



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

(21) BR 112020007469-1 A2



(22) Data do Depósito: 16/11/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 03/11/2020

(54) Título: RECEPTOR DE CÉLULAS T E LIGANTE

(51) Int. Cl.: C07K 14/47.

(30) Prioridade Unionista: 20/11/2017 GB 1719169.3.

(71) Depositante(es): UNIVERSITY COLLEGE CARDIFF CONSULTANTS LTD..

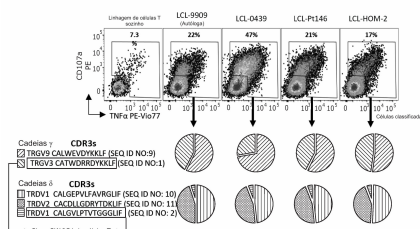
(72) Inventor(es): ANDREW SEWELL; GARRY DOLTON.

(86) Pedido PCT: PCT GB2018053321 de 16/11/2018

(87) Publicação PCT: WO WO/2019/097244 de 23/05/2019

(85) Data da Fase Nacional: 15/04/2020

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se a um receptor de células T (TCR), em particular a pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) desse receptor; uma célula T que expressa o TCR; um clone que expressa o TCR; um vetor que codifica o TCR; uma versão solúvel do TCR; uma composição farmacêutica ou agente imunogênico ou biespecífico ou vacina que compreendem o TCR, a célula, o clone ou o vetor; o TCR ou a célula ou o clone ou o vetor ou a composição farmacêutica ou agente imunogênico ou biespecífico ou vacina para uso no tratamento de câncer; um método de tratamento de câncer empregando o TCR, a célula, o clone, o vetor, a composição farmacêutica, agente imunogênico, biespecífico ou vacina que compreendem o TCR; e um ligante ao qual o TCR se liga.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"RECEPTOR DE CÉLULAS T E LIGANTE".

Campo Técnico

[001] A presente invenção refere-se a um receptor de células T (TCR), em particular a pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) desse receptor; a uma célula T que expressa o TCR; um clone que expressa o TCR; um vetor que codifica o referido TCR; uma versão solúvel do TCR; uma composição farmacêutica ou um agente imunogênico ou biespecífico ou vacina que compreende o TCR, a célula, o clone ou o vetor; uso do TCR ou da célula ou do clone ou do vetor ou da referida composição farmacêutica ou agente imunogênico ou biespecífico ou vacina para tratar câncer; um método de tratamento de câncer usando o referido TCR, a célula, o clone, o vetor, a composição farmacêutica, agente imunogênico, biespecífico ou vacina que compreendem o TCR; e um ligante com o qual o TCR se liga.

Antecedentes

[002] Foi descoberta uma nova classe de células T $\gamma\delta$ eficaz para tratar câncer, que exigem que a célula-alvo expresse um gene SCNN1A intacto para reconhecimento. Essa célula T não segue a convenção de exigir um Antígeno de Leucócito Humano específico (HLA) para o reconhecimento do alvo e, portanto, diz-se ser 'não convencional'. O *locus* de HLA é altamente variável, com mais de 17.000 alelos diferentes tendo sido descritos até hoje. Como tal, qualquer abordagem terapêutica que funciona via um HLA só pode ser eficaz em uma minoria de pacientes. Em contraste, toda a população humana expressa SCNN1A, o gene necessário para reconhecimento de células cancerosas via TCR $\gamma\delta$ e seu clone de células T correspondente, denominado daqui por diante SW.3G1. Esse clone foi descoberto durante um rastreio de células T $\gamma\delta$ que poderiam

reconhecer linhagens celulares linfoblastoides (LCLs) criadas por infecção de células B saudáveis com o vírus de Epstein-Barr (EBV), também chamado herpesvírus humano 4 (HHV-4). De modo vantajoso, o clone de células T SW.3G1 $\gamma\delta$ não responde a células B saudáveis ou outras linhagens de células saudáveis.

[003] Outros estudos têm mostrado que o clone SW.3G1 $\gamma\delta$ de células T pode reconhecer a maioria se não todas as células cancerosas. O gene SCNN1A é necessário para esse reconhecimento e assim é o ligante de ligação para SW.3G1 TCR.

[004] Como é conhecido, e como mostrado na Figura 2, o TCR é uma proteína heterodimérica ancorada em membrana ligada por dissulfeto consistindo normalmente nas cadeias gama e delta altamente variáveis que se associam às moléculas das cadeias invariantes CD3 para formar um TCR de funcionamento completo. Células T que expressam esse receptor são referidas como células T $\gamma:\delta$ (ou $\gamma\delta$).

[005] As cadeias γ e δ são compostas de domínios extracelulares que compreendem uma região Constante (C) e uma região Variável (V). A região constante é proximal à membrana celular, seguida de uma região transmembranar e uma cauda citoplasmática curta, enquanto a região variável liga-se ao ligante. O ligante para a maioria das células T $\gamma\delta$ permanece desconhecido.

[006] O domínio variável tanto da cadeia γ quanto da cadeia δ de TCR tem cada um três regiões variáveis chamadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Em geral, o sítio de ligação a antígeno é formado pelos *loops* de CDR da cadeia γ e da cadeia δ de TCR. CDR1 γ e CDR2 γ são codificadas pelos genes individuais V γ , considerando que CDR1 δ e CDR2 δ são codificadas pelos genes individuais V δ . A CDR3 da cadeia γ de TCR é hipervariável devido ao potencial para adição de nucleotídeos e

remoção em torno da junção da região V e uma região de junção. A cadeia δ de CDR3 de TCR tem ainda mais a capacidade de variação, uma vez que também pode incluir um gene de diversidade (D) após ter ocorrido recombinação VDJ.

[007] Em 2015 cerca de 90,5 milhões de pessoas tiveram câncer. Cerca de 14,1 milhões de novos casos ocorrem por ano (excluindo câncer de pele que não melanoma). Essa doença causa cerca de 8,8 milhões de mortes (15,7%) de seres humanos. A maioria dos tipos comuns de câncer em homens são câncer de pulmão, câncer de próstata, câncer colorretal e câncer de estômago. Nas mulheres, os tipos mais comuns de câncer são câncer de mama, câncer colorretal, câncer de pulmão e câncer cervical. Se câncer de pele, que não melanoma, fosse incluído no total de novos casos anuais de câncer, isso representaria cerca de 40% dos casos. Em crianças, leucemia linfoblástica aguda e tumores cerebrais são os mais comuns, exceto na África, onde linfoma não Hodgkin ocorre mais frequentemente. Em 2012, cerca de 165.000 crianças com menos de 15 anos de idade foram diagnosticadas com câncer. O risco de câncer aumenta significativamente com a idade e muitos tipos de câncer ocorrem mais comumente em países desenvolvidos. As taxas aumentam à medida que mais pessoas vivem até uma idade avançada e na medida em que ocorrem mudanças no estilo de vida em decorrência do desenvolvimento do mundo. Os custos financeiros do câncer foram estimados em 1,16 trilhões de dólares por ano a partir de 2010. Conclui-se que há uma necessidade de proporcionar formas melhores e mais seguras de tratamento ou erradicação dessa doença. Uma imunoterapia que utiliza sistemas de defesa naturais do corpo para matar o tecido anormal é reconhecida ser mais segura do que intervenção química, mas, para ser eficaz, a imunoterapia deve ser específica para câncer. Além disso, a descoberta de uma imunoterapia

que é eficaz contra qualquer tipo de câncer seria não só extremamente benéfica como poderia ser administrada a indivíduos que sofrem de diversos tipos de câncer (ou seja, teria aplicação a toda população), mas também poderia ser administrada a um único indivíduo que sofre de mais de um tipo de câncer. Além disso, a identificação de uma imunoterapia que não seja restrita a MHC também seria extremamente vantajosa, uma vez que significa que ela poderia ser administrada a qualquer indivíduo independentemente do tipo de tecido MHC.

[008] As células T que foram aqui identificadas têm as características vantajosas mencionadas antes na medida em que elas são eficazes contra qualquer tipo de câncer e não são restritas a MHC, e por isso têm aplicação pan-população devido à expressão ubíqua do produto do gene SCNNIA que é necessário para reconhecimento.

Sumário da Invenção

[009] De acordo com um primeiro aspecto da invenção, proporciona-se um receptor de células T específico para tumores (TCR), ou um fragmento do mesmo, caracterizado por pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) que compreende ou consiste em CATWDRRDYKKLF (SEQ ID NO: 1) e/ou CALGVLPTVTGGGLIF (SEQ ID NO: 2).

[0010] Em uma modalidade preferida da invenção, a CDR compreende ou consiste em (CDR) CATWDRRDYKKLF (SEQ ID NO: 1) e/ou CALGVLPTVTGGGLIF (SEQ ID NO: 2), ou uma CDR que compartilha pelo menos 88% de identidade com esta, tal como 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%.

[0011] As CDRs aqui descritas representam as CDR3s do referido TCR e, assim, são as principais CDRs responsáveis para reconhecer antígeno ou ligante processados. As outras CDRs (CDR1 gama, CDR2 gama, CDR1 delta e CDR2 delta) são codificadas pela linhagem germinal. Portanto, a invenção refere-se ainda a um TCR que também

inclui uma ou mais dessas outras CDRs, ou seja, CDR1 gama, CDR2 gama, CDR1 delta e/ou CDR2 delta em combinação com a referida uma ou mais sequências de CDR3.

[0012] Por conseguinte, em uma modalidade preferida da presente invenção, o TCR compreende ou consiste em uma ou mais, incluindo qualquer combinação, das seguintes regiões determinantes de complementaridade:

VTNTFY (CDR1 γ) SEQ ID NO: 3

YDVSTARD (CDR2 γ) SEQ ID NO: 4

TSWWSYY (CDR1 δ) SEQ ID NO: 5

QGS (CDR2 δ) SEQ ID NO: 6

[0013] Referência aqui a um TCR específico para tumor é um TCR que reconhece especificamente uma célula tumoral ou um ligante de células tumorais, no contexto da expressão do gene SCNN1A, e é ativado pela mesma, mas não é ativado por uma célula não tumoral ou um ligante de células não tumorais.

[0014] Em uma modalidade preferida da invenção, o TCR é um TCR $\gamma\delta$ que tem uma cadeia γ e uma cadeia δ , e a CDR da cadeia γ compreende ou consiste na CDR: CATWDRRDYKRLF (SEQ ID NO: 1) ou uma CDR que compartilha pelo menos 88% de identidade com ela, tais como 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%; e a referida CDR da referida cadeia δ compreende ou consiste na CDR: CALGVLPTVTGGGLIF (SEQ ID NO: 2) ou uma CDR que compartilha pelo menos 88% de identidade com esta, tal como 89%, 90%, 91%, 92%, 93% , 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%. Consequentemente, o TCR pode compreender uma ou ambas as CDRs mencionadas antes, e em uma modalidade preferida compreende ambas as CDRs.

[0015] Em outra modalidade preferida da invenção, a CDR do TCR compreende ou consiste adicionalmente ou alternativamente em uma

sequência da cadeia gama que é CALWEVDYKKLF (SEQ ID NO: 9) e/ou uma sequência da cadeia delta que é CALGEPVLFAVRGLIF (SEQ ID NO: 10) e/ou CACDLLGDRYTDKLIF (SEQ ID NO: 11) ou uma CDR que compartilha pelo menos 88% de identidade com estas, tais como 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%.

[0016] Em ainda outra modalidade preferida da invenção, o TCR não é convencional na medida em que não é restrito a MHC, em vez disso, liga-se a um ligante específico para tumor no contexto da expressão do gene SCNN1A. O fato de que essas células T e seus TCRs não são restritos a MHC significa que eles apresentam um potencial de terapia pan-população e por isso representam uma nova terapia do câncer extremamente importante.

[0017] Em outra modalidade preferida da invenção, a cadeia γ do TCR compreende ou consiste em:

SSNLEGRTKSVTRQTGSSAEITCDLTVTNTEFYIHWYLNHQEGKAPQRLLYYDVSTA
RDVLESGLSPGKYHTHTPRRWSWILRLQNLINDSGVYYCATWDRRDYKKLFG
 SGTTLVVTDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKIHWQE
 KKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPEKSLDKEHRCIVRHENNKNGVDQ
 EIIFPIKT (SEQ ID NO:7)

ou uma sequência que tem pelo menos 88% de identidade com esta, tais como 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%.

[0018] Em outra modalidade preferida da invenção, a cadeia δ do TCR compreende ou consiste em:

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQLPSKEMIFLIRQGSDEQN
 AKSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGVLPTVTGGGLIFGKGTRVTVEP
 NSQPHTKPSVFMKNGTNAVCLVKEFYPKDIRINLVSSKITEFDPAIVISPSGKYNAVK
 LGKYEDSNSVTCSVQHDKTVHSTDFEVKTDST (SEQ ID NO:8) ou

uma sequência que tem pelo menos 88% de identidade com esta, tais como 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97 %, 98% ou

99%.

[0019] (Nos parágrafos anteriores, o texto em negrito e sublinhado representa as CDRs, ou seja, 1, 2 e 3, nessa ordem).

[0020] Em ainda outra modalidade de preferida da invenção, o TCR compreende a cadeia γ do TCR e a cadeia δ do TCR acima mencionado.

[0021] Em ainda uma outra modalidade preferida da invenção, o TCR é um TCR solúvel, ou sTCR, e assim não tem a transmembrana e, de preferência também, os domínios intracelulares.

[0022] Em ainda outra modalidade preferida da invenção, o TCR é parte de um receptor quimérico que possui a funcionalidade aqui descrita. Idealmente, o TCR é fundido com um domínio constante de TCR $\alpha\beta$.

[0023] Alternativamente, proporciona-se um fragmento do TCR tal como uma parte monomérica do mesmo, idealmente uma única forma de cadeia do TCR.

[0024] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionada uma célula T que expressa o referido TCR da invenção, de preferência, em uma forma solúvel ou compatível com membrana, ou seja, tendo uma região transmembranar e uma região intracelular.

[0025] De acordo com ainda um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um clone de célula T que expressa o referido TCR da invenção, de preferência, em uma forma solúvel ou compatível com membrana, ou seja, tendo uma região transmembranar e uma região intracelular. Preferencialmente, o clone é um clone SW.3G1 como aqui descrito.

[0026] De acordo com ainda outro aspecto da invenção, proporciona-se um vetor que codifica o referido TCR da invenção.

[0027] De acordo com ainda um aspecto adicional da invenção, é proporcionada uma composição farmacêutica ou agente imunogênico

ou biespecífico ou vacina que compreende o referido TCR ou célula ou clone ou vetor da invenção.

[0028] Em uma modalidade preferida da invenção, a composição farmacêutica ou agente imunogênico ou biespecífico ou vacina é usada para tratar qualquer câncer, idealmente câncer colorretal, de pulmão, renal, de próstata, de bexiga, de colo do útero, melanoma (pele), ósseo, de mama, câncer do sangue, de cérebro, de pâncreas, de testículo, ovário, cabeça/pescoço, fígado, tireoide e uterino.

[0029] De acordo com ainda outro aspecto da invenção, proporciona-se o TCR ou célula ou clone ou vetor como aqui descrito para uso no tratamento de câncer.

[0030] De acordo com ainda outro aspecto da invenção, é proporcionado um método de tratamento de câncer que compreende administrar o referido TCR ou célula ou clone ou vetor a um indivíduo a ser tratado.

[0031] Idealmente, o referido câncer é de qualquer tipo, mas, em particular, câncer colorretal, de pulmão, renal, de próstata, bexiga, colo do útero, melanoma (pele), ósseo, de mama, câncer do sangue, de cérebro, pâncreas, testículo, ovário, cabeça/pescoço, fígado, tireoide e uterino.

[0032] Em um método preferido da invenção, o TCR, célula, clone ou vetor é administrado em combinação com um agente antitumor, tal como, mas sem limitação, um biespecífico.

[0033] Referência aqui a um biespecífico é referência a um anticorpo monoclonal biespecífico (BsMAb, BsAb) que é uma proteína artificial que pode ligar-se simultaneamente a dois tipos diferentes de antígeno.

[0034] Ainda alternativamente, o referido TCR pode formar parte de um Biespecífico que inclui o referido TCR, com a finalidade de se ligar a seu ligante em uma célula cancerosa, e também uma célula

imunitária que ativa componente ou ligante que se liga e assim ativa uma célula imune tal como uma célula T assassina.

[0035] De acordo com ainda um aspecto adicional da invenção, é proporcionado o uso do TCR ou célula ou clone ou vetor na fabricação de um medicamento para tratar o câncer.

[0036] De acordo com ainda um aspecto adicional da invenção, é proporcionada uma combinação terapêutica para o tratamento de câncer, compreendendo:

[0037] a) o referido TCR ou célula ou clone ou vetor ou agente imunogênico ou biespecífico ou vacina em combinação com

[0038] b) outro agente terapêutico para câncer.

[0039] De acordo com ainda um aspecto adicional da invenção, proporciona-se um TCR ou polipeptídeo ou biespecífico ou anticorpo, ou um fragmento desse anticorpo, que se liga a pelo menos uma das isoformas de produtos do gene SCNNA1 mostradas na Figura 9 e, em particular, ao seu domínio extracelular.

[0040] Em uma modalidade preferida da invenção, o referido polipeptídeo, anticorpo ou fragmento inibe a atividade do produto do gene SCNNA1 e, no caso do referido anticorpo, é mais idealmente monoclonal.

[0041] Nas reivindicações que se seguem e na descrição anterior da invenção, exceto quando o contexto exija de outra forma devido à expressão de linguagem ou implicação necessária, a palavra “compreende”, ou variações tais como “compreende” ou “compreendendo”, é usada em um sentido inclusivo, ou seja, para especificar a presença das características indicadas, mas não para excluir a presença ou a adição de outras características em várias modalidades da invenção.

[0042] Todas as referências, incluindo qualquer patente ou pedido de patente, citados neste relatório descritivo, são aqui incorporados

como referência. Não é feita nenhuma admissão de que qualquer referência constitua estado da técnica. Além disso, não é feita nenhuma admissão de que qualquer estado da técnica constitui parte do conhecimento geral comum no estado da técnica.

[0043] Características preferidas de cada aspecto da invenção podem ser como descritas em ligação com qualquer um dos outros aspectos.

[0044] Outras características da presente invenção tornar-se-ão evidentes a partir dos exemplos seguintes. De um modo geral, a invenção estende-se a qualquer nova característica, ou qualquer combinação de novas características, dos aspectos descritos neste relatório descritivo (incluindo as reivindicações e desenhos anexos). Assim, aspectos, números inteiros, características, compostos ou porções químicas descritos em conjunto com um aspecto particular, modalidade ou exemplo da invenção devem ser entendidos ser aplicáveis a qualquer outro aspecto, modalidade ou exemplo aqui descritos, a menos que incompatíveis com estes.

[0045] Além disso, a menos que indicado de outra forma, qualquer característica aqui descrita pode ser substituída por uma característica alternativa servindo ao mesmo fim ou fim semelhante.

[0046] Ao longo da descrição e das reivindicações deste relatório descritivo, o singular abrange o plural, a menos que o contexto exija de outra maneira. Em particular, onde o artigo indefinido é usado, o relatório descritivo deve ser entendido como contemplando pluralidade, bem como singularidade, a menos que o contexto o exija de outro modo.

[0047] Uma modalidade da presente invenção será agora descrita por meio de exemplo apenas com referência ao seguinte, em que:

[0048] A **Figura 1** mostra como uma linhagem de células T $\gamma\delta$ reativa com linhagens de células linfoblastoides autólogas e não

autólogas (LCLs) foi clonotipada e verificadas expressar um TCR composto dos genes TRGV3 e TRDV1 com as CDR3s CATWDRRDYKKLF (SEQ ID NO: 1) e CALGVLPTVTGGGLIF (SEQ ID NO: 2), respectivamente. Um clone foi cultivado por diluição limitada que expressa esse TCR e chamado SW.3G1. (A) Células T $\gamma\delta$ purificadas de um doador saudável, 9909, foram sensibilizadas (dia 0) e reestimuladas (14^o dia) com um *pool* de LCLs de três doadores (0439, pt146 e Hom-2). No 28^o dia, a linhagem de células T foi incubada com as LCLs usadas para a primeira imunização e também LCL-9909 autólogo durante 4 h com a ativação avaliada por inclusão de TAP1-0, anticorpos anti-CD107a e anti-TNF α . As células ativadas foram classificadas por citometria de fluxo e os receptores de células T (TCRs) analisados por sequenciamento da próxima geração. Gráficos circulares representam a proporção das cadeias de TCR apresentadas e CDR3s (regiões de determinação de complementaridade) que estavam presentes nas células classificadas. A percentagem de células ativadas para os gráficos de citometria de fluxo é mostrada acima de cada porta. Clone SW.3G1 de células T obtidas das linhas expressa as cadeias de TCR destacadas, com a sequência completa de TCR apresentada na Figura 2. (B) Clone SW.3G1 foi fenotipado com os anticorpos e confirmados expressar uma cadeia TCR δ 1. SW.3G1 não expressou um $\alpha\beta$ TCR ou glicoproteínas CD8 ou CD4 relacionadas com reconhecimento de antígenos de peptídeo-HLA convencionais.

[0049] A **Figura 2** mostra a sequência do receptor de células T das cadeias de TCR γ e δ do clone SW.3G1. As estruturas de mRNA (alto) mostram que para cada cadeia de CDR1 e CDR2 são codificadas na linhagem germinativa. CDR3 é o produto da diversidade de junção em junções V-J do receptor de células T (TCR)-cadeia γ e junções V-D-J em TCR-cadeia δ . CDR3 é consequentemente hipervariável. O código

de cores adotado para os *loops* de CDR é mantido durante toda a figura. As áreas coloridas em cinza representam os domínios constantes e variáveis dos TCRs (não incluindo os *loops* de CDRs hipervariáveis). O painel à direita mostra o enovelamento esperado para a proteína. TCRs adotam estruturas terciárias semelhantes que posicionam os *loops* das regiões determinantes de complementaridade (CDR) na extremidade distal da membrana das moléculas. Em conjunto, os seis *loops* de CDR formam o sítio de ligação com o antígeno.

[0050] A **Figura 3** mostra que SW.3G1 pode reconhecer e matar LCLs autólogas e não autólogas, mas não células saudáveis de várias origens de tecidos. (A) Coincubação de SW.3G1 com LCLs durante 4 h, com ativação avaliada por inclusão de TAP1-0, anticorpos anti-CD107a e anti-TNF α . (B) 6,5 h de ensaio de citotoxicidade com liberação de cromo utilizando as mesmas LCLs de (A). (C) Células B autólogas saudáveis purificadas magneticamente de forma direta *ex vivo* a partir de doador 9909 foram utilizadas em ensaios de ativação como em A, com LCL-9909 usada como controle positivo para a ativação. (D) Ensaios de ativação como em A, utilizando LCL-9909 e as linhagens celulares saudáveis CIL-1 (epitélio ciliar não pigmentado) e Hep2 (hepatócito). Percentagem de células separadas é mostrada.

[0051] A **Figura 4** mostra lise de LCLs mediada por SW.3G1 de múltiplos doadores que não compartilham em comum HLA e um conjunto de linhagens de células de câncer de diferentes tecidos. SW.3G1 foi utilizado em ensaios de citotoxicidade de 6,5 h com liberação de cromo. (A) Um painel de linhagens celulares linfoblásticas (LCLs) de 24 doadores (nomeados no eixo x). Barras vermelhas para LCLs que foram usadas para gerar as linhagens de células T do doador 9909 do qual SW.3G1 foi clonado. Proporção de células T para LCL de 1:1. (B) Eliminação mediada por SW.3G1 do painel de

linhagens de células de câncer (nomeado no eixo x) do tecido de diferentes origens de tecidos (chave) em uma proporção de células T para células de câncer de 10:1.

[0052] A **Figura 5** mostra que SW.3G1 não reconhece células-alvo por mecanismos conhecidos. (A) Clone SW.3G1 $\gamma\delta$ foi coincubado durante 4 h com HMB-PP, com a linhagem celular linfoblástica (LCL)-9909 e fito-hemaglutinina (PHA). Células T foram também incubadas sozinhas. Ativação de células T foi avaliada por inclusão de TAP1-0, anticorpos anti-CD107a e anti-TNF α , com a percentagem de células ativadas mostrada acima das células separadas. (B) Usando o mesmo ensaio de ativação de (A), SW.3G1 foi incubado com LCLs que tinham sido pré-marcadas com anticorpos (Abs) que se ligam às proteínas denominadas no eixo x. SW.3G1 foi também incubado com as LCLs sem Ab (sem controle de Ab). A percentagem de reatividade está representada graficamente (eixo y). MICA/B (Cadeia relacionada com Complexo Principal Histocompatibilidade (MHC) A/B Classe I) e EPCR (Receptor endotelial de proteína C). Abs anti-MHC classe I e classe II foram também incluídos.

[0053] A **Figura 6** mostra a abordagem CRISPR/Cas9 de genoma inteiro usada para identificar genes/proteínas candidatas envolvidas no reconhecimento de células-alvo por SW.3G1.

[0054] A **Figura 7** mostra os resultados da abordagem CRISPR/Cas9 de genoma inteiro que identificou vários genes candidatos para reconhecimento de células-alvo por SW.3G1. (A) LCL-9909 autóloga e linhagem de células de câncer KBM7s foram transduzidas com uma biblioteca de CRISPR/Cas9 de genoma inteiro. As bibliotecas foram submetidas a várias seleções utilizando o clone de células T SW.3G1 para gerar uma linhagem de células-alvo que era resistente à lise. As células-alvo sobreviventes (pós-seleção) foram testadas juntamente com as linhagens de células pré-selecionadas em

ensaios de ativação com SW.3G1. Ativação avaliada por inclusão de TAP1-0, anticorpos anti-CD107a e anti-TNF α . (B) Sequenciamento das bibliotecas de pós-seleção revelou RNAs-guia enriquecidos correspondentes aos genes mostrados em (C). (C) Genes candidatos vistos em ambas as bibliotecas LCL-9909 e KBM7, ou vistos apenas para LCL-9909 ou KBM7s. Os nomes dos genes (e proteínas) são mostrados com *links* de *website* para informação adicional.

[0055] A **Figura 8** mostra a informação sobre o gene candidato/proteína SCNN1A, que foi identificado pela abordagem de biblioteca CRISPR/Cas9 de genoma inteiro.

[0056] A **Figura 9** mostra a sequência de proteína canônica de SCNN1A que alinhou com cinco variantes de *splicing* expressas. Isoforma 1 é a sequência canônica (Isoforma 1 UniProt P37088-1). Aminoácidos destacados em PRETO: região usada para gerar o Ab policlonal utilizado no presente estudo. VERMELHO: sítios de variantes de proteína devido a resíduos de aminoácidos diferentes dos apresentados. Os resíduos de aminoácidos das variantes proteicas não são mostrados aqui, mas podem ser encontrados em <http://www.uniprot.org/uniprot/P37088>. AZUL: diferenças de aminoácidos entre isoformas de *splicing*.

[0057] A **Figura 10** mostra os resultados de experimentos para validar o papel de SCNN1A no reconhecimento de células-alvo por SW.3G1. (A) Esquema do gene e proteína SCNN1A, com sítios de RNA-guia (gRNA) da biblioteca de GeCKO de genoma inteiro (número 1) e uma validação diferente da sequência de gRNA SCNN1A que foi designada (número 2). Figura adaptada de Chen 2014. (B) Ensaio de eliminação em longo prazo usando SW.3G1 com células LCL.174 do tipo selvagem, GeCKO gRNA-1 e gRNA-2 LCL.174 *knockout*. (C) Análise *Western blot* da linhagem de células de câncer de mama MDA-MB-231 que tinham recebido o gRNA-2 para SCNN1A. Células

do tipo selvagem usadas para comparação, com seta vermelha indicando a proteína de 76 kDa SCNN1A. (D) Células MDA-MB-231 de (C) e linhagens celulares de melanoma MM909.24, do tipo selvagem, e SCNN1A *knockout* (KO) empregadas em ensaios de eliminação de longo prazo com SW.3G1. Células cancerosas foram usadas como linhagens e selecionadas por tratamento com puromicina para aquelas que expressam os gRNAs, sem clonagem celular subsequente.

[0058] A **Figura 11** mostra que transferência do TCR de SW.3G1 confere reatividade a células-alvo com células T $\alpha\beta$ de três doadores saudáveis. (A) Células T CD8⁺ purificadas de três doadores foram cotransduzidas com as cadeias do receptor de células T SW.3G1 (marcadoras e purificação via rat(r)CD2) e um gRNA para tornar-se a cadeia negativa TCR β de células T recipientes (selecionadas por tratamento com puromicina) (Legut *et al.*, 2017). Pureza das células foi verificada com anticorpos rCD2 (Ab) e TCR anti- $\gamma\delta$ Ab. (B) As células de um doador foram testadas em ensaios de eliminação de longo prazo (gráfico inferior). Foram usadas linhagens de células LCL.174: células do tipo selvagem, SCNN1A *knockout* (usando gRNA-1 e -2) e SCNN1A *knockin* (células KO que receberam um transgene SCNN1A otimizado com códon).

Descrição Detalhada

Métodos e Materiais

Geração e clonotipagem de linhagem de células T

[0059] Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram purificadas a partir do sangue de um doador saudável (código 9909) mediante separação por gradiente de densidade padrão. A população predominante de células T $\gamma\delta$ no sangue periférico expressa um TCR V γ 9V δ 2 e tipicamente respondem a antígenos derivados de bactérias. A fim de enriquecer $\gamma\delta$ TCR+V δ 2-células T aumentando assim a probabilidade de encontrar células T reativas ao

câncer, foi modificado um protocolo de purificação com base magnética. A primeira adaptação foi corar os PBMCs com um anticorpo (Ab) anti- V δ 2 conjugado com PE (clone B6, *BioLegend*, San Diego, CA). Em seguida, células T $\gamma\delta$ TCR+ foram enriquecidas negativamente removendo positivamente TCR $\gamma\delta$ -células de acordo com as instruções do fabricante (*Miltenyi Biotec*, Bergish Gladbach, Alemanha). A segunda adaptação envolveu adição de microesferas anti-PE (*Miltenyi Biotec*) aos grânulos do *kit* de purificação de TCR $\gamma\delta$, removendo assim células δ 2+ ao mesmo tempo que TCR $\gamma\delta$ -células. As células purificadas foram coincubadas com (3.000-3.100 rad) LCLs irradiadas provenientes de três doadores as quais tinham sido geradas a partir de PBMC por imortalização de células B com vírus de Epstein-Barr (EBV). Todas as LCLs foram cultivadas em meio R10 (RPMI-1640, 10% de soro fetal de vitelo inativado termicamente, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina, todos da *Life Technologies*, Carlsbad, CA) na forma de células em suspensão. Após 14 dias, as células T foram estimuladas de novo com LCLs irradiadas provenientes dos mesmos doadores. No 28^o dia, as células T foram colhidas e usadas em ensaios de ativação para avaliar a reatividade em relação às LCLs. Células T (30.000) foram incubadas durante 4 h em placas de 96 poços em U com um número equivalente de LCLs. 30 mM do Inibidor de Processamento TNF α -0 (TAP1-0 da *Sigma Aldrich*) (Haney *et al.*, 2011), Ab anti-CD107a (H4A2, *Becton Dickinson* (BD), Franklin Lakes, NJ) e Ab anti-TNF α (cA2, *Miltenyi Biotec*) foram adicionados ao meio de ensaio no início do ensaio, com as células subsequentemente coradas com o corante de viabilidade celular *Vivid* (*Life Technologies*, diluição de 1:40 em PBS, em seguida 2 μ L por mancha em 50 μ L) e anticorpo (Ab) anti-CD3 (BW264/56, *Miltenyi Biotec*). As células ativadas foram classificadas em um *BD FACS Aria* em tampão de *RLT Plus* (suplementado com 40 mM de

DTT) (*Qiagen*), pronto para sequenciamento das cadeias de TCR. RNA foi extraído utilizando o *kit RNeasy Micro* (*Qiagen*, Hilden, Alemanha). cDNA foi sintetizado utilizando o *kit 5'/3' SMARTer* (*Clontech*, Paris, França) de acordo com as instruções do fabricante. A abordagem *SMARTer* usou uma transcriptase reversa do Vírus da Leucemia Murina de Moloney (MMLV), um *primer* 3' oligo-dT e um 5' oligonucleotídeo para gerar modelos de cDNA, que foram flanqueados por uma sequência de ancoragem universal conhecida. PCRs foram realizadas utilizando os iniciadores senso específicos para ancoragem e iniciadores antissenso das regiões constantes das cadeias γ e δ de TCR. Os produtos finais de PCR foram purificados em gel e preparados para sequenciamento da próxima geração (Edinburgh *et al.*, 2017).

Obtenção e fenotipagem do clone SW.3G1

[0060] Células T foram clonadas diretamente a partir da linhagem de células T por diluição limitante (Theaker *et al.*, 2016). Após quatro semanas de cultura, 50% de cada clone por volume de cultura foram colhidos e usados para os ensaios de ativação com LCLs como acima. Antes de realizar ensaios de ativação, clones de células T foram lavados e incubados durante 24 horas em meio de soro reduzido. Clones que exibiram reatividade às LCLs foram crescidos até números suficientes para sequenciamento do TCR (abaixo). Clone SW.3G1 foi corado com Abs para expressão de superfície de CD3 (*Miltenyi Biotec*), CD8 (BW135/80, *Miltenyi Biotec*), CD4 (M-T466, *Miltenyi Biotec*), TCR $\alpha\beta$ (BW242/412, *Miltenyi Biotec*) e cadeia V δ 1 de TCR (REA173, *Miltenyi Biotec*).

Sequenciamento do SW.3G1 TCR

[0061] Como acima para sequenciar as linhagens de células T com os produtos de PCR purificados após o PCR final ser clonado em *Zero Blunt TOPO* e transformado em células de *E. coli* quimicamente

competentes *One Shot* para sequenciamento padrão (ambos da *Life Technologies*).

SW.3G1 reconheceu LCLs, mas não células saudáveis

[0062] Para confirmar reatividade de SW.3G1 às LCLs, foram realizados ensaios de ativação como acima e ensaios de citotoxicidade com liberação de cromo. Células B saudáveis foram purificadas a partir do doador 9909 usando um Ab anti-CD19 conjugado com PE (HIB19, *Miltenyi Biotec*) e captura positiva com microesferas anti-PE (*Miltenyi Biotec*), e usadas imediatamente nos ensaios. Outras linhagens de células saudáveis e seus meios de cultura proprietários foram obtidos da *ScienceCell* (Carlsbad, CA): CIL-1 (epitélio ciliar humano não pigmentado) e Hep2 (hepatócito humano) foram usados na ativação como acima.

SW.3G1 matou todas as linhagens de células imortalizadas e de câncer testadas

[0063] LCLs e células tumorais foram marcadas com cromo 51 para ensaios de citotoxicidade (Ekeruche-Makinde *et al.*, 2012), com razões de células T para células-alvo de 1:1 (LCLs) ou 10:1 (células cancerosas). LCLs foram mantidas como acima. Linhagens de células cancerosas (ATCC® referência para fundamento e informação de culturas)/tecido de origem: SiHa (HTB-35) e MS751 (HTB-34)/cervical; MCF7 (HTB-22), MDA-MB-231 (CRM-HTB-26) e SKBR3 (HTB-30)/mama; TK143 (CRL-8303) e U20S (HTB-96)/ósseo; HCT-116 (CCL-247) e Colo205 (CCL-222)/cólon; Jurkat (TIB-152), K562 (CCL-243), THP-1 (TIB-202), U266 (TIB-196) e Molt-3 (CRL-1552)/sangue; Caki-1 (HTB-46)/rim; A549 (CCL-185) e H69 (HTB-119)/pulmão. MM909.11, MM909.12, MM909.15, MM909.46 e MM909.24 são melanomas de pele obtidos de pacientes com câncer tratados no Centro Para Imunoterapia de Câncer (CCIT, *Herlev Hospital*, Copenhaga, Dinamarca). As linhagens celulares 'MM' e melanomas

Mel 526 e Mel 624 foram mantidas como células aderentes em R10, passadas uma vez por semana ou, quando necessário, com o objetivo de 20-80% de confluência. As células foram descoladas dos frascos de cultura de tecidos por rinsagem com D-PBS, seguida de incubação com D-PBS e EDTA 2 mM a 37°C até descolamento.

SW.3G1 não reconheceu células-alvo por mecanismos conhecidos

[0064] O ativador de células T Vy9V δ 2 (*E*)-4-hidróxi-3-metil-but-2-enila pirofosfato (HMB-PP) (*Sigma Aldrich*) foi reconstituído em DMSO e adicionado diretamente aos poços de ensaio. Os seguintes Abs monoclonais foram usados para ensaios de bloqueio: anti-HLA, -B, -C (clone de W6/32, *BioLegend*), anti-HLA-DR, -DP, -DQ (clone Tu39, *Biolegend*), anti-EPCR (policlonal, *R&D Systems*), anti-MICA/MICB (clone 6D4, *BioLegend*) e anti-CD1d (clone 51.1, *Miltenyi Biotech*) foram empregados em uma concentração final de 10 μ g/mL.

Captura de genes por CRISPR de genoma inteiro

[0065] Uma abordagem de biblioteca de CRISPR/Cas9 de genoma inteiro foi usada (**Figura 5** para uma visão geral). Genoma inteiro direcionado a LCL-9909 e KBM7s usando as sub-bibliotecas A e B de GeCKO (plasmídeo Adgene, N° 1000000048, gentilmente fornecido pelo Dr. Feng Zhang (Patel *et al.*, 2017)) foi usado para seleção por SW.3G1. Resumidamente, células-alvo transduzidas com sucesso selecionadas com puromicina foram coincubadas com SW.3G1 em uma proporção predefinida para 2-3 semanas em placas de 96 poços em U. Ensaio de ativação (como acima) foram realizados com células-alvo pré e pós-selecionadas para confirmar perda de atividade de SW.3G1 para as células selecionadas. DNA genômico das células-alvo que tinham sobrevivido a dois ciclos de seleção com SW.3G1 foi utilizado para sequenciamento da próxima geração para revelar RNAs guia inseridos e genes candidatos.

Confirmando o papel de SCNN1A no reconhecimento de células-alvo

[0066] Partículas lentivirais foram geradas por transfecção de células HEK 293T com cloreto de cálcio e concentradas por ultracentrifugação antes de transdução de células-alvo usando 8 µg/mL de polibreno e spinfecção. gRNAs foram clonados no plasmídeo pLentiCRISPR v2 (gentilmente fornecido pelo Dr. Feng Zhang, plasmídeo 52961 da *Addgene*), que codifica a proteína SpCas9, e um gene marcador de resistência à puromicina (*pac*, puromicina N-acetiltransferase), e cotransfectados com plasmídeos de empacotamento e de envelope pMD2.G e psPAX2 (todos da *Addgene*). Transgene SCNN1A otimizado com códons de comprimento completo (Isoforma 1, UniProt P37088-1) foi clonado em um vetor lentiviral de transferência de 3ª geração pELNS (gentilmente fornecido pelo Dr. James Riley, Universidade da Pensilvânia, PA). O vetor pELNS contém gene de rato CD2 (rCD2) para seleção de células usando um Ab anti-rCD2 PE (OX-34, *BioLegend*). Expressão de SCNN1A em células-alvo foi avaliada utilizando o anticorpo policlonal de coelho anti-SCNN1A (PA1-902A, *ThermoFisher Scientific*) por citometria de fluxo (dados não mostrados) e análise de *Western blot* de acordo com as instruções do fabricante.

Transdução de células T policlonais com o SW.3G1 TCR confere reconhecimento de células-alvo

[0067] Cadeias de TCR de comprimento completo otimizadas com códons, separadas por uma sequência 2A de autoclivagem, foram sintetizadas (Genewiz) e clonadas no vetor de transferência lentiviral de 3ª geração (gentilmente fornecido pelo Dr. James Riley, Universidade da Pensilvânia, PA). O vetor pELNS contém um gene marcador de CD2 de rato (rCD2) separado do TCR por outra sequência de autoclivagem 2A. Além disso, células foram

cotransduzidas com um gRNA para extinção de expressão da cadeia TCR β em células receptoras tendo como alvo ambos os domínios constantes de TCR β (manuscrito atualmente em *Blood* para publicação). Partículas lentivirais foram geradas por transfecção de células HEK293T com cloreto de cálcio. Vetores de transferência de TCR foram cotransfectados com plasmídeos de empacotamento e de envelope pMD2.G, pRSV-Rev e pMDLg/pRRE. Partículas lentivirais foram concentradas por ultracentrifugação antes de transdução de células T CD8⁺ utilizando 5 μ g/mL de polibreno, com as células T CD8⁺ purificadas por separação magnética (*Miltenyi Biotec*) a partir de três doadores saudáveis com 24 h de antecedência e ativadas durante a noite com grânulos de CD3/CD28 (*Dynabeads, Life Technologies*) sob proporção de 3:1 de grânulos:células T. Células T que haviam assimilado o vírus foram selecionadas por incubação com 2 μ g/mL de puromicina (cadeia de TCRP *knockout*) e enriquecidas com Ab anti-rCD2 PE (OX-34, *BioLegend*) seguido de esférulas magnéticas anti-PE (*Miltenyi Biotec*). Quatorze dias pós-transdução, células T foram expandidas com alimentadores alogênicos e PHA. Células transduzidas com TCR foram utilizadas em ensaios de longa duração de eliminação nos quais LCL.174 alvos foram plaqueados em duplicata na densidade de 50.000 células/poço em placas de 96 poços em U. SW.3G1 foi adicionado ao alvo e incubado durante 7 dias. Células-alvo foram também plaqueadas sem células T, para servir como controle de 100% de sobrevivência. Células foram colhidas, lavadas com PBS e coradas com *Vivid* e anticorpo anti-CD3 e vívida (para excluir células T). Como controle interno, Grânulos de Contagem Absoluta *CountBright™* (*Life Technologies*) foram adicionados em cada poço antes de colheita/lavagem (aproximadamente 10.000 grânulos/poço). As amostras foram adquiridas em *FACS Canto II*, e pelo menos 1.000 eventos de grânulos foram obtidos por amostra. A

sobrevivência de células-alvo foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de sobrevivência} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de eventos celulares experimentais} / \text{n}^\circ \text{ de eventos granulares experimentais}}{\text{n}^\circ \text{ de eventos celulares de controle} / \text{n}^\circ \text{ de eventos granulares de controle}} \times 100\%$$

Resultados

CARACTERIZAÇÃO DO CLONE

[0068] 1. Células T $\gamma\delta$ purificadas de um doador saudável (9909) sensibilizadas e estimuladas de novo com um pool de três linhagens de células linfoblastoides não autólogas (-0439, -pt146 e -HOM-2). Reatividade para cada uma das linhagens de células foi testada no 28º dia (Figura 1). A linhagem de células T também reconheceu LCL-9909 autóloga (Figura 1).

[0069] 2. Células T da linhagem acima mencionada foram classificadas por citometria de fluxo com base na reatividade a cada uma das LCLs e seus TCRs analisados por sequenciamento da próxima geração (Figura 1). Para o sequenciamento da cadeia γ , duas únicas CDR3s estavam presentes com cadeias variáveis TRGV9 e TRGV3. Para as cadeias δ , três CDR3s estavam presentes com cadeias variáveis TRDV1 e TRDV2.

[0070] 3. Clones de células T obtidos da linhagem de células T do doador 9909 expressaram um TCR $\gamma\delta 1$ e CDR3s CATWDRRDYKKL e CALGVLPTVTGGGLIF para cada respectiva cadeia (Figura 1 e Figura 2). Todos os clones que cresceram expressaram o mesmo TCR. Esse clone foi nomeado SW.3G1.

[0071] Coloração de SW.3G1 por Ab confirmou expressão da cadeia $V\delta 1$ e $\alpha\beta$ TCR-/CD8 baixo/CD4- (Figura 1B).

[0072] 4. Ensaios de ativação empregando TNF α e CD107a como leituras confirmaram reatividade de SW.3G1 em relação a LCL-9909 autólogo e LCL-0439 não-autólogo (Figura 3A). Doadores 9909 e 0439 são completamente incompatíveis com HLA para alelos de MHC tanto da classe I quanto da classe II, portanto SW.3G1 reconhece células-alvo de um modo independente de HLA. SW.3G1 também foi capaz de lisar LCL-9909 e -0439 e é portanto citotóxico (Figura 3B). O reconhecimento das LCLs foi dependente do processo de imortalização quando EBV infecta uma célula B, na medida em que células B autólogas saudáveis purificadas diretamente ex vivo a partir de 9909 não atuaram como alvos para SW.3G1 (Figura 3C). Similarmente, as células CIL-1 (células epiteliais) e Hep2 (hepatócitos) saudáveis não induziram ativação de SW.3G1 (Figura 3D).

[0073] 5. SW.3G1 foi capaz de lisar todas as LCLs de 24 doadores testados (Figura 3B para a LCL autóloga e Figura 4A para 23 LCLs não autólogas) proporcionando confirmação adicional de que SW.3G1 atua de um modo independente de HLA. Além disso, LCL.174 (Figura 4A, 4ª barra a partir da esquerda) expressa apenas uma cópia do cromossoma 6, o cromossoma humano que transporta o locus de MHC. O cromossoma 6 em célula LCL.174 contém uma grande supressão e não é portador de genes para MHC classe II e muitos componentes envolvidos no processamento do antígeno MHC classe I.

[0074] 6. SW.3G1 matou 23 linhagens de células de câncer que se originam de oito tecidos diferentes: pele/melanoma, rim, cólon, mama, sangue/leucemia, pulmão, colo do útero e ossos (Figura 4B).

[0075] 7. SW.3G1 não respondeu ao antígeno de células T $\gamma\delta$ conhecido, HMB-PP (Figura 5A), o qual leva ao reconhecimento de células infectadas por agentes patogênicos, o subconjunto de células T Vy9V δ 2 TCR de um modo semelhante ao reconhecimento do próprio pirofosfato. Essa via requer células-alvo para expressar Butirofilina

3A1. Reatividade de SW.3G1 para com LCL-9909 (autóloga) -0439 e -pt146 não foi prejudicada por inclusão de anticorpos bloqueadores que se ligam a ligantes de células T $\gamma\delta$ conhecidos: Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) Classe I relacionado com cadeias A e B (MICA/MICB), Receptor de Proteína C Endotelial EPCR (EPCR) e CD1 d (Figura 5B). MHC classe I e classe II também não conseguiu ativação do bloco SW.3G1. Apesar de não ser um extenso processo de exclusão, esses dados sugerem que SW.3G1 pode reconhecer um ligante TCR $\gamma\delta$ desconhecido na superfície das células cancerosas. Portanto, uma abordagem de biblioteca de CRISPR/Cas9 de genoma inteiro foi adotada para encontrar genes/proteínas candidatas envolvidas no reconhecimento de células-alvo por SW.3G1 (Figura 6).

[0076] 8. Bibliotecas de CRISPR/Cas9 de genoma inteiro foram usadas para criar genes knockout em LCL-9909 autóloga e a linhagem celular de leucemia mieloide haploide KBM7. Ambas as bibliotecas foram coincubadas com SW.3G1 para ciclos sucessivos de seleção para enriquecer células-alvo contendo gRNAs que permitiram escape de lise mediada por SW.3G1 (Figura 7A). A reatividade de SW.3G1 caiu de 59% para LCL-9909 pré-selecionada para 12% pós-seleção. Para KBM7s, a reatividade foi de 12% para 4,2%. As LCL-9909s e KBM7s pós-selecionadas foram usadas para sequenciamento da próxima geração para identificar gRNAs que tinham sido enriquecidas. Genes-chave foram identificados com 4 do total de 7 genes compartilhados entre as bibliotecas de LCL-9909 e KBM7 (Figuras 7B e 7C). Guias específicos para o gene SCNN1A (também usado aqui para descrever a proteína codificada), que codifica a proteína de Sódio Canal Epitelial Subunidade Alfa 1, foram altamente enriquecidos presentes em ambas as bibliotecas (Figura 7B e C). Alcinhas do gene e proteína SCNN1A são mostradas na Figura 8. A proteína é expressa na superfície celular e, portanto, é uma boa candidata a posterior

exploração. SCNN1A tem seis isoformas variantes de splicing e várias mutações que ocorrem naturalmente (Figuras 8 e 9).

[0077] 9. LCL.174 transduzida com gRNA de SCNN1A da biblioteca de genoma inteiro (GeCKO, gRNA-1) ou uma guia diferente concebida internamente (gRNA-2) (Figura 10A) não eram mais alvos de SW.3G1, confirmando assim o papel de SCNNIA no reconhecimento de células-alvo (Figura 10B), com lise caindo abaixo de 5% para as linhagens de células knockout em comparação com 100% de morte de células do tipo selvagem. Linhagens knockout do gene SCNN1A foram criadas em duas células cancerosas, que escaparam parcial ou completamente de lise por SW.3G1 (Figura 10C). É digno de nota que as células knockout por SCNN1 criadas ao longo deste estudo foram usadas como linhagens e não clonadas antes de realizar ensaios. Isso pode responder pela reatividade residual vista em algumas das linhagens de células 'knockout', na medida em que uma proporção minoritária de células dentro de uma linhagem knockout provavelmente ainda expressa SCNN1A, devido à fuga de seleção de puromicina e/ou ablação mal sucedida do gene SCNNIA. Análise Western blot das células MDA-MB-231 knockout por SCNN1A usadas para ensaios de ativação de SW.3G1 revelou uma redução substancial da proteína SCNN1A na linhagem celular knockout em comparação com as células de tipo selvagem (Figura 10C) que confirmam o gene knockout. O Ab utilizado pode reconhecer todas as isoformas de SCNN1A (Figura 9). Observamos, também, que as células knockout por SCNN1A tornaram-se menos viáveis com cultura extensiva (3+ semanas) e em alguns casos a divisão celular parou completamente. Essa observação era única para o gRNA de SCNN1A, uma vez que as mesmas linhagens de células transduzidas com gRNAs para muitos outros genes não exibem a mesma alteração no crescimento e vitalidade celulares. Esse resultado sugeriu que o

gene SCNN1A é essencial para o crescimento de longo prazo de células em cultura.

[0078] 10. Transferência do TCR de SW.3G1 para células T CD8 + policlonais de três doadores saudáveis conferiu reatividade à célula-alvo LCL-pt146 (Figura 11 A). Células transduzidas com TCR apresentaram o mesmo perfil funcional para células knockout por SCNN1A como descrito acima para o clone SW.3G1 (Figura 11 B). Para complementar os dados de SCNN1A knockout e confirmar adicionalmente o papel de SCNN1A no reconhecimento de células-alvo, as células knockout foram transduzidas com o gene SCNN1A. A introdução de um gene SCNN1A nativo para knockout de células que expressam os gRNAs de SCNN1A levaria a ablação do transgene do gene. Portanto, um gene otimizado com códons foi introduzido, diferente da sequência de DNA do gene nativo (Isoforma 1 UniProt P37088-1, Figura 9), mas que expressam a mesma proteína. Eliminação das células transduzidas por gRNA-1 ou gRNA-2 foi suprimida, mas poderia ser restaurada mediante expressão do gene SCNN1A nas células knockout.

Conclusão

[0079] O TCR de SW.3G1 permite que células T reconheçam uma grande variedade de tumores. Reconhecimento ocorre por meio do produto do gene SCNN1A. O clone das células T SW.3G1 reconhece um ligante específico para SCNN1A com células cancerosas na ausência de restrição MHC.

[0080] A presente invenção gira em torno do TCR identificado em no clone SW.3G1 de células T. Esse TCR reconhece uma ampla variedade de células cancerosas pela expressão de SCNN1A. Esse TCR não reconhece células não tumorais. *Knockout* de SCNN1A por CRISPR/Cas9 de linhagens tumorais ou bloqueio de anticorpos confirmou que TCR requer o produto do gene SCNN1A para

reconhecimento de células tumorais. O TCR de SW.3G1 pode ser empregado em uma variedade de diferentes estratégias de imunoterapia do câncer. O amplo reconhecimento de tumores e independência de reconhecimento de antígeno de leucócitos humanos (HLA) desbloqueia possibilidades interessantes para imunoterapias de pan-população pancancerosa utilizando esse TCR.

REFERÊNCIAS

Chen, J., TR Kleyman e S. Sheng. 2014 *Deletion of α -subunit exon 11 of the epithelial Na⁺ channel reveals a regulatory module. Am J Physiol. Renal Physiol* 306, F561-7.

Donia, M., Kjeldsen, J.W., Andersen, R., Westergaard, M.C.W., Bianchi, V., Legut, M., Attaf, M., Szomolay, B., Ott, S., Dolton, G., Lyngaa, R., Hadrup, S.R., Sewell, A.K., Svane, I.M., 2017. *PD-1⁺ polyfunctional T cells dominate the periphery after tumor-infiltrating lymphocyte therapy for cancer. Clin. Cancer Res. clincanres.1692.2016.*

Ekeruche-Makinde, J., Clement, M., Cole, D.K., Edwards, E.S.J., Ladell, K., Miles, J.J., Matthews, K.K., Fuller, A., Lloyd, K.A., Madura, F., Dolton, G.M., Pentier, J., Lissina, A., Gostick, E., Baxter, T.K., Baker, B.M., Rizkallah, P.J., Price, D.A., Wooldridge, L., Sewell, A.K., 2012. *T-cell receptor-optimized peptide skewing of the T-cell repertoire can enhance antigen targeting. J. Biol. Chem.* 287, 37269–81.

Haney, D., Quigley, M.F., Asher, T.E., Ambrozak, D.R., Gostick, E., Price, D.A., Douek, D.C., Betts, M.R., 2011. *Isolation of viable antigen-specific CD8⁺ T cells based on membrane-bound tumor necrosis factor (TNF)-alpha expression. J. Immunol. Methods* 369, 33–41.

Legut, M., G Dolton, A.A. Mian, O. Ottmann and A.K. Sewell. 2017 *CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T-cells. Blood* [Epub antes da impressão] DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-787598>

Patel, S.J., Sanjana, N.E., Kishton, R.J., Eidizadeh, A., Vodnala, S.K., Cam, M., Gartner, J.J., Jia, L., Steinberg, S.M., Yamamoto, T.N., Merchant, A.S., Mehta, G.U., Chichura, A., Shalem, O., Tran, E., Eil, R., Sukumar, M., Guijarro, E.P., Day, C.-P., Robbins, P., Feldman, S., Merlino, G., Zhang, F., Restifo, N.P., 2017. *Identification of essential genes for cancer immunotherapy. Nature* **548**, 537–542.

Theaker, S.M., Rius, C., Greenshields-Watson, A., Lloyd, A., Trimby, A., Fuller, A., Miles, J.J., Cole, D.K., Peakman, M., Sewell, A.K., Dolton, G., 2016. *T-cell libraries allow simple parallel generation of multiple peptide-specific human T-cell clones. J. Immunol. Methods* **430**, 43–50.

REIVINDICAÇÕES

1. Receptor de células T específico para tumores (TCR), ou um fragmento do mesmo, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) que compreende ou consiste em CATWDRRDYKKLF (SEQ ID NO: 1) e/ou CALGVLPTVTGGGLIF (SEQ ID NO: 2), ou um CDR que compartilha pelo menos 88% de identidade com qualquer CDR (isto é, SEQ ID NO: 1 ou 2).

2. Receptor de células T específico para tumores (TCR), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o TCR compreende ambos os CDRs.

3. Receptor de células T específico para tumores (TCR), de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o TCR compreende ou consiste em um ou mais, incluindo qualquer combinação, das seguintes regiões determinantes de complementaridade:

VTNTFY (CDR1y) SEQ ID NO: 3

YDVSTARD (CDR2y) SEQ ID NO: 4

TSWWSYY (CDR1 δ) SEQ ID NO: 5 ou

QGS (CDR2 δ) SEQ ID NO: 6.

4. Receptor de células T específico para tumores (TCR), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é uma cadeia gama que compreende ou consiste em:

SSNLEGRTKSVTRQTGSSAEITCDLVTNTFYIHWYHQEGKAPQRLLYYDVST
ARDVLESGLSPGKYHTHTPRRWSWILRLQNLINDSGVYYCATWDRRDYKKLF
GSGTTLVVDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKHWQ
EKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPEKSLDKEHRCIVRHENKNGVD
QEIIFFPIKT (SEQ ID NO:7) ou uma cadeia gama que compartilha pelo menos 88% de identidade com essa sequência.

5. Receptor de células T específico para tumores (TCR), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo

fato de que é uma cadeia delta que compreende ou consiste em:
AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYIFWYKQLPSKEMIFLIRQGS
DEQNAKSGRYSVNFKKAASVALTISALQLEDSAKYFCALGVLPTVTGGGLIFG
KGTRVTVEPNSQPHTKPSVFMKNGTNAVACLVKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDP
AIVISPSGKYNAVKLGKYEDSNSVTCSVQHDKTVHSTDFEVKTDST (SEQ ID
NO: 8) ou uma cadeia delta que compartilha pelo menos 88% de
identidade com essa sequência.

6. Receptor de células T específico para tumores (TCR), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a CDR do TCR compreende ou consiste adicional ou alternativamente em uma sequência da cadeia gama que é CALWEVDYKKLF (SEQ ID NO: 9), e/ou uma sequência da cadeia delta que é CALGEPVLFVAVRGLIF (SEQ ID NO: 10) e/ou CACDLLGDRYTDKLIF (SEQ ID NO: 11), ou uma CDR que compartilha pelo menos 88% de identidade com a sequência da cadeia gama ou a sequência da cadeia delta.

7. Receptor de células T específico para tumores (TCR), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que é solúvel.

8. Célula T, caracterizada pelo fato de que expressa o TCR como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

9. Clone de células T, caracterizado pelo fato de que expressa o TCR como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

10. Clone de células T, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que é um clone SW.3G1.

11. Vetor, caracterizado pelo fato de que codifica o TCR como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

12. Composição farmacêutica ou agente imunogênico ou biespecífico ou vacina, caracterizados pelo fato de que compreendem o TCR como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou a

célula como definida na reivindicação 8, ou o clone como definido na reivindicação 9 ou 10 ou o vetor como definido na reivindicação 11.

13. TCR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou a célula de acordo com a reivindicação 8, ou o clone de acordo com a reivindicação 9 ou 10, ou o vetor de acordo com a reivindicação 11, ou a composição farmacêutica ou agente imunogênico ou biespecífico ou vacina de acordo com a reivindicação 12, caracterizados pelo fato de que se destinam ao uso no tratamento de câncer.

14. TCR, a célula, o clone, o vetor, a composição farmacêutica ou agente imunogênico ou biespecífico ou vacina, de acordo com a reivindicação 13, caracterizados pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo que compreende ou consiste em câncer colorretal, de pulmão, renal, de próstata, bexiga, colo do útero, melanoma (pele), ósseo, mama, câncer de sangue, cérebro, pâncreas, testículo, ovário, cabeça/pescoço, fígado, tireoide e uterino.

15. Método de tratamento de câncer, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um indivíduo a ser tratado o TCR como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou a célula como definida na reivindicação 8, ou o clone como definido na reivindicação 9 ou 10, ou o vetor como definido na reivindicação 11, ou a composição farmacêutica ou agente imunogênico ou biespecífico ou vacina como definido na reivindicação 12.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo que compreende ou consiste em câncer colorretal, de pulmão, renal, de próstata, bexiga, colo do útero, melanoma (pele), ósseo, mama, câncer de sangue, cérebro, pâncreas, testículo, ovário, cabeça/pescoço, fígado, bexiga, tireoide e uterino.

17. Método, de acordo com a reivindicação 15 ou 16,

caracterizado pelo fato de que o TCR, célula, clone, vetor, composição farmacêutica, agente imunogênico, biespecífico ou vacina são administrados em combinação com um agente antitumoral.

18. Uso do TCR como definido nas reivindicações 1 a 7, ou da célula como definida na reivindicação 8, ou do clone como definido na reivindicação 9 ou 10, ou do vetor como definido na reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que se destina à fabricação de um medicamento para tratar câncer.

19. Combinação terapêutica para o tratamento de câncer, caracterizada pelo fato de que compreende:

a) o TCR como definido nas reivindicações 1 a 7, ou a célula como definida na reivindicação 8, ou o clone como definido na reivindicação 9 ou 10, ou o vetor como definido na reivindicação 11, ou a composição farmacêutica ou agente imunogênico ou biespecífico ou vacina como definido na reivindicação 12, em combinação com:

b) outro agente terapêutico para câncer.

20. TCR ou polipeptídeo ou biespecífico ou anticorpo, ou um fragmento desse anticorpo, caracterizados pelo fato de que se ligam a pelo menos uma das isoformas de produtos do gene SCNNA1 mostradas na Figura 9.

21. TCR ou polipeptídeo ou biespecífico ou anticorpo, ou um fragmento desse anticorpo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizados pelo fato de que se ligam ao domínio extracelular da isoforma.

22. TCR ou polipeptídeo ou biespecífico ou anticorpo, ou um fragmento desse anticorpo, de acordo com a reivindicação 20 ou reivindicação 21, caracterizados pelo fato de que o anticorpo é monoclonal.

23. Pelo menos uma isoforma de produtos do gene SCNNA1 mostrada na Figura 9, ou um fragmento da mesma,

caracterizada pelo fato de que se liga a um TCR como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

24. TCR, célula, clone, vetor, composição farmacêutica, agente imunogênico, biespecífico ou vacina ou polipeptídeo ou anticorpo, ou um fragmento desse anticorpo, caracterizados pelo fato de que são substancialmente como aqui descritos.

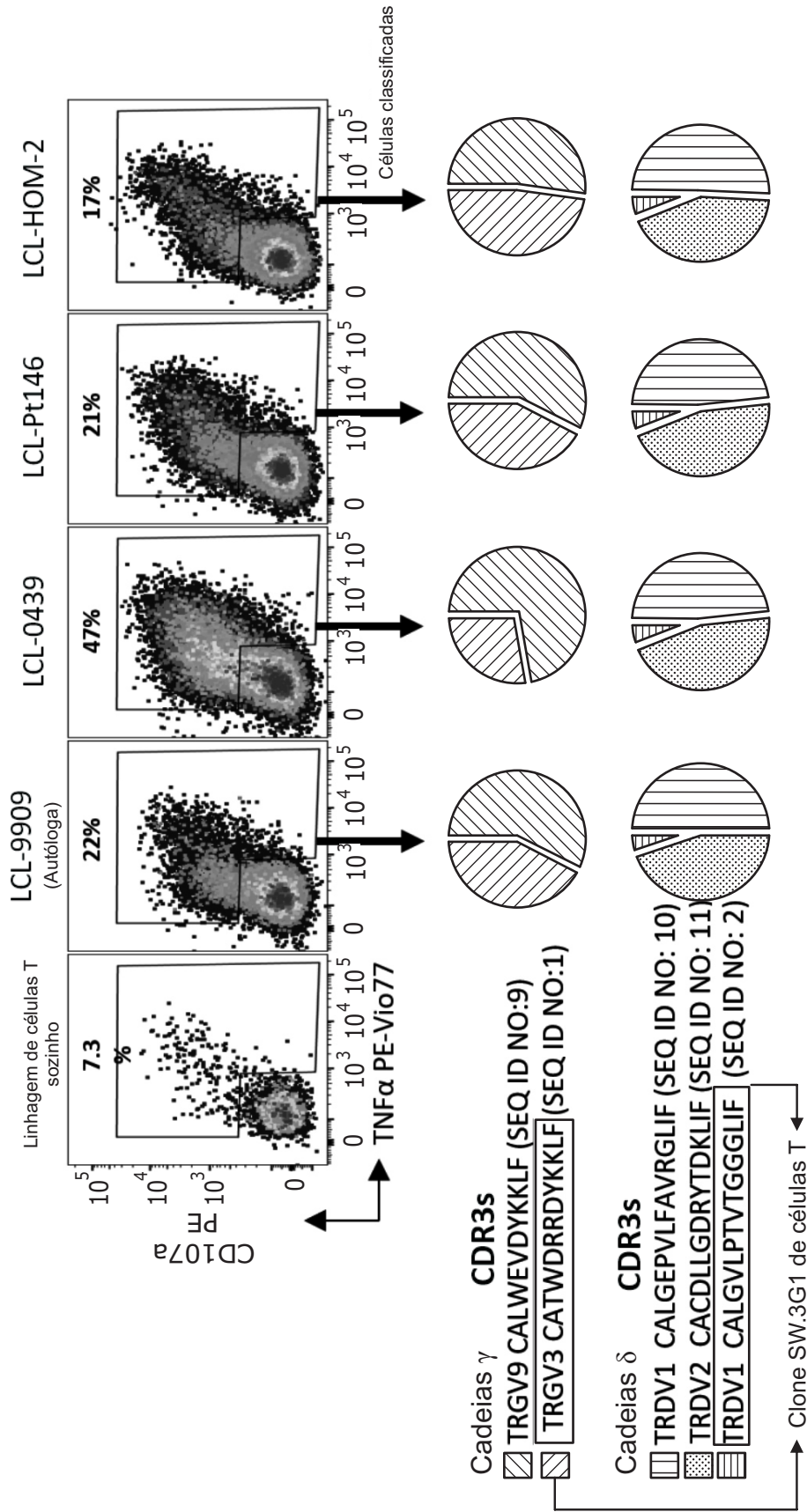


FIG. 1A

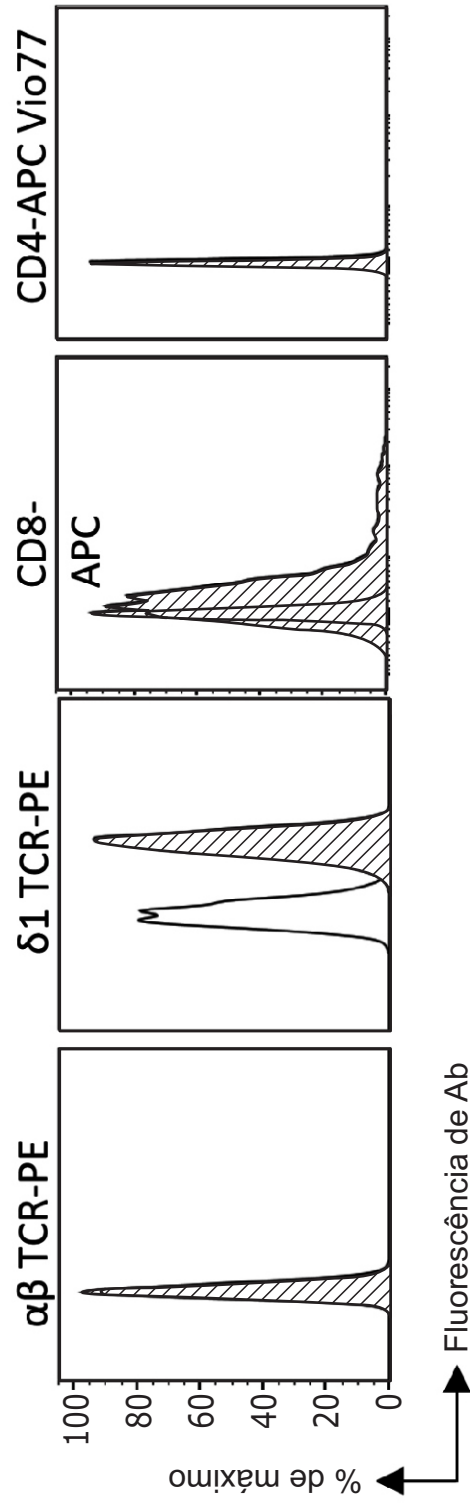


FIG. 1B

Sequência da proteína da cadeia V γ 3 do clone SW.3G1

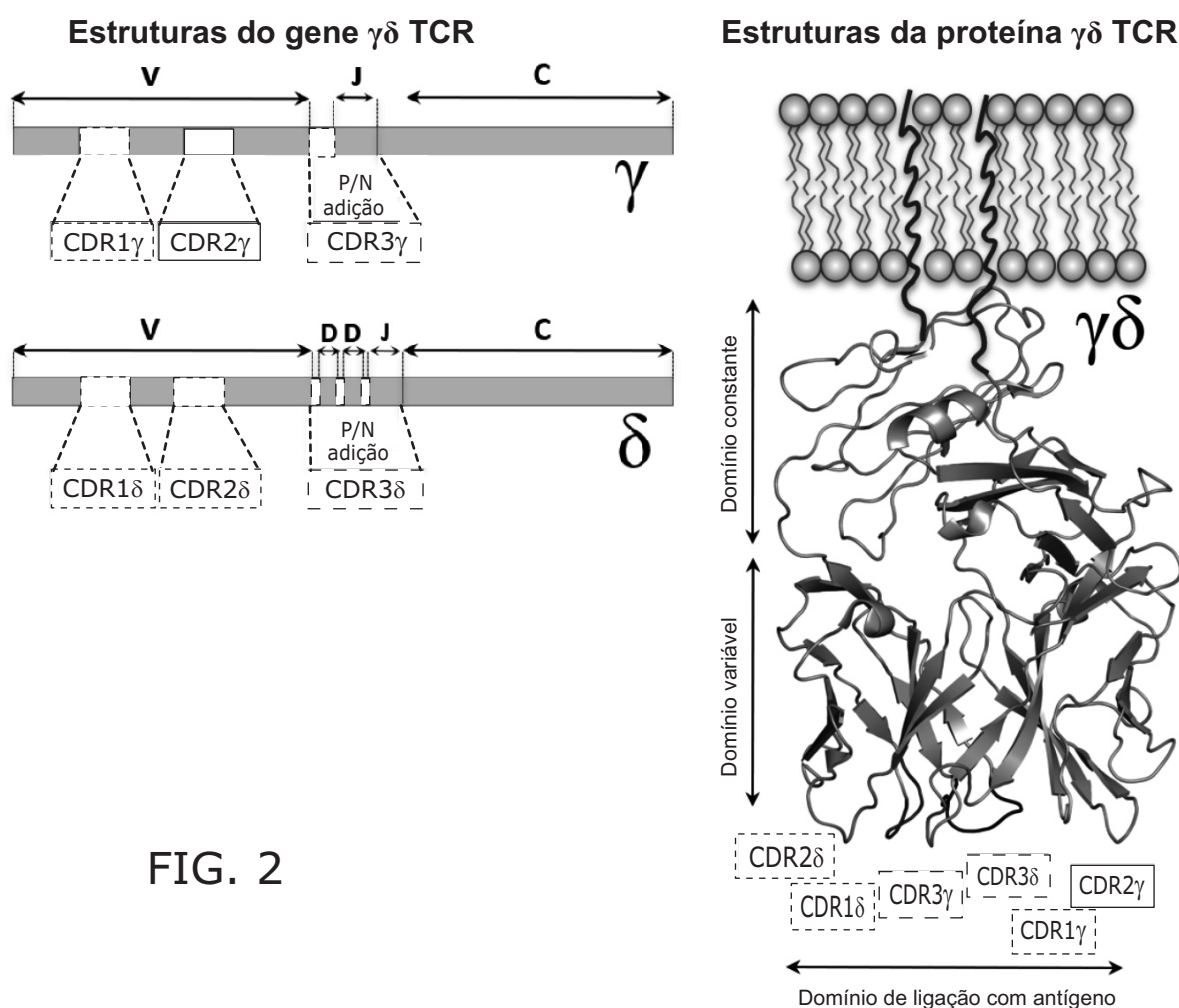
Regiões CDR são mostradas em texto sublinhado em negrito e codificadas em cor na figura

SSNLEGRTKSVTRQTGSSAEITCDLTVTNTFYIHWYLHQEGKAPQRLLY**YDVSTARD**VLESGLSPGKYTHHT
 PRRWSWILRLQNLIENTSGVYY**CATWDRRDYKRLF**GSGTTLVVTDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKA
 GTYLCLEKFFPDVIKIHWEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPEKSLDKEHRCIVRHENKNG
 VDQEIIFPIKT (SEQ IN NO: 7)

Sequência da proteína da cadeia V δ 3 do clone 3G1

Regiões CDR são mostradas em texto sublinhado em negrito e codificadas em cor na figura

AQKVTQAQSSVSMVPVRKAVTLNCLYE**TSWWSYY**IFWYKQLPSKEMIFLIR**QGS**DEQNAKSGRYSVNFKK
 AAKSVALTISALQLEDSAKYFC**ALGVLPTVTGGGLIF**GKGTTRVTEPN SQPHTKPSVFMKNGTNAVCLVK
 EFYPKDIRINLVSSKITEFDP~~AI~~VISPSGKYNAVKLGKYEDSNVTCVQHDNKT~~VH~~STDFEVKTDST (SEQ
 ID NO: 8)



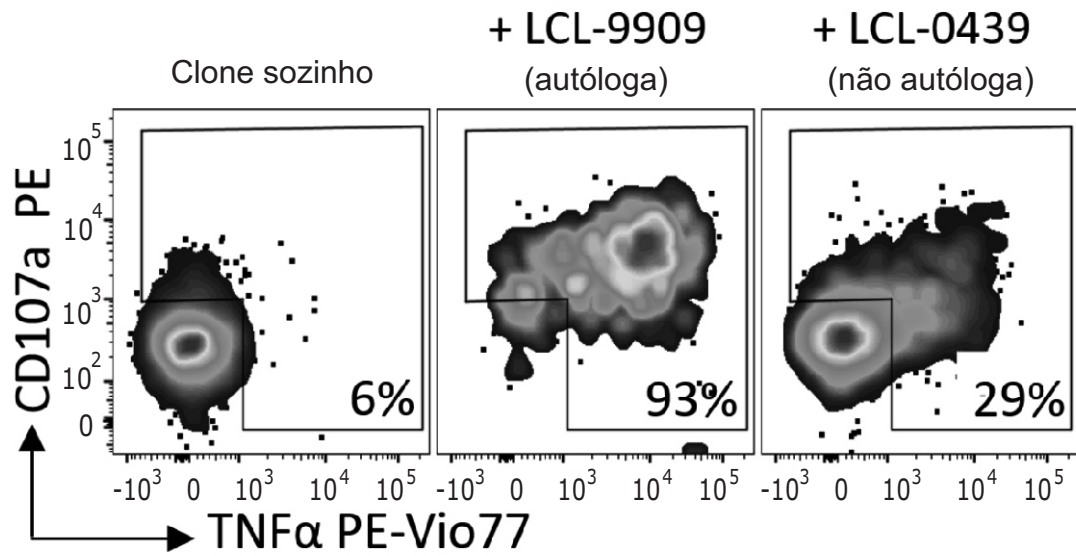


FIG. 3A

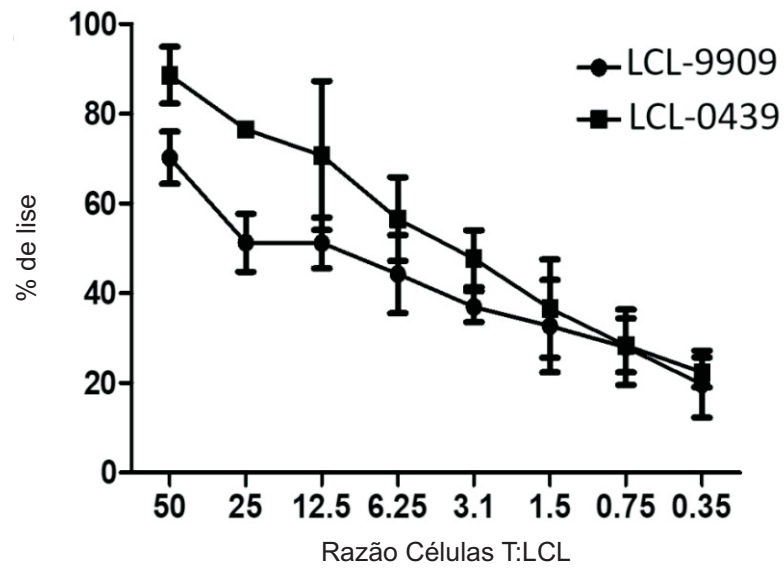


FIG. 3B

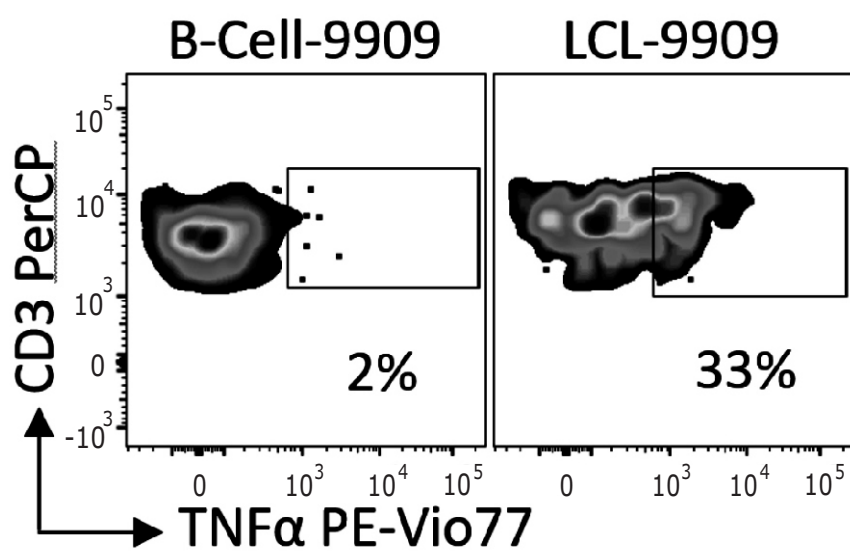


FIG. 3C

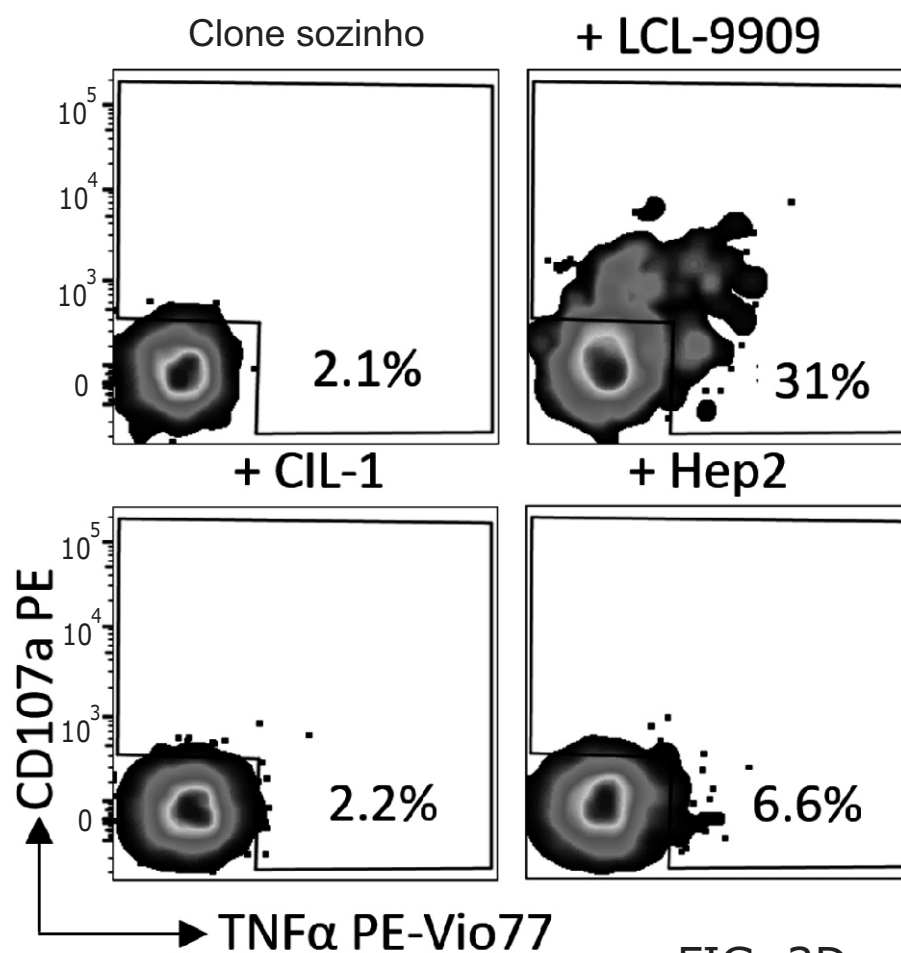


FIG. 3D

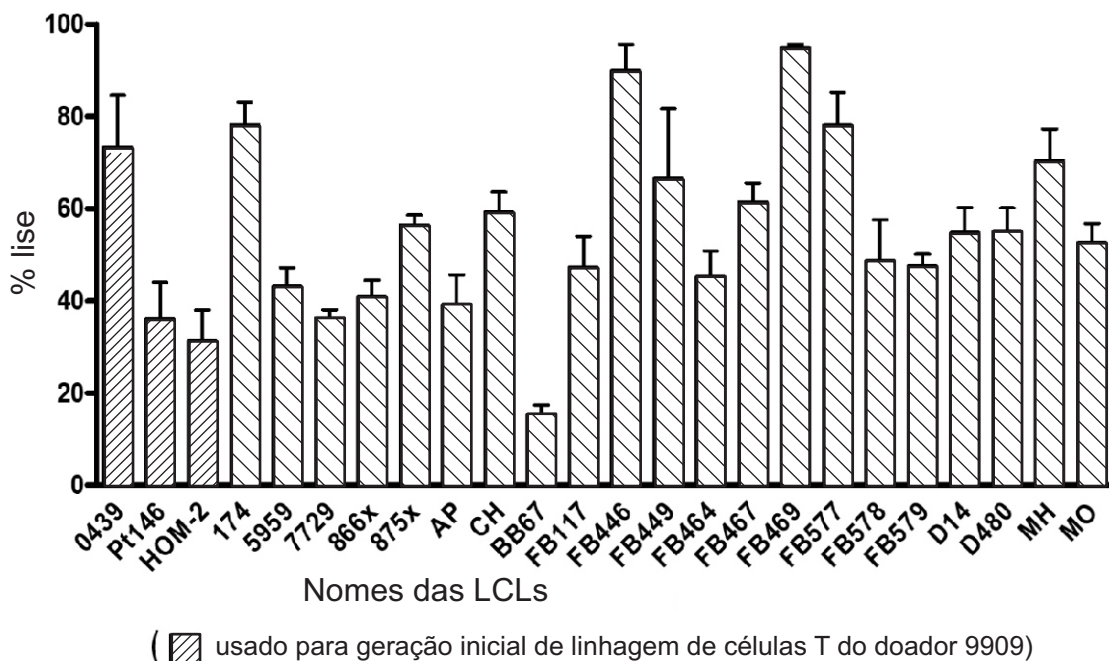


FIG. 4A

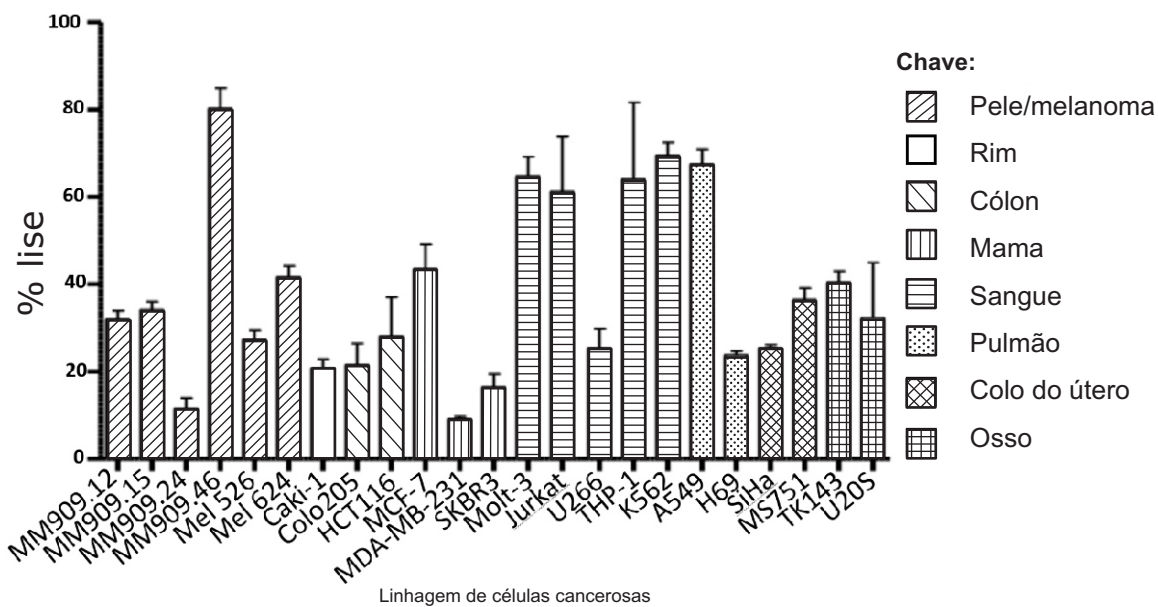


FIG. 4B

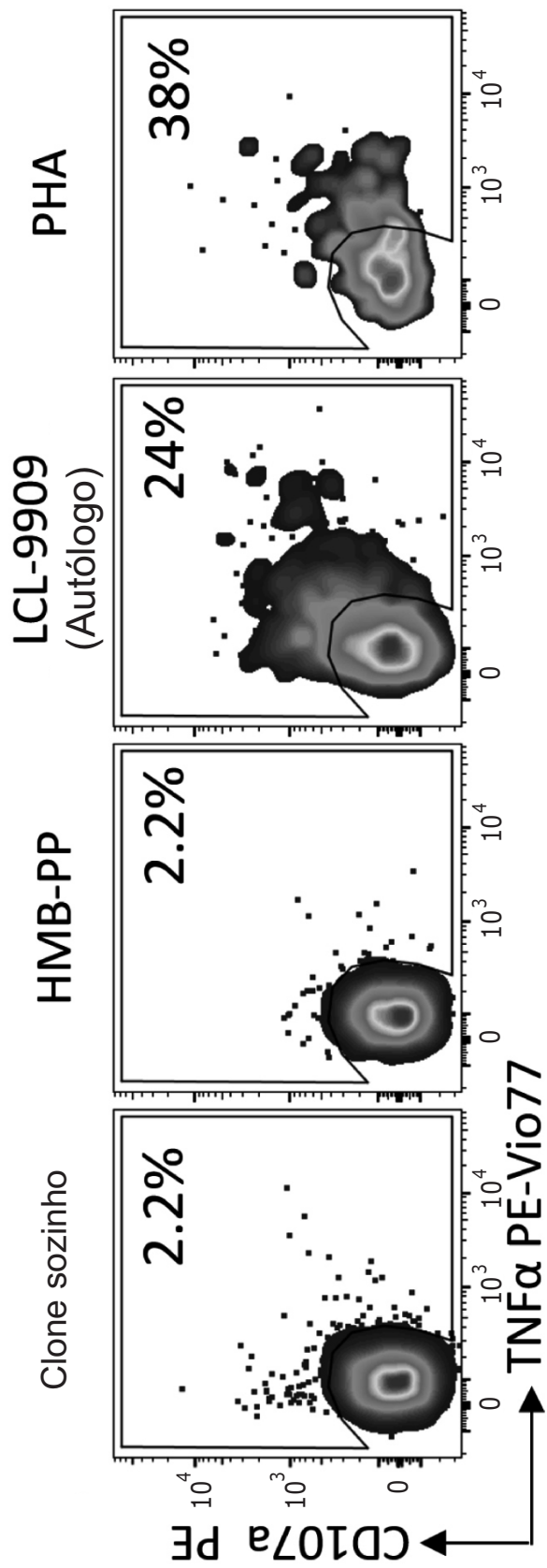


FIG. 5A

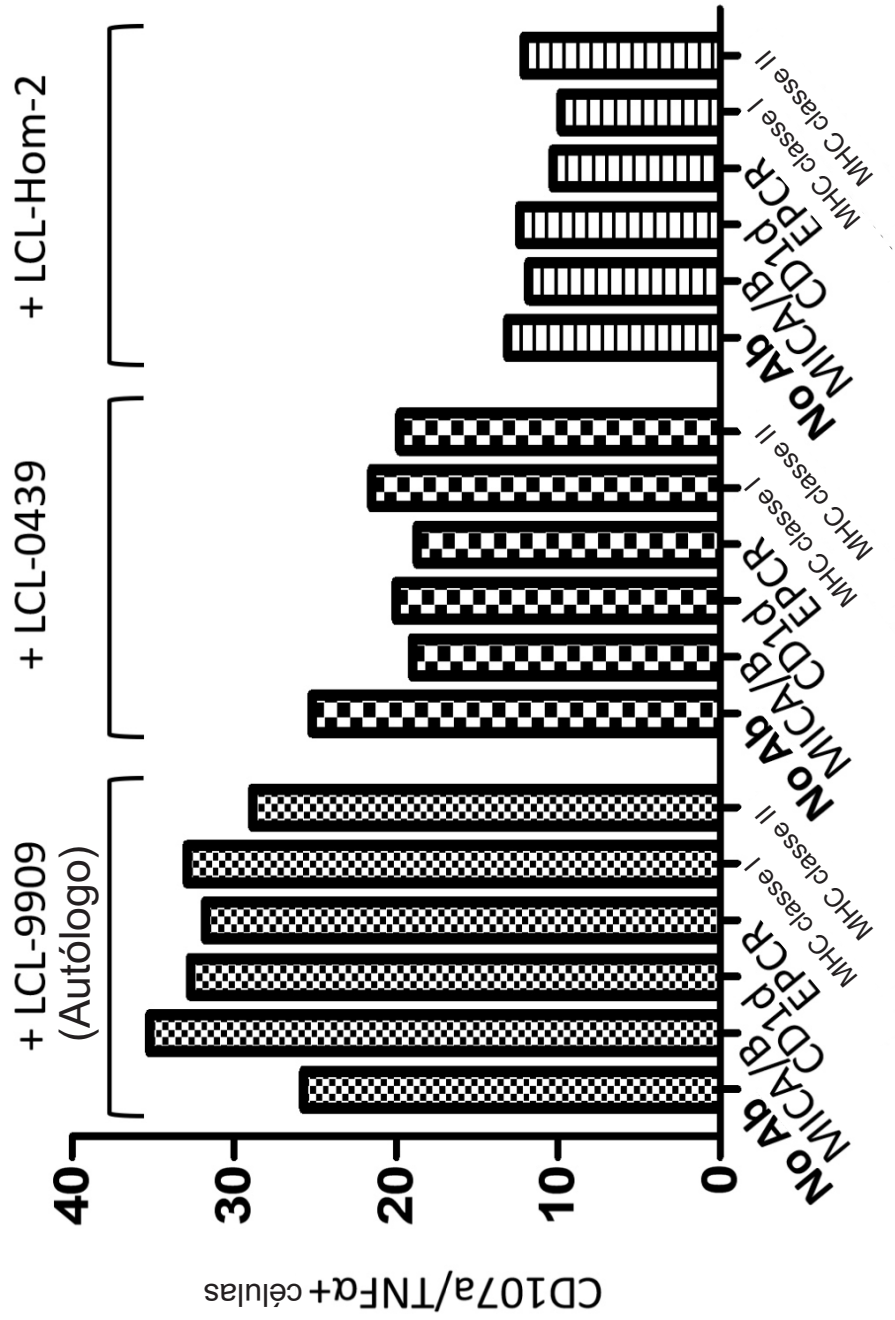


FIG. 5B

O Poder do CRISPR de Genoma Inteiro

Bibliotecas lentivirais de CRISPR de genoma inteiro permite *knockout* de todos os genes em qualquer linhagem de alelos. Estratégias de seleção simples permitem então descoberta de todos os genes ligados a um dado processo

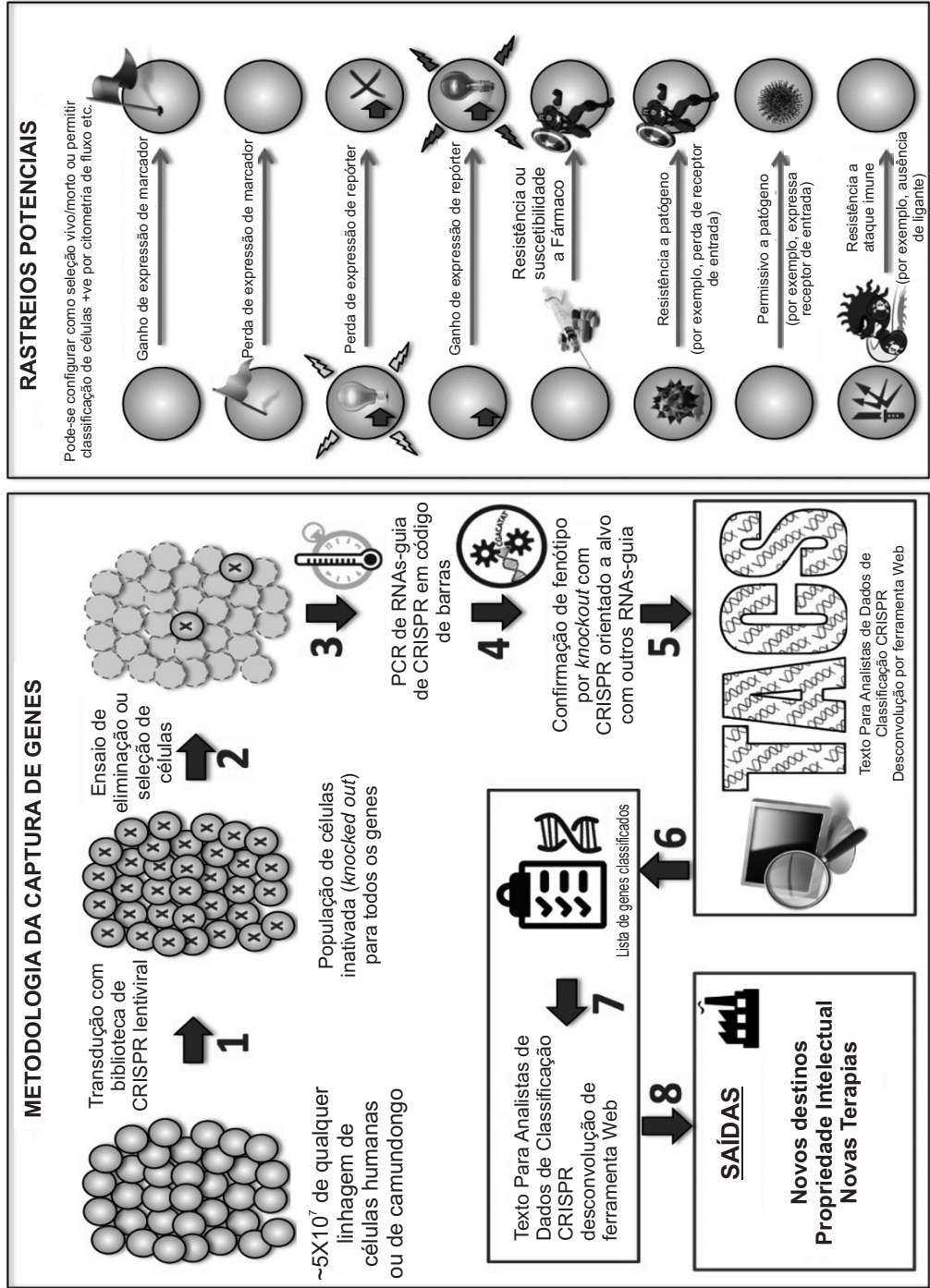


FIG. 6

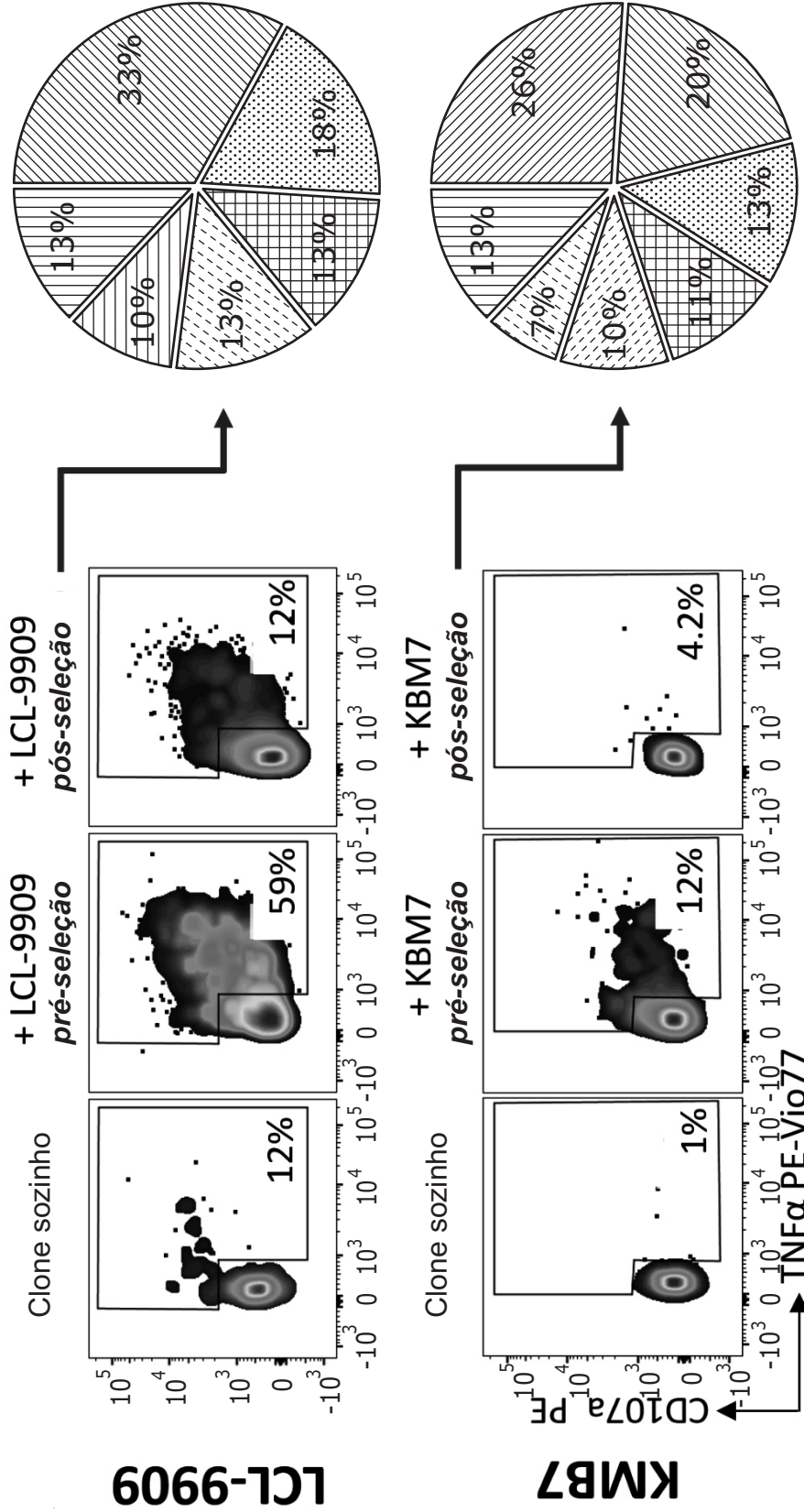


FIG. 7B

FIG. 7A

LCL-9909 e KMB7:

 Gene: **SCNN1A** (Canal de Sódio Subunidade Epitelial 1 Alfa)
<http://www.uniprot.org/uniprot/P37088>

 Gene: **DTNB** (Distrobrevina Beta)
<http://www.uniprot.org/uniprot/O60941>

 Gene: **NDUFV3** (NADH: Ubiquinona Oxidorredutase Subunidade V3)
<http://www.uniprot.org/uniprot/P56181>

 Gene: **LRR1Q3** (Repetições Ricas em Leucina e IQ Motif Contendo 3)
<http://www.uniprot.org/uniprot/A6PV58>

 Outros genes

LCL-9909:

 Gene: *Homo sapiens* (Hsa) **MIR610** (microRNA 610)
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR610>

KBM7:

 Gene: **ZYX** (Zyxin)
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q15942>

 Gene: **NSUNS** (Provável 28S rRNA (citosina-C(S)-metiltransferase)
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q96P11>

FIG. 7C

Alcunhas do Gene: SCNN1A; BESC2; ENaCa; ENaCalpha; SCNEA; SCNN1.

Alcunhas da Proteína: Alfa ENaC 2: Alpa ENaC: Alpa NaCH: subunidade epitelial alfa canal de sódio sensível à amiloide; subunidade alfa canal de sódio sensível à amiloide; subunidade alfa 2 canal de sódio sensível à amiloide; ENaCalpa; Epitelial: subunidade epitelial alfa canal a (+); subunidade epitelial alfa canal Na(+); FLJ21883: subunidade epitelial nasal alfa canal de sódio; subunidade alfa canal de sódio 1 com porta sem voltagem; SCNEA; SCNN1: subunidade alfa com porta sem voltagem 1, canal de sódio; subunidade alfa com porta sem voltagem 1, canal de sódio; alfa com porta sem voltagem 1, canal de sódio.

12/18

Isoformas: Seis isoformas variantes de *splicing* descritas (**Figura 9**). Identificação Universal de Fontes de Proteínas (UniProt): P37088 -1, -2, -3, -4, -5 e -6. A Isoforma 1 é considerada a sequência canônica e foi **usada para este estudo**. Comprimento e tamanho (kDa) dos aminoácidos para cada respectiva isoforma: 669/75,704; 728/81,856; 245/28,328; 650/73,603; 691/77,980; 692/78,234. Foram descritas variantes naturais.

Anticorpos: PA5-29136: Policlonal de coelho anti-humano contra os resíduos 272-555. PA5-35364: Policlonal de coelho contra os resíduos 365-391. PA1-920A: Policlonal de coelho anti-humano (reage de forma cruzada com camundongo e rato) contra os resíduos 20-42, foi **usado para este estudo**. OSR00124W: Policlonal de coelho anti-humano contra o domínio extracelular.

Homologia com outras espécies: 90% com outros primatas e 50% com camundongo.

FIG. 8

Isoforma 1	1	-----M	1
Isoforma 2	1	MGMARGSLTRVPGVMGEGTQGPPELSLDPDPCSPQSTPGLMKGNKLEEQDPRPLQPIPLGLM	60
Isoforma 3	1	-----M	1
Isoforma 4	1	-----M	1
Isoforma 5	1	-----M	1
Isoforma 6	1	-----MSSIRGNKLEEQDPRPLQPIPLGLM	24
	2	EGNKLEEQDSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFEF	61
	61	EGNKLEEQDSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFEF	120
	2	EGNKLEEQDSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFEF	61
	2	EGNKLEEQDSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFEF	61
	2	EGNKLEEQDSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFEF	61
	25	EGNKLEEQDSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFEF	84
	62	FCNNTTIHGAIKRLVCSQHNRMTAFWAVLWLCTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINLN	121
	121	FCNNTTIHGAIKRLVCSQHNRMTAFWAVLWLCTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINLN	180
	62	FCNNTTIHGAIKRLVCSQHNRMTAFWAVLWLCTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINLN	121
	62	FCNNTTIHGAIKRLVCSQHNRMTAFWAVLWLCTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINLN	121
	62	FCNNTTIHGAIKRLVCSQHNRMTAFWAVLWLCTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINLN	121
	85	FCNNTTIHGAIKRLVCSQHNRMTAFWAVLWLCTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINLN	144
	122	SDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRITEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRRDLR	181
	181	SDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRITEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRRDLR	240
	122	SDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRITEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRRDLR	181
	122	SDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRITEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRRDLR	181
	122	SDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRITEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRRDLR	181
	145	SDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRITEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRRDLR	204
	182	GTLPHPLQRLRVPPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSL--DCFYQ	239
	241	GTLPHPLQRLRVPPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSL--DCFYQ	298
	182	GTLPHPLQRLRVPPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSL--DCFYQ	241
	182	GTLPHPLQRLRVPPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSL--DCFYQ	239
	182	GTLPHPLQRLRVPPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSL--DCFYQ	239
	205	GTLPHPLQRLRVPPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSL--DCFYQ	262
	240	TYSSGVDAVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHH	299
	299	TYSSGVDAVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHH	358
	242	LYFG-----	245
	240	TYSSGVDAVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHH	299
	240	TYSSGVDAVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHH	299
	263	TYSSGVDAVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHH	322
	300	PMYGNCYTFNDKNSNLWSSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEP	359
	359	PMYGNCYTFNDKNSNLWSSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEP	418
	246	-----VTGARVMVHGQDEP	245
	300	PMYGNCYTFNDKNSNLWSSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEP	340
	300	PMYGNCYTFNDKNSNLWSSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEP	359

FIG. 9

```

323 PMYGNCYTFNDKNNNLWMSSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEP 382
360 AFMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRLLGGDYGDCTKNGSDVEVENLYPSKYTQQVCIHS 419
419 AFMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRLLGGDYGDCTKNGSDVEVENLYPSKYTQQVCIHS 478
246 ----- 245
341 AFMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRLLGGDYGDCTKNGSDVEVENLYPSKYTQQVCIHS 400
360 AFMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRLLGGDYGDCTKNGSDVEVENLYPSKYTQQVCIHS 419
383 AFMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRLLGGDYGDCTKNGSDVEVENLYPSKYTQQVCIHS 442
420 CFQESMIKECGCAYIFYPRPQNVVEYCDYRKHSSWG-----YCY 457
479 CFQESMIKECGCAYIFYPRPQNVVEYCDYRKHSSWG-----YCY 516
246 ----- 245
401 CFQESMIKECGCAYIFYPRPQNVVEYCDYRKHSSWG-----YCY 438
420 CFQESMIKECGCAYIFYPRPQNVVEYCDYRKHSSWQVRSRSLTPVIPALWEAEAGGSRGYCY 479
443 CFOESMIKECGCAYIFYPRPONVEYCDYRKHSSWG-----YCY 480
458 YKLQVDFSSDHLGCFTKCRKPCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNKK 517
517 YKLQVDFSSDHLGCFTKCRKPCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNKK 576
246 ----- 245
439 YKLQVDFSSDHLGCFTKCRKPCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNKK 498
480 YKLQVDFSSDHLGCFTKCRKPCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNKK 539
481 YKLQVDFSSDHLGCFTKCRKPCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNKK 540
518 RNGVAKVNIFFKELNYKTNSESPSVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLL 577
577 RNGVAKVNIFFKELNYKTNSESPSVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLL 636
246 ----- 245
499 RNGVAKVNIFFKELNYKTNSESPSVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLL 558
540 RNGVAKVNIFFKELNYKTNSESPSVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLL 599
541 RNGVAKVNIFFKELNYKTNSESPSVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLL 600
578 VIMFLMLLRRFRSRYWSPGRGGRGAQEVA STLASSPPSHFC|PHPM|SL|SL|SQ|PG|PAP|SPAL 637
637 VIMFLMLLRRFRSRYWSPGRGGRGAQEVA STLASSPPSHFC|PHPM|SL|SL|SQ|PG|PAP|SPAL 696
246 ----- 245
559 VIMFLMLLRRFRSRYWSPGRGGRGAQEVA STLASSPPSHFC|PHPM|SL|SL|SQ|PG|PAP|SPAL 618
600 VIMFLMLLRRFRSRYWSPGRGGRGAQEVA STLASSPPSHFC|PHPM|SL|SL|SQ|PG|PAP|SPAL 659
601 VIMFLMLLRRFRSRYWSPGRGGRGAQEVA STLASSPPSHFC|PHPM|SL|SL|SQ|PG|PAP|SPAL 660
638 TAPPPAYATLGPRPSPGGSAGASSST|C|PLGGP 669
697 TAPPPAYATLGPRPSPGGSAGASSST|C|PLGGP 728
246 ----- 245
619 TAPPPAYATLGPRPSPGGSAGASSST|C|PLGGP 650
660 TAPPPAYATLGPRPSPGGSAGASSST|C|PLGGP 691
661 TAPPPAYATLGPRPSPGGSAGASSST|C|PLGGP 692

```

FIG. 9 (Cont.)

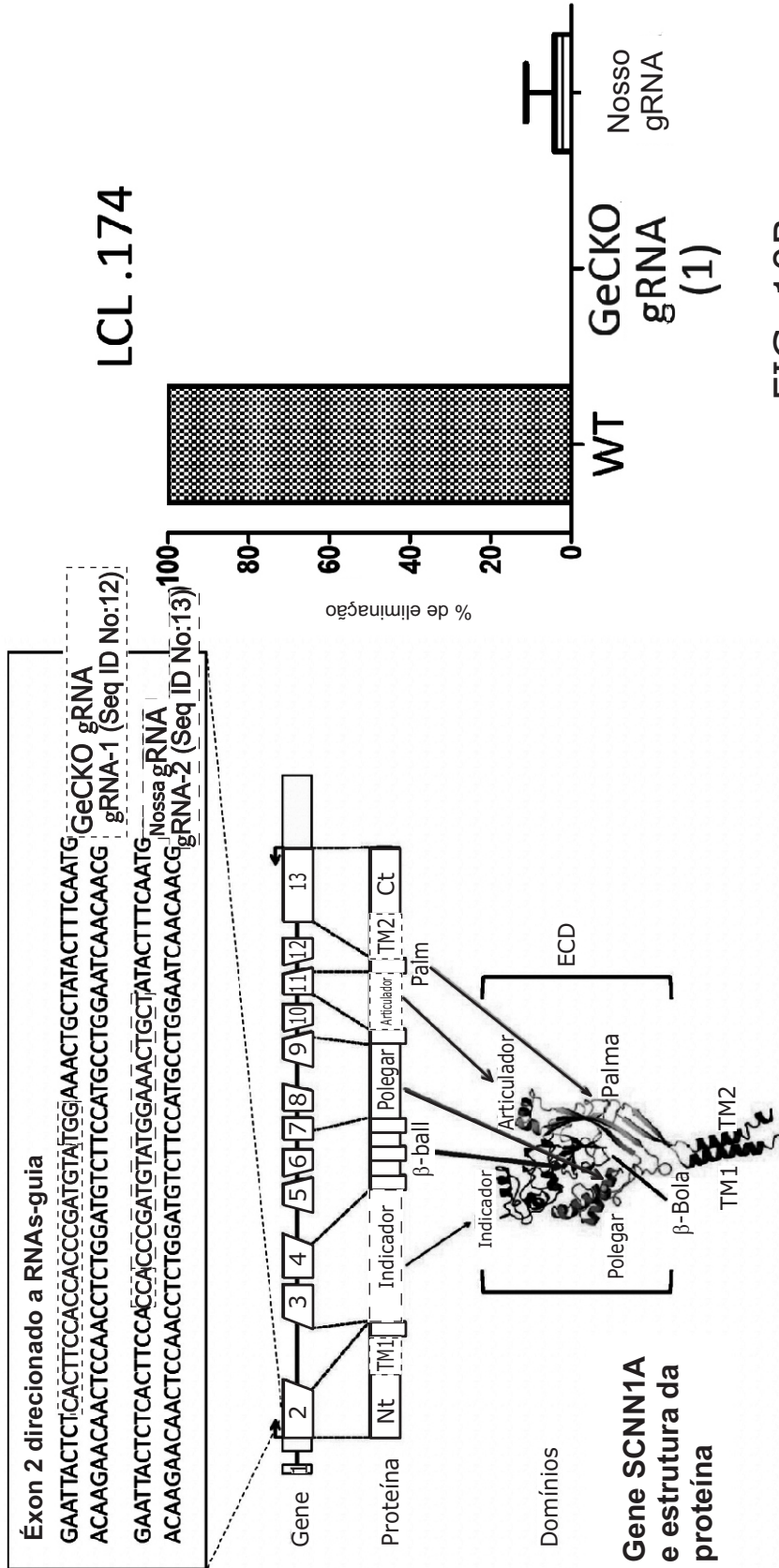


FIG. 10B

FIG. 10A

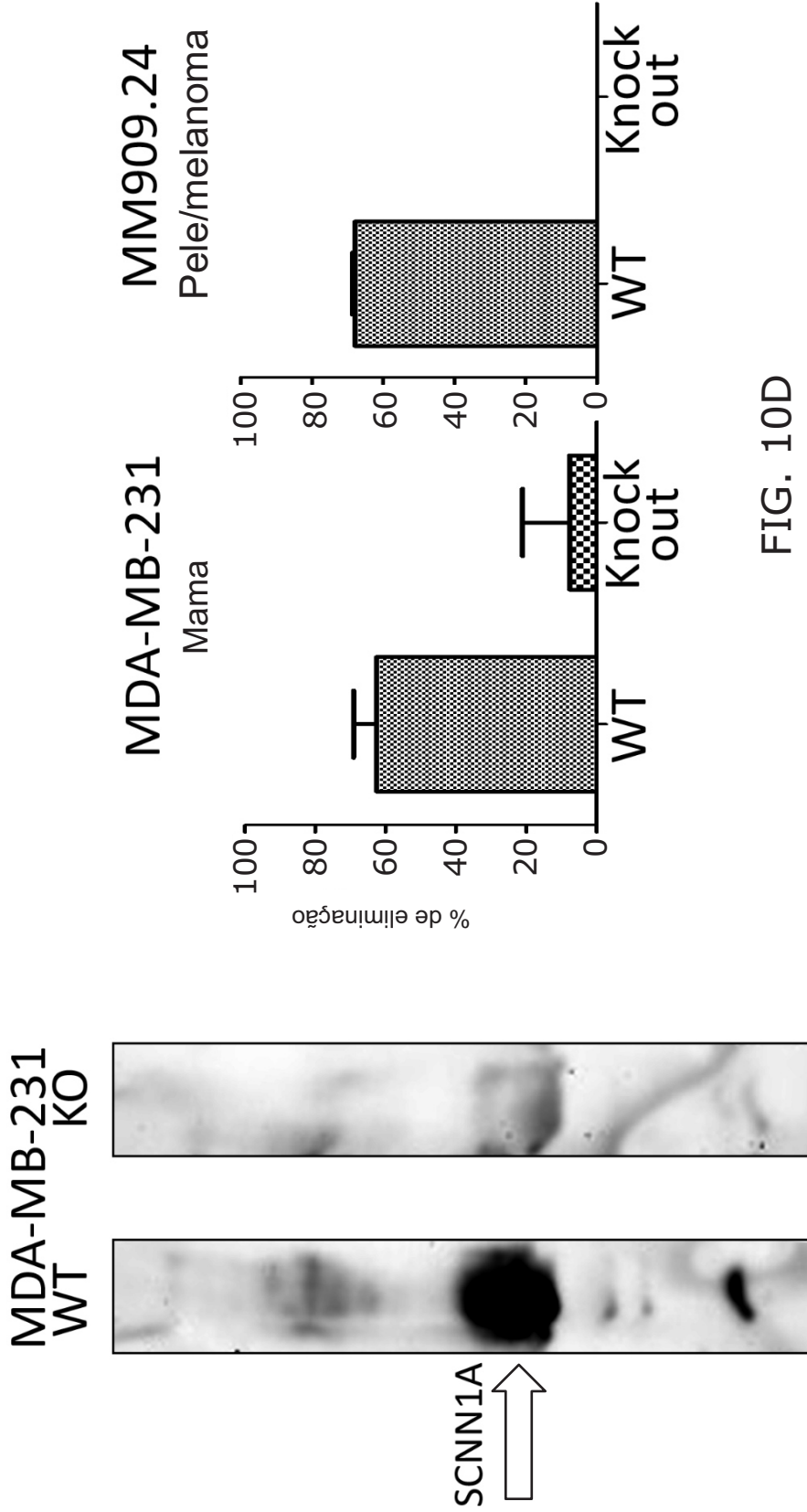


FIG. 10D

FIG. 10C

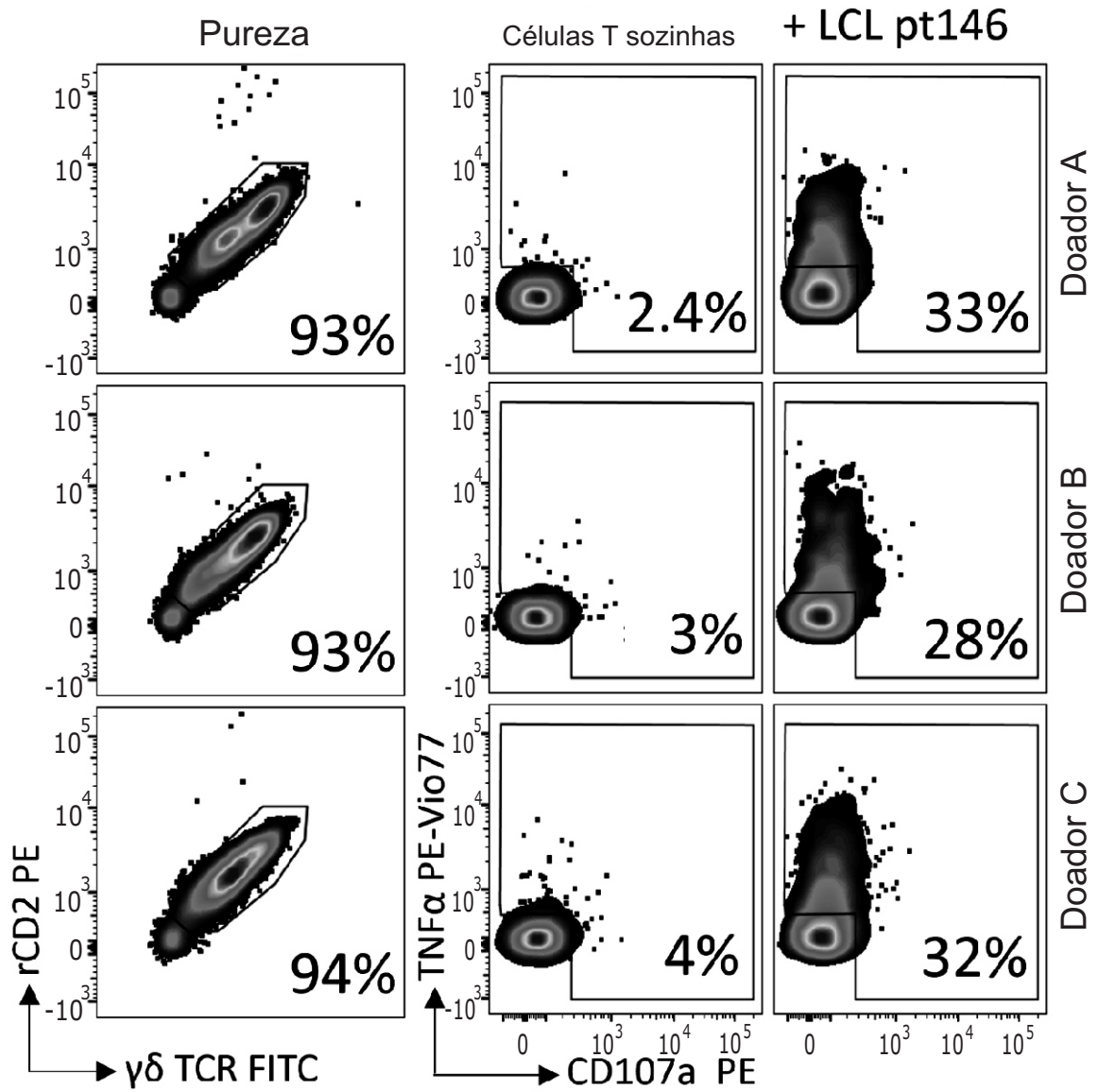


FIG. 11A

LCL.174 como alvos

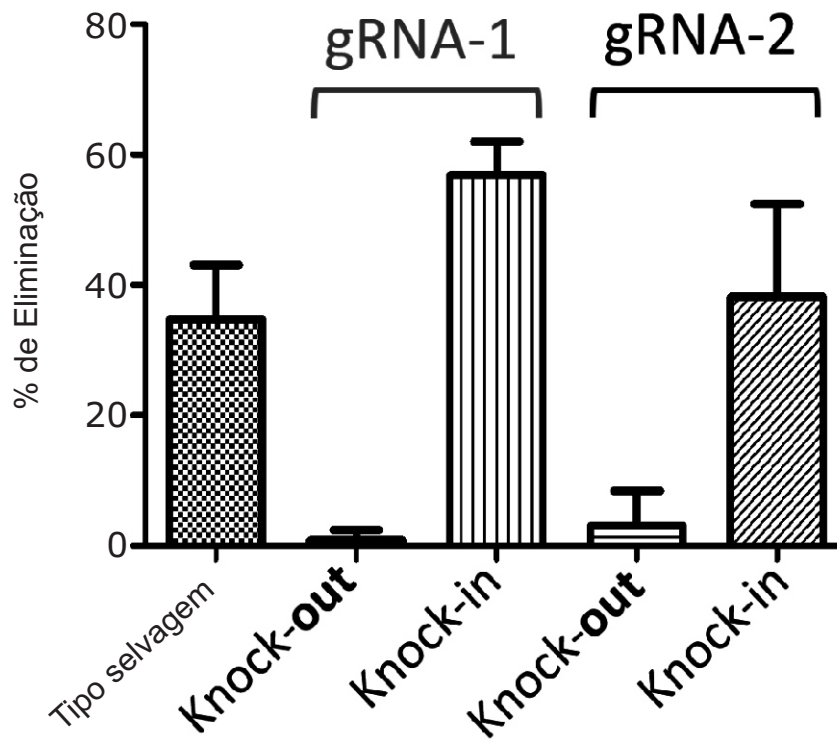


FIG. 11B

RESUMO

Patente de Invenção: **"RECEPTOR DE CÉLULAS T E LIGANTE"**.

A presente invenção refere-se a um receptor de células T (TCR), em particular a pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) desse receptor; uma célula T que expressa o TCR; um clone que expressa o TCR; um vetor que codifica o TCR; uma versão solúvel do TCR; uma composição farmacêutica ou agente imunogênico ou biespecífico ou vacina que compreendem o TCR, a célula, o clone ou o vetor; o TCR ou a célula ou o clone ou o vetor ou a composição farmacêutica ou agente imunogênico ou biespecífico ou vacina para uso no tratamento de câncer; um método de tratamento de câncer empregando o TCR, a célula, o clone, o vetor, a composição farmacêutica, agente imunogênico, biespecífico ou vacina que compreendem o TCR; e um ligante ao qual o TCR se liga.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA P246323.TXT
- Data de Geração do Código: 15/04/2020
- Hora de Geração do Código: 14:25:47
- Código de Controle:
 - Campo 1: 5427DBE94F118788
 - Campo 2: 2294E5F67CBCF16A