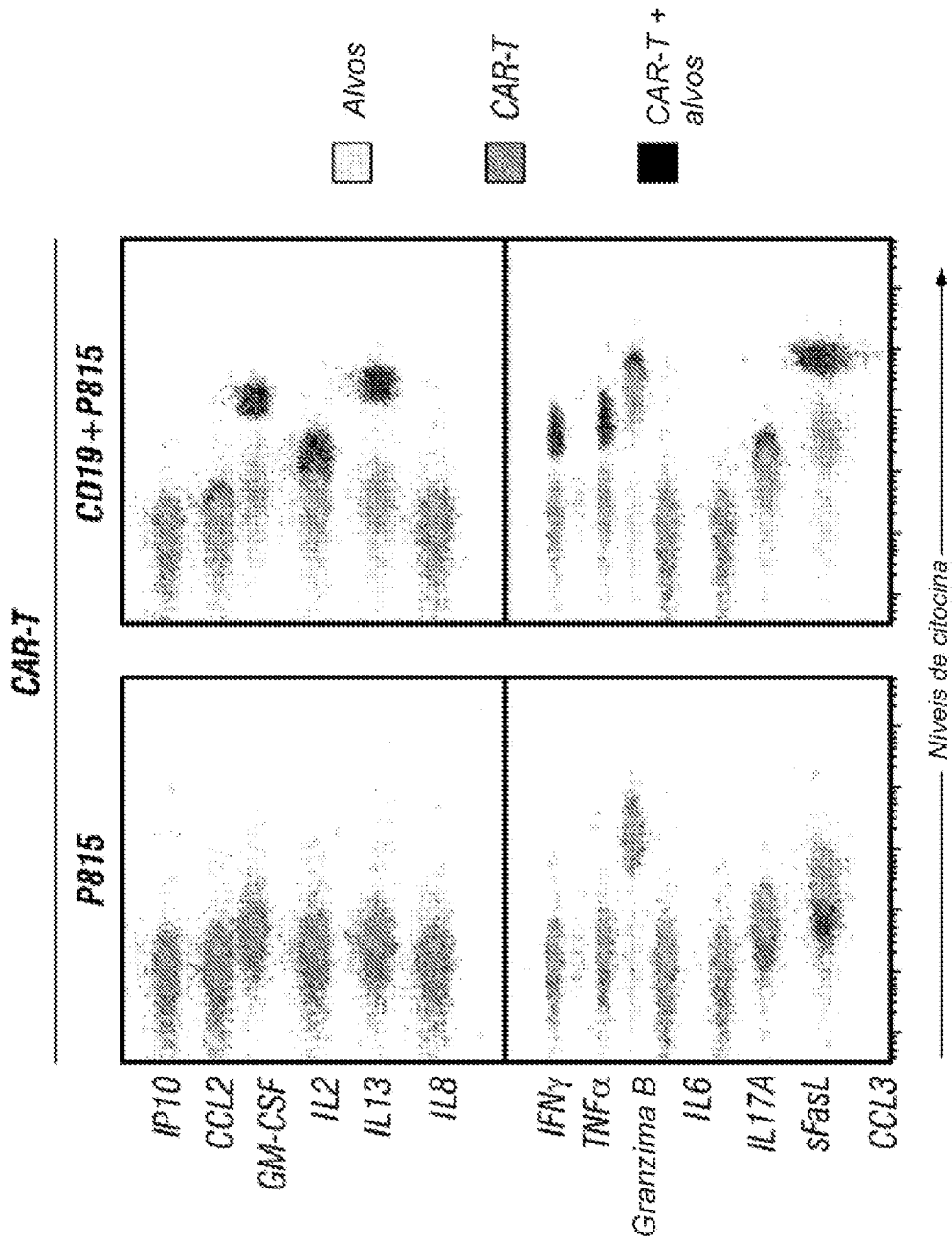


FIG. 4

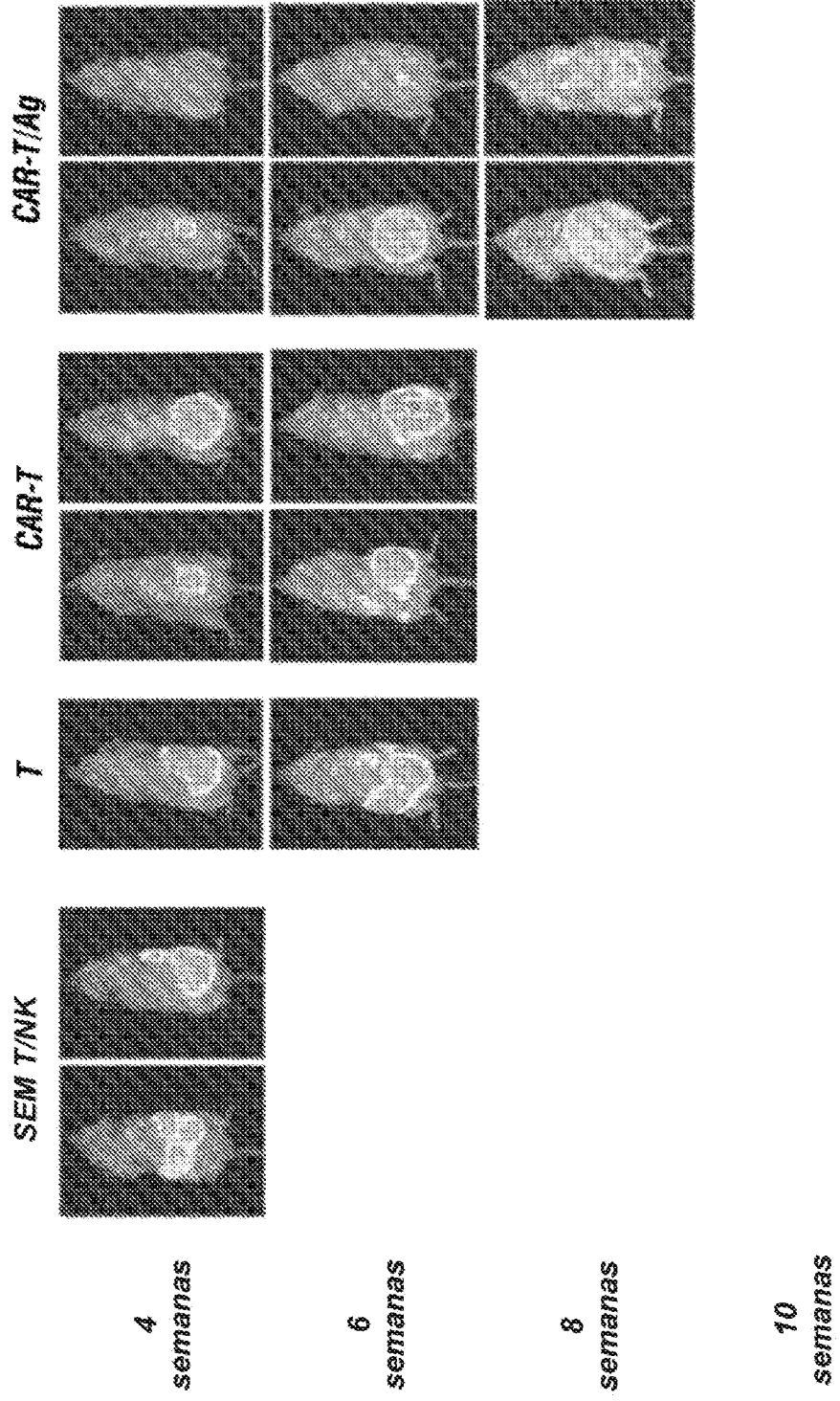


FIG. 5A

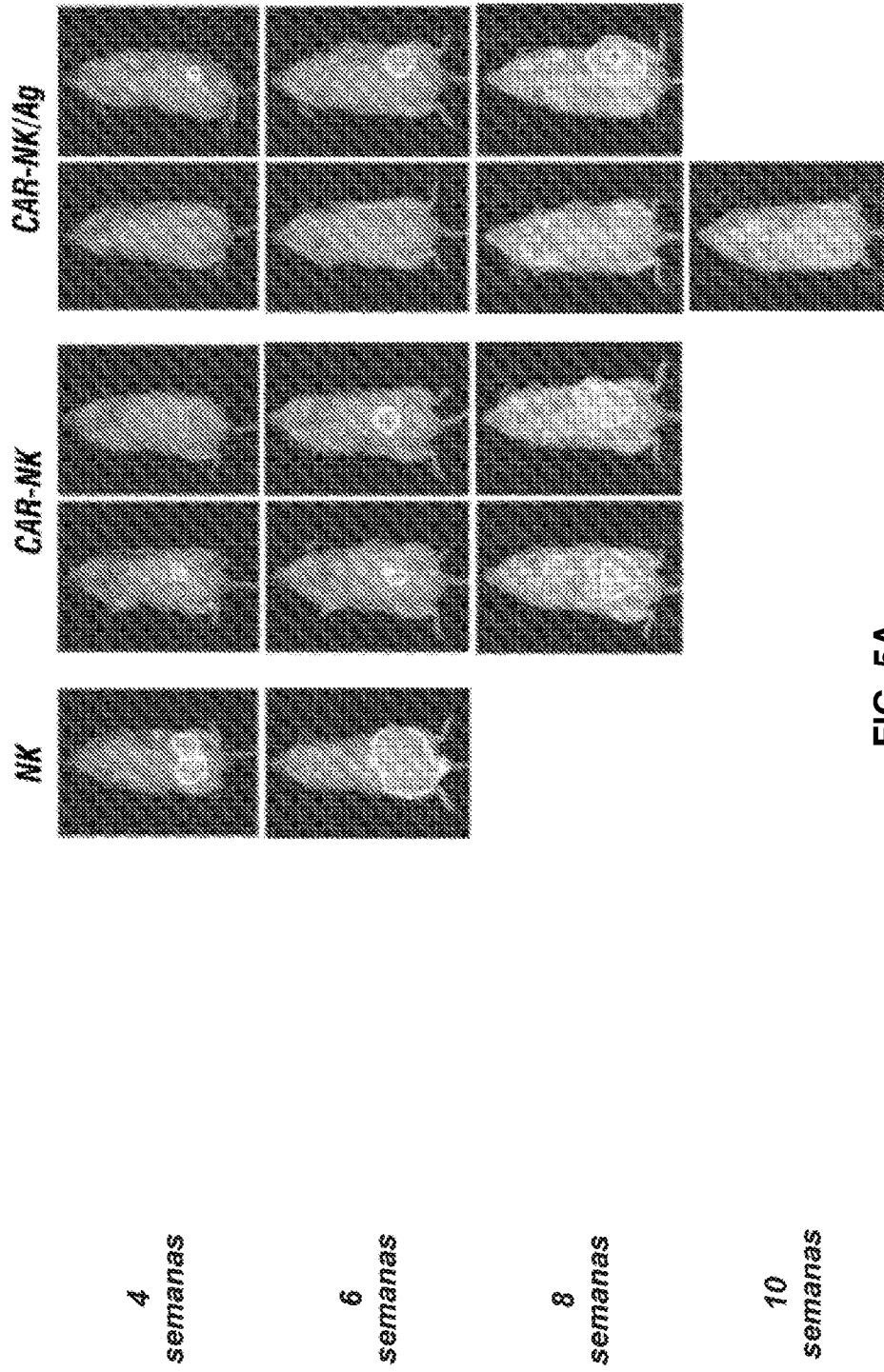


FIG. 5A
(CONT.)

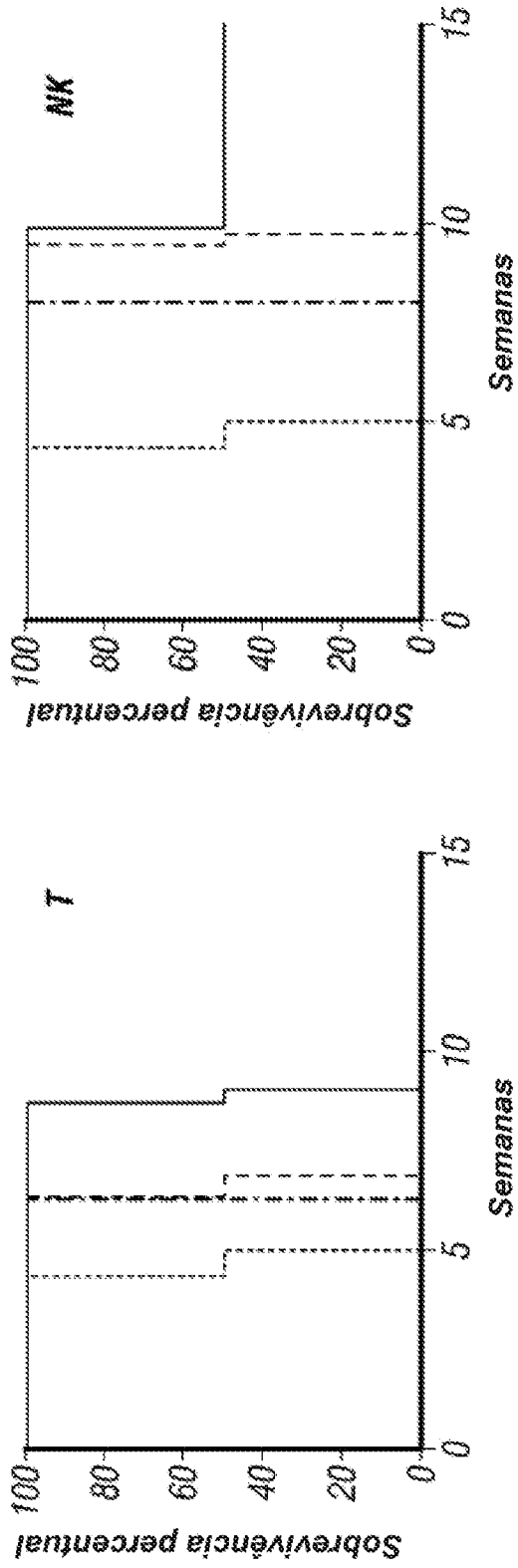


FIG. 5B

RESUMO

“CÉLULAS EFETORAS IMUNOLÓGICAS ANTÍGENO-ESPECÍFICAS”

São aqui fornecidos métodos para a produção de células T e células NK efetoras antígeno-específicas a partir de células-tronco pluripotentes que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR). São ainda aqui fornecidos métodos para a terapia celular adotiva através da administração das células T efetoras e/ou células NK aqui fornecidas.