



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

(21) BR 112021010132-2 A2



(22) Data do Depósito: 02/12/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 24/08/2021

(54) Título: CÉLULAS CAR-T ALOGÊNICAS DERIVADAS DA PLACENTA E USOS DA MESMAS

(51) Int. Cl.: A61K 35/17; C07K 14/725; C12N 5/0783; C12N 15/63; C12N 5/073.

(30) Prioridade Unionista: 25/07/2019 US 62/878,736; 30/11/2018 US 62/774,142.

(71) Depositante(es): CELULARITY INC..

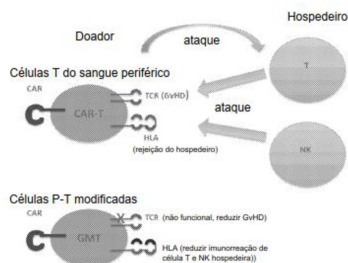
(72) Inventor(es): ROBERT J. HARIRI; KATHY KARASIEWICZ; TIANJIAN LI.

(86) Pedido PCT: PCT US2019064074 de 02/12/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/113234 de 04/06/2020

(85) Data da Fase Nacional: 25/05/2021

(57) Resumo: CÉLULAS CAR-T ALOGÊNICAS DERIVADAS DA PLACENTA E USOS DA MESMAS. A presente invenção divulga populações de células T que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR), em que as ditas células T são células T da placenta derivadas do sangue do cordão umbilical, perfusato da placenta ou uma mistura dos mesmos. Demonstrou-se que tais populações de células são melhoradas em inúmeros aspectos em relação a populações alternativas de células, tais como aquelas derivadas de células T de células mononucleares de sangue periférico. Também divulga métodos de tratar câncer, tal como um câncer hematológico, por exemplo, um câncer de células B, ou um sintoma do mesmo em um paciente com necessidade do mesmo. Estes métodos compreendem administrar ao paciente uma quantidade da população de células T de qualquer uma da invenção eficaz para aliviar o câncer ou sintoma do mesmo no paciente.



## **CÉLULAS CAR-T ALOGÊNICAS DERIVADAS DA PLACENTA E USOS DA MESMAS**

### **CAMPO**

[0001] A presente invenção se refere, em parte, às células do receptor de antígeno quimérico (CAR) e terapias de CAR.

### **FUNDAMENTOS**

[0002] As terapias CAR estão emergindo como uma ferramenta criticamente importante contra o câncer. No entanto, essas terapias normalmente dependem do uso das células do próprio paciente, por exemplo, células T derivadas de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), como a população de células efectoras. Como as células de cada paciente devem ser colhidas, testadas e transformadas em uma terapia CAR, a terapia CAR é: 1) muito cara; e 2) disponível apenas em alguns centros dispostos e / ou aptos a realizar a terapia. Essas deficiências resultam na terapia CAR sendo basicamente indisponível para muitas pessoas que necessitam da mesma. A presente invenção é direcionada, em parte, à criação de uma terapia CAR alogênica, sem receita médica direcionada a aliviar estes e outros problemas.

[0003] A terapia CAR-T autóloga tornou-se parte do padrão de cuidado para pacientes com câncer hematológico. A fonte de células da terapia CAR-T vem da PMBC do paciente. O desenvolvimento de terapia com células CAR-T alogênicas entrou em ensaios clínicos que também usam PBMC como material de origem. As células UCB-T têm diferentes propriedades biológicas, o que as torna mais adequadas para serem o material de origem da terapia celular alogênica. Elas têm um fenótipo T<sub>cm</sub> e T<sub>naïve</sub> predominante, exibem atividade proliferativa aumentada e retêm telômeros mais longos / atividade telomerase mais alta, em comparação com células T expandidas de PBMCs (Okas, *et. al. Journal of Immunotherapy*, 2010; Frumento, *et. al. Journal of Transplantation*, 2013). Elas têm maior tolerância imunológica à incompatibilidade HLA e ativação alogênica

prejudicada (Barker, *et. al. Blood*, 2001; Chen, *et al. Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2006). Elas podem ser expandidas em escala clínica para fins terapêuticos.

[0004] Células T e células NK são os mediadores celulares chaves da alorreatividade. O receptor de células T é o receptor chave envolvido na alorreatividade. A inativação do gene do receptor de células T levou à redução da alorreatividade. As células NK hospedeiras exterminam as células do doador com HLA incompatível ou não expressam moléculas HLA. Um mecanismo para evitar o extermínio das células NK é através da expressão da molécula HLA-E que inibe a função das células NK.

[0005] Desenvolvemos uma plataforma única para o uso de células T derivadas da placenta humana pós-parto para uso em uma plataforma alogênica para o tratamento de cânceres hematológicos e sólidos. Nos presentes estudos, demonstramos a prova de conceito com células T placentárias de terapia com células T tanto CD19 CAR-T quanto CD20 CAR-T para o tratamento de malignidade de células B. Apesar das células T derivadas da placenta (células P-T) demonstrarem maior tolerância imunológica e alo-respostas prejudicadas, imaginamos e demonstramos um nocaute da constante alfa do receptor de células T (TRAC) (KO), por exemplo, um nocaute da constante alfa do receptor de célula T mediado por CRISPR (TRAC) (KO), etapa como uma estratégia de mitigação de risco adicional para contornar qualquer GvHD potencial decorrente da expressão do receptor de células T endógenas em células P-T. Se necessário, essas células podem ser ainda geneticamente modificadas para NÃO expressar *B2M* e expressar uma molécula HLA-E quimérica para reduzir sua alorreatividade / depuração por células T / NK.

## **SUMÁRIO**

[0006] A presente invenção é direcionada ao uso de células derivadas da

placenta como uma fonte de células para terapia CAR. Estas células incluem células isoladas da placenta, do perfusato da placenta e do sangue do cordão umbilical e suas combinações. Nos presentes exemplos, as células do sangue do cordão umbilical e / ou do perfusato da placenta foram usadas e essas células derivadas da placenta mostraram ser vantajosas sobre as células T de outras fontes de células, como as de PBMCs.

[0007] Neste documento, os requerentes descobriram que as células derivadas da placenta têm um fenótipo mais naíve com menos células efectoras / de memória do que as de PBMCs, o que representa uma vantagem desta população. Além disso, os requerentes demonstraram uma expansão de até 3.600 vezes das células T derivadas da placenta. Com base nessas descobertas, um aspecto da invenção é o uso de células T derivadas da placenta, por exemplo, células T derivadas do sangue do cordão umbilical ou células T derivadas do sangue do cordão umbilical *ex vivo* expandidas como um tipo de célula para terapia CAR.

[0008] Os requerentes também desenvolveram métodos para fazer isso e mostraram que tais células podem ser transduzidas com alta eficiência com um CAR exemplificativo e exterminar prontamente as células que expressam o alvo, enquanto não exterminam as células sem o alvo. Este extermínio, ou a falta do mesmo, foi correlacionado com a expressão da expressão de citocinas efectoras induzida em resposta a células tumorais que expressam o alvo, mas não as sem o alvo.

[0009] Os requerentes também demonstraram que as células T derivadas da placenta são significativamente menos alorreativas do que as PBMCs. Assim, em algumas modalidades, a invenção em questão ensina o uso de células derivadas da placenta, por exemplo, células derivadas do sangue do cordão umbilical ou células derivadas do sangue do cordão umbilical expandidas para uso

em uma terapia CAR.

[0010] Um benefício adicional descoberto pelos requerentes é que o fenótipo naíve de células T derivadas da placenta permite a depleção de células Treg, o que poderia de outra forma reduzir a eficácia da terapia CAR. a Tal depleção não é possível/prática para PBMCs devido à expressão de CD25 em células T ativadas.

[0011] Em um esforço adicional para criar uma terapia CAR alogênica, os requerentes eliminaram uma parte do TCR, neste documento, o TRAC. Os requerentes desenvolveram métodos para realizar modificação genética de células T derivadas da placenta com alta eficiência usando CRISPR. Espera-se que o uso de uma modificação genética como essa aumente ainda mais as vantagens alogênicas das células T derivadas da placenta. Assim, em algumas modalidades, a invenção em questão ensina a modificação genética de células T para reduzir a alorreatividade, como o nocaute de um gene TCR, por exemplo, TRAC.

[0012] Embora CARs específicos tenham sido usados no pedido em questão, as vantagens de: 1) uso de células T derivadas da placenta; 2) nocaute de genes de célula T, por exemplo, genes TCR, como TRAC; e 3) espera-se que a combinação destes seja aplicável a qualquer CAR e melhore significativamente a terapia com CAR e forneça um tratamento alogênico com GVHD reduzido.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[0013] A FIG. 1 mostra estratégias para contornar a alorreatividade conduzida por T / NK.

[0014] A FIG. 2 mostra um esboço do processo de geração de células CAR-T alogênicas derivadas da placenta.

[0015] A FIG. 3 mostra o fenótipo de células T isoladas derivadas da placenta.

[0016] A FIG. 4 mostra a expansão *in vitro* de células T derivadas da placenta

em 20 dias.

[0017] A FIG. 5 mostra o fenótipo de células T derivadas da placenta expandidas *in vitro* em 20 dias, após a re-estimulação após o dia 13.

[0018] A FIG. 6 mostra a expansão *in vitro* de células T derivadas da placenta modificadas com CD19 CAR em 15 dias.

[0019] A FIG. 7 mostra o estado de diferenciação de células T das células P-T modificadas com CD19 CAR do dia 15.

[0020] A FIG. 8 mostra a expressão de CD57 em células T efetoras de memória (T em) e células T efetoras (T eff).

[0021] A FIG. 9 mostra uma análise de fenótipo de células P-T modificadas com CAR CD19 do dia 15.

[0022] A FIG. 10 mostra a expressão de CD19 CAR do dia 15 de vetores virais de CD19 CAR titulados em células P-T.

[0023] A FIG. 11 mostra o fenótipo do CAR P-CD19 do dia 15 reproduzido em múltiplas preparações de P-T de diferentes doadores de placenta.

[0024] A FIG. 12 mostra a expressão de CD19 CAR do dia 15 reproduzida em múltiplas preparações de P-T de diferentes doadores de placenta.

[0025] A FIG. 13 mostra a citotoxicidade das células T CD19 CAR-T do Dia 14 UCB vs. alvos CD19 + / CD19- (painéis superiores) e citotoxicidade das células CD20 CAR-T do Dia 14 UCB vs. alvos CD20 + / CD20- (painéis inferiores).

[0026] A FIG. 14 mostra a liberação de citocinas de células CAR-T CD19 de UCB do dia 14 vs. alvos CD19 + / CD19-.

[0027] A FIG. 15 mostra um ensaio de citotoxicidade de fluxo de 4 horas em que a atividade de P-CD19 CAR do dia 15 vs. alvos CD19 +/- é testada.

[0028] A FIG. 16 mostra um ensaio de cinética da citotoxicidade ACEA da atividade do CAR P-CD19 do dia 15 vs. CD19+/-alvos.

[0029] A FIG. 17 mostra os resultados de um ensaio de 24 horas de

liberação de citocinas: atividade P-CD19 CAR do Dia 15 vs. CD19+ Daudi.

[0030] A FIG. 18 mostra os resultados de um ensaio de 24 horas de liberação de citocinas: atividade P-CD19 CAR do Dia 15 vs. CD19+ Nalm6.

[0031] A FIG. 19 mostra a atividade P-CD19 CAR-T em um modelo de camundongo Daudi-Luc CD19+ disseminado.

[0032] A FIG. 20 mostra a atividade de P-CD19 CAR-T para novo desafio de células tumorais em modelo disseminado de Daudi-luc.

[0033] A FIG. 21 mostra a eficiência de nocaute de TRAC em células UCB-T.

[0034] A FIG. 22 mostra a eficiência de P-T TRAC KO do dia 15 usando CRISPR.

[0035] A FIG. 23 mostra os efeitos de TRAC KO na expressão P-T CD19 CAR.

[0036] A FIG. 24 mostra os efeitos de TRAC KO na atividade de P-CD19 CAR.

[0037] A FIG. 25 mostra a alorreatividade de células P-T medida por ensaio de citotoxicidade.

[0038] A FIG. 26 mostra a alorreatividade de células P-T medida por ensaio de proliferação.

[0039] A FIG. 27 mostra a frequência P-T Treg e a falta de alorreatividade em um modelo de camundongo NCG.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA**

[0040] A presente invenção fornece uma população de células T que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR), em que as ditas células T são células T da placenta. Em algumas modalidades, as ditas células T da placenta são células T de sangue do cordão umbilical, células T do perfusato da placenta ou uma mistura das mesmas. Em algumas modalidades, em que as ditas células T da placenta são células T do sangue do cordão umbilical. Em algumas modalidades, as ditas células T da placenta são uma mistura de células T do sangue do cordão umbilical e células T de perfusão da placenta.

[0041] Em outras modalidades, a população de células T do dito CAR foi introduzida na célula por transfecção. Em algumas modalidades, o dito CAR foi introduzido na célula por transdução viral. Em outras modalidades, o dito CAR foi introduzido na célula por transdução viral com um vetor retroviral. Ainda em outras modalidades, o dito CAR foi introduzido na célula por transdução viral com um vetor lentiviral.

[0042] Demonstrou-se que essas células diferem, por exemplo, de células derivadas de mononucleares do sangue periférico e, na verdade, são melhores em relação às ditas células em vários aspectos.

[0043] Em algumas modalidades, a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam CD45RA do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico. Em outras modalidades, a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam CD27 do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico. Em algumas modalidades, a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam CCR7 do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico. Em outras modalidades, a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam CD127 do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico. Em algumas modalidades, a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam CD57 do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico. Em algumas modalidades, a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam CD62L do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico. Em outras modalidades, a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam CD25 do que uma população de células T de células mononucleares do sangue

periférico. Em outras modalidades, a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam Lag-3+ do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico. Em outras modalidades, a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam Tim-3 do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico.

[0044] Em algumas modalidades, a dita população de células T exibe maior extermínio *in vitro* de uma linhagem de células cancerígenas do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico. Em outras modalidades, a dita população de células T expressa uma quantidade maior de perforina em um desafio *in vitro* contra uma linhagem de células cancerígenas do que uma população de células T mononucleares do sangue periférico. Em outras modalidades, a dita população de células T expressa uma quantidade maior de GM-CSF em um desafio *in vitro* contra uma linhagem de células cancerígenas do que uma população de células T de células mononucleares de sangue periférico. Em outras modalidades, a dita população de células T expressa uma quantidade maior de TNF- $\alpha$  em um desafio *in vitro* contra uma linhagem de células cancerígenas do que uma população de células T mononucleares do sangue periférico. Em outras modalidades, a dita população de células T expressa uma quantidade maior de IL-2 em um desafio *in vitro* contra uma linhagem de células cancerígenas do que uma população de células T de células mononucleares de sangue periférico. Em outras modalidades, a dita população de células T expressa uma quantidade maior de granzima B em um desafio *in vitro* contra uma linhagem de células cancerígenas do que uma população de células T mononucleares do sangue periférico.

[0045] Em algumas modalidades, a dita população de células T produz maior sobrevivência em um modelo de câncer *in vivo* do que uma população de

células T de células mononucleares do sangue periférico. Em outras modalidades, a dita população de células T produz menor perda de peso corporal em um modelo de câncer *in vivo* do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico. Em outras modalidades, a dita população de células T produz menos doença do enxerto contra hospedeiro (GvHD) em um modelo de câncer *in vivo* do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico.

[0046] Em outras modalidades, a dita população de células T de células mononucleares do sangue periférico também expressa um dito CAR. Em outras modalidades, o dito CAR foi introduzido na dita população de células T de células mononucleares do sangue periférico por transfecção. Em outras modalidades, o dito CAR foi introduzido na dita população de células T de células mononucleares do sangue periférico por transdução viral. Em outras modalidades, o dito CAR foi introduzido na dita população de células T de células mononucleares do sangue periférico por transdução viral com um vetor retroviral. Em outras modalidades, o dito CAR foi introduzido na dita população de células T de células mononucleares do sangue periférico por transdução viral com um vetor lentiviral. Em outras modalidades, o dito CAR que foi introduzido na dita população de células T de células mononucleares do sangue periférico é o mesmo CAR expresso pela dita população de células T.

[0047] Em algumas modalidades, a dita população de células T compreende uma alteração genética adicional para reduzir a imunogenicidade contra um hospedeiro. Em outras modalidades, a dita alteração genética é um nocaute do gene. Em outras modalidades, o dito nocaute do gene é um nocaute do receptor de células T (TCR). Em outras modalidades, o dito nocaute do gene é um nocaute constante alfa do receptor de células T (TRAC). Em outras modalidades, a dita alteração genética adicional é efetuada por transfecção, transdução retroviral

ou transdução lentiviral. Em outras modalidades, a dita alteração genética adicional é efetuada pelo uso de tecnologia CRISPR, talen ou dedo de zn.

[0048] A invenção também fornece um método para tratar câncer ou um sintoma do mesmo em um paciente em necessidade, o método compreendendo a etapa de administrar ao paciente uma quantidade da população de células T de qualquer uma da invenção eficaz para aliviar o câncer ou sintoma do mesmo no paciente. Em algumas modalidades, o dito câncer é um câncer hematológico. Em outras modalidades, o dito câncer hematológico é um câncer de células B. Em outras modalidades, a população de células T é alogênica ao dito paciente.

[0049] Como usado neste documento, "perfusato placentário" significa solução de perfusão que foi passada através de pelo menos parte de uma placenta, *por exemplo*, uma placenta humana, *por exemplo*, através da vasculatura placentária e inclui uma pluralidade de células coletadas pela solução de perfusão durante a passagem através a placenta.

[0050] Como usado neste documento, "células de perfusato da placenta" significa células nucleadas, *por exemplo*, células nucleadas totais isoladas, ou isoláveis, de perfusato da placenta.

[0051] Como usado neste documento, "supressão de células tumorais", "supressão de proliferação de células tumorais" e semelhantes, incluem atrasar o crescimento de uma população de células tumorais, *por exemplo*, exterminando uma ou mais das células tumorais na dita população de células tumorais, *por exemplo*, por contato ou colocando, *por exemplo*, células T ou uma população de células T produzida usando um método de três estágios descrito neste documento em proximidade com a população de células tumorais, *por exemplo*, colocando em contato a população de células tumorais com células T ou uma população de células T produzida usando um método de três estágios descrito neste documento. Em certas modalidades, o dito contato ocorre *in vitro*

ou *ex vivo*. Em outras modalidades, o dito contato ocorre *in vivo*.

[0052] Como usado neste documento, a expressão "células hematopoiéticas" inclui células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras hematopoiéticas.

[0053] Como usado neste documento, "+", quando usado para indicar a presença de um marcador celular específico, significa que o marcador celular está detectavelmente presente na seleção de células ativadas por fluorescência sobre um controle de isotipo; ou é detectável acima do fundo em RT-PCR quantitativo ou semiquantitativo.

[0054] Como usado neste documento, "-", quando usado para indicar a presença de um marcador celular específico, significa que o marcador celular não está detectavelmente presente na seleção de células ativadas por fluorescência em um controle de isotipo; ou não é detectável acima do fundo em RT-PCR quantitativo ou semiquantitativo.

[0055] Como usado neste documento, "Receptor de antígeno quimérico" ou, alternativamente, um "CAR" refere-se a um conjunto de polipeptídeos, tipicamente dois nas modalidades mais simples, que quando em uma célula efetora imune, fornece à célula especificidade para uma célula alvo, tipicamente uma célula cancerígena e com geração de sinal intracelular. Em algumas modalidades, um CAR compreende pelo menos um domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização citoplasmática (também referido aqui como "um domínio de sinalização intracelular") compreendendo um domínio de sinalização funcional derivado de uma molécula estimulatória e/ou molécula coestimulatória conforme definido abaixo. Em alguns aspectos, o conjunto de polipeptídeos é contíguo entre si. Em algumas modalidades, o conjunto de polipeptídeos inclui um interruptor de dimerização que, mediante a presença de uma molécula de dimerização, pode

acoplar os polipeptídeos uns aos outros, por exemplo, pode acoplar um domínio de ligação ao antígeno a um domínio de sinalização intracelular. Em um aspecto, a molécula estimulatória é a cadeia zeta associada ao complexo do receptor de células T. Em um aspecto, o domínio de sinalização citoplasmática compreende ainda um ou mais domínios de sinalização funcionais derivados de pelo menos uma molécula coestimulatória. Em um aspecto, o CAR compreende uma proteína de fusão quimérica compreendendo um domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular compreendendo um domínio de sinalização funcional derivado de uma molécula estimulatória. Em um aspecto, o CAR compreende uma proteína de fusão quimérica compreendendo um domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular compreendendo um domínio de sinalização funcional derivado de uma molécula coestimulatória e um domínio de sinalização funcional derivado de uma molécula estimulatória. Em um aspecto, o CAR compreende uma proteína de fusão quimérica compreendendo um domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular compreendendo dois domínios de sinalização funcionais derivados de uma ou mais moléculas coestimulatórias e um domínio de sinalização funcional derivado de uma molécula estimulatória. Em um aspecto, o CAR compreende uma proteína de fusão quimérica compreendendo um domínio de ligação ao antígeno extracelular, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular compreendendo pelo menos dois domínios de sinalização funcional derivados de uma ou mais molécula(s) coestimulatória(s) e um domínio de sinalização funcional derivado de uma molécula estimulatória. Em um aspecto, o CAR compreende uma sequência líder opcional no amino-terminal (N-ter) da proteína de fusão do CAR. Em um aspecto, o CAR

compreende ainda uma sequência líder no N-terminal do domínio de ligação ao antígeno extracelular, em que a sequência líder é opcionalmente clivada do domínio de ligação ao antígeno (por exemplo, um scFv) durante o processamento celular e localização do CAR na membrana celular.

[0056] Um CAR que compreende um domínio de ligação ao antígeno (por exemplo, um scFv ou TCR) que tem como alvo um marcador de tumor específico X, tal como os descritos neste documento, também é referido como XCAR. Por exemplo, um CAR que compreende um domínio de ligação ao antígeno que alveja o CD 19 é referido como CD19CAR.

[0057] Como usado neste documento, "domínio de sinalização" refere-se à porção funcional de uma proteína que atua transmitindo informações dentro da célula para regular a atividade celular por meio de vias de sinalização definidas, gerando segundos mensageiros ou funcionando como efetores respondendo a tais mensageiros.

[0058] Como usado neste documento, "anticorpo", como usado neste documento, refere-se a uma proteína ou sequência de polipeptídeo derivada de uma molécula de imunoglobulina que se liga especificamente a um antígeno. Os anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais, de cadeia única ou múltiplas, ou imunoglobulinas intactas e podem ser derivados de fontes naturais ou de fontes recombinantes. Os anticorpos podem ser tetrâmeros de moléculas de imunoglobulina.

[0059] Como usado neste documento, "fragmento de anticorpo" refere-se a pelo menos uma porção de um anticorpo, que retém a capacidade de interagir especificamente (por exemplo, por ligação, impedimento estérico, estabilização / desestabilização, distribuição espacial) com um epítipo de um antígeno. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas não estão limitados a, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv, fragmentos de anticorpo scFv, Fvs ligados por

dissulfeto (sdFv), um fragmento Fd que consiste nos domínios VH e CHI, anticorpos lineares, anticorpos de domínio único, como sdAb (ou VL ou VH), domínios VHH de camelídeos, anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos, tal como um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ligação dissulfeto na região de dobradiça, e um CDR isolado ou outros fragmentos de ligação ao epítopo de um anticorpo. Um fragmento de ligação ao antígeno também pode ser incorporado em anticorpos de domínio único, maxicorpos, minicorpos, nanocorpos, intracorpos, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, v-NAR e bis-scFv (ver, por exemplo, Hollinger e Hudson, *Nature Biotechnology* 23: 1126-1136, 2005). Os fragmentos de ligação ao antígeno também podem ser enxertados em estruturas baseadas em polipeptídeos, tal como uma fibronectina tipo III (Fn3) (ver Patente US Nº: 6.703.199, que descreve minicorpos de polipeptídeo de fibronectina).

[0060] Como usado neste documento, "scFv" refere-se a uma proteína de fusão compreendendo pelo menos um fragmento de anticorpo compreendendo uma região variável de uma cadeia leve e pelo menos um fragmento de anticorpo compreendendo uma região variável de uma cadeia pesada, em que as regiões variáveis de cadeia leve e pesada são ligadas de forma contígua, por exemplo, por meio de um ligante sintético, por exemplo, um ligante polipeptídico flexível curto e capaz de ser expresso como um polipeptídeo de cadeia única, e em que o scFv retém a especificidade do anticorpo intacto do qual é derivado. A menos que especificado, como usado neste documento, um scFv pode ter as regiões variáveis VL e VH em qualquer ordem, por exemplo, em relação às extremidades N-terminal e C-terminal do polipeptídeo, o scFv pode compreender VL-ligante-VH ou pode compreender VH-ligante-VL.

[0061] A porção do CAR da invenção compreendendo um anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo pode existir em uma variedade de formas

onde o domínio de ligação ao antígeno é expresso como parte de uma cadeia de polipeptídeo contígua incluindo, por exemplo, um fragmento de anticorpo de domínio único (sdAb), um anticorpo de cadeia única (scFv), um anticorpo humanizado ou anticorpo biespecífico (Harlow *et al.*, 1999, *In: Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow *et al.*, 1989, *In: Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York; Houston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird *et al.*, 1988, *Science* 242:423-426). Em um aspecto, o domínio de ligação ao antígeno de uma composição de CAR da invenção compreende um fragmento de anticorpo. Em um aspecto adicional, o CAR compreende um fragmento de anticorpo que compreende um scFv. Os limites precisos da sequência de aminoácidos de um dado CDR podem ser determinados usando qualquer um dentre uma série de esquemas bem conhecidos, incluindo aqueles descritos por Kabat *et al.* (1991), "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*," 5° ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeração "Kabat"), Al-Lazikani *et al.*, (1997) *JMB* 273,927-948 (esquema de numeração "Chothia"), ou uma combinação dos mesmos.

[0062] Como usado neste documento, "domínio de ligação" ou "molécula de anticorpo" refere-se a uma proteína, por exemplo, uma cadeia de imunoglobulina ou fragmento desta, compreendendo pelo menos uma sequência de domínio variável de imunoglobulina. O termo "domínio de ligação" ou "molécula de anticorpo" abrange anticorpos e fragmentos de anticorpos. Em uma modalidade, uma molécula de anticorpo é uma molécula de anticorpo multiespecífica, por exemplo, ela compreende uma pluralidade de sequências de domínio variável de imunoglobulina, em que uma primeira sequência de domínio variável de imunoglobulina da pluralidade tem especificidade de ligação para um primeiro epítipo e uma segunda sequência de domínio variável de

imunoglobulina da pluralidade tem especificidade de ligação para um segundo epítopo. Em uma modalidade, uma molécula de anticorpo multiespecífico é uma molécula de anticorpo biespecífico. Um anticorpo biespecífico tem especificidade para não mais do que dois antígenos. Uma molécula de anticorpo biespecífico é caracterizada por uma primeira sequência de domínio variável de imunoglobulina que tem especificidade de ligação para um primeiro epítopo e uma segunda sequência de domínio variável de imunoglobulina que tem especificidade de ligação para um segundo epítopo.

[0063] Como usado neste documento, "cadeia pesada do anticorpo" refere-se ao maior dos dois tipos de cadeias de polipeptídeo presentes nas moléculas de anticorpo nas suas conformações de ocorrência natural e que normalmente determina a classe à qual o anticorpo pertence.

[0064] Como usado neste documento, "cadeia leve de anticorpo" refere-se ao menor dos dois tipos de cadeias de polipeptídeo presentes nas moléculas de anticorpo nas suas conformações de ocorrência natural. As cadeias leves *kappa* ( $\kappa$ ) e *lambda* ( $\lambda$ ) referem-se aos dois principais isotipos de cadeia leve do anticorpo.

[0065] Como usado neste documento, "anticorpo recombinante" refere-se a um anticorpo que é gerado usando tecnologia de DNA recombinante, tal como, por exemplo, um anticorpo expresso por um bacteriófago ou sistema de expressão de levedura. A expressão também deve ser interpretada como significando um anticorpo que foi gerado pela síntese de uma molécula de DNA que codifica o anticorpo e cuja molécula de DNA expressa uma proteína de anticorpo, ou uma sequência de aminoácido especificando o anticorpo, em que o DNA ou a sequência de aminoácido foi obtida usando DNA recombinante ou tecnologia de sequência de aminoácido que é disponível e é bem conhecida na técnica.

[0066] Como usado neste documento, "antígeno" ou "Ag" refere-se a uma molécula que provoca uma resposta imune. Essa resposta imune pode envolver tanto a produção de anticorpo quanto a ativação de células imunologicamente competentes específicas, ou ambas. O versado na técnica entenderá que qualquer macromolécula, incluindo virtualmente todas as proteínas ou peptídeos, podem servir como um antígeno. Além disso, antígenos podem ser derivados de DNA recombinante ou genômico. Um versado na técnica entenderá que qualquer DNA, que compreende uma sequência de nucleotídeos ou uma sequência de nucleotídeos parcial que codifica uma proteína que induz uma resposta imune, portanto, codifica um "antígeno" como esse termo é usado neste documento. Além disso, um versado na técnica entenderá que um antígeno não precisa ser codificado apenas por uma sequência de nucleotídeo de comprimento total de um gene. É facilmente evidente que a presente invenção inclui, mas não está limitada, ao uso de sequências de nucleotídeos parciais de mais de um gene e que essas sequências de nucleotídeos são arranjadas em várias combinações para codificar polipeptídeos que elicitam a resposta imune desejada. Além disso, um versado na técnica entenderá que um antígeno não precisa ser codificado por um "gene" de forma alguma. É facilmente evidente que um antígeno pode ser gerado, sintetizado ou pode ser derivado de uma amostra biológica, ou pode ser uma macromolécula além de um polipeptídeo. Uma amostra biológica como essa pode incluir, mas não está limitada a uma amostra de tecido, uma amostra de tumor, uma célula ou um fluido com outros componentes biológicos.

[0067] Como usado neste documento, "domínio de sinalização intracelular" refere-se a uma porção intracelular de uma molécula. O domínio de sinalização intracelular gera um sinal que promove uma função efetora imune da célula contendo CAR, por exemplo, uma célula CART. Exemplos de função efetora

imune, por exemplo, em uma célula CART, incluem atividade citolítica e atividade auxiliar, incluindo a secreção de citocinas.

[0068] Em uma modalidade, o domínio de sinalização intracelular pode compreender um domínio de sinalização intracelular primário. Domínios de sinalização intracelular primários exemplares incluem aqueles derivados das moléculas responsáveis pela estimulação primária ou simulação dependente de antígeno. Em uma modalidade, o domínio de sinalização intracelular pode compreender um domínio intracelular coestimulatório. Domínios de sinalização intracelular coestimulatórios exemplares incluem aqueles derivados de moléculas responsáveis por sinais coestimulatórios ou estimulação independente de antígeno. Por exemplo, no caso de um CART, um domínio de sinalização intracelular primário pode compreender uma sequência citoplasmática de um receptor de células T e um domínio de sinalização intracelular coestimulatório pode compreender uma sequência citoplasmática de co-receptor ou molécula coestimulatória.

[0069] Um domínio de sinalização intracelular primário pode compreender uma sequência de sinalização que é conhecida como sequência de imunoreceptor baseada em tirosina ou ITAM. Exemplos de ITAM contendo sequências de sinalização citoplasmática primárias incluem, mas não estão limitados a, aqueles derivados de CD3 zeta, FcR gama comum (FCER1G), Fc gama RIIa, FcR beta (Fc Epsilon Rib), CD3 gama, CD3 delta, CD3 epsilon, CD79a, CD79b, DAP10 e DAP12.

[0070] Como usado neste documento, "zeta" ou alternativamente "cadeia zeta", "CD3-zeta" ou "TCR-zeta" é definido como a proteína fornecida como GenBan Acc. No. BAG36664.1, ou os resíduos equivalentes de uma espécie não humana, por exemplo, camundongo, roedor, macaco, macaco de grande porte e semelhantes, e um "domínio estimulatório zeta" ou, alternativamente, um

"domínio estimulatório CD3-zeta" ou um "TCR- domínio estimulatório zeta" é definido como os resíduos de aminoácidos do domínio citoplasmático da cadeia zeta, ou seus derivados funcionais, que são suficientes para transmitir funcionalmente um sinal inicial necessário para a ativação de células T. Em um aspecto, o domínio citoplasmático de zeta compreende os resíduos 52 a 164 do GenBank Acc. No. BAG36664.1 ou os resíduos equivalentes de uma espécie não humana, por exemplo, camundongo, roedor, macaco, macaco de grande porte e semelhantes, que são ortólogos funcionais dos mesmos. Em um aspecto, o "domínio estimulatório zeta" ou um "domínio estimulatório CD3-zeta" é a sequência fornecida como SEQ ID NO: 18. Em um aspecto, o "domínio estimulatório zeta" ou um "domínio estimulatório CD3-zeta" é a sequência fornecida como SEQ ID NO: 20.

[0071] Como usada neste documento, "molécula coestimulatória" refere-se a um parceiro de ligação cognato em uma célula T que se liga especificamente a um ligante coestimulatório, por meio disso mediando uma resposta coestimulatória pela célula T, tal como, mas não se limitando a, proliferação. As moléculas coestimulatórias são moléculas da superfície celular que não os receptores de antígenos ou seus ligantes que contribuem para uma resposta imune eficiente. As moléculas coestimulatórias incluem, mas não estão limitadas a uma molécula MHC de classe I, BTLA e um receptor de ligante Toll, bem como OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a / CD18), ICOS (CD278) e 4-1BB (CD137). Outros exemplos de tais moléculas coestimulatórias incluem CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRK1), NKp44, NKp30, NKp46, CD 160, CD 19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gama, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE / RANKL, DNAM1

(CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tátil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a e um ligante que se liga especificamente ao CD83.

[0072] Um domínio de sinalização intracelular coestimulatório pode ser a porção intracelular de uma molécula coestimulatória. Uma molécula coestimulatória pode ser representada nas seguintes famílias de proteínas: proteínas receptoras de TNF, proteínas tipo imunoglobulina, receptores de citocina, integrinas, moléculas de ativação linfocítica de sinalização (proteínas SLAM) e receptores de células NK ativadores. Exemplos de tais moléculas incluem CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, ICAM-1, antígeno-1 associado à função linfocitária (LFA-1), CD2, CDS, CD7, CD287, LIGHT, NKG2C, NKG2D, SLAMF7, NKp80, NKp30, NKp44, NKp46, CD160, B7-H3 e um ligante que se liga especificamente a CD83 e semelhantes.

[0073] O domínio de sinalização intracelular pode compreender toda a porção intracelular, ou todo o domínio de sinalização intracelular nativo, da molécula da qual é derivado, ou um fragmento funcional ou derivado da mesma.

[0074] Como usado neste documento, "4-1BB" refere-se a um membro da superfamília TNFR com uma sequência de aminoácidos fornecida como GenBank Acc. No. AAA62478.2, ou os resíduos equivalentes de uma espécie não humana, por exemplo, camundongo, roedor, macaco, macaco de grande porte e semelhantes; e um "domínio coestimulatório 4-1BB" é definido como resíduos de aminoácidos 214-255 de GenBank Acc. No. AAA62478.2, ou os resíduos equivalentes de uma espécie não humana, por exemplo, camundongo, roedor, macaco, macaco de grande porte e semelhantes. Em um aspecto, o "domínio coestimulatório 4-1BB" é a sequência fornecida como SEQ ID NO: 14 ou os

resíduos equivalentes de uma espécie não humana, por exemplo, camundongo, roedor, macaco, macaco de grande porte e semelhantes.

[0075] Como usada neste documento, "Célula imune efetora" refere-se a uma célula que está envolvida em uma resposta imune, por exemplo, na promoção de uma resposta imune efetora. Exemplos de células efetoras imunes incluem células T, por exemplo, células T alfa / beta e células T gama / delta, células B, células exterminadoras naturais (NK), células T exterminadoras naturais (NKT), mastócitos e fagócitos derivados mielóides.

[0076] Como usada neste documento, "Função imune efetora ou resposta imune efetora," refere-se à função ou resposta, por exemplo, de uma célula imune efetora, que aumenta ou promove um ataque imune de uma célula alvo. Por exemplo, uma função ou resposta imune efetora refere-se a uma propriedade de uma célula T ou NK que promove o extermínio ou a inibição do crescimento ou proliferação de uma célula alvo. No caso de uma célula T, a estimulação primária e a coestimulação são exemplos de função ou resposta imune efetora.

[0077] Como usado neste documento, "efeito anticâncer" refere-se a um efeito biológico que pode ser manifestado por vários meios, incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, uma diminuição no volume do tumor, uma diminuição no número de células cancerígenas, uma diminuição no número de metástases, um aumento na expectativa de vida, diminuição na proliferação de células cancerígenas, diminuição na sobrevivência das células cancerígenas ou melhora de vários sintomas fisiológicos associados à condição cancerígena. Um "efeito anticâncer" também pode ser manifestado pela capacidade dos peptídeos, polinucleotídeos, células e anticorpos na prevenção da ocorrência de câncer em primeiro lugar. A expressão "efeito antitumoral" refere-se a um efeito biológico que pode ser manifestado por vários meios, incluindo, mas não se

limitando a, por exemplo, uma diminuição no volume do tumor, uma diminuição no número de células tumorais, uma diminuição na proliferação de células tumorais, ou uma diminuição na sobrevivência das células tumorais.

[0078] Como usado neste documento, "autólogo" refere-se a qualquer material derivado do mesmo indivíduo a quem será posteriormente reintroduzido no indivíduo.

[0079] Como usado neste documento, "alogênico" refere-se a qualquer material derivado de um animal diferente da mesma espécie que o indivíduo a quem o material é introduzido. Dois ou mais indivíduos são considerados alogênicos um ao outro quando os genes em um ou mais loci não são idênticos. Em alguns aspectos, o material alogênico de indivíduos da mesma espécie pode ser suficientemente diferente geneticamente para interagir antigenicamente.

[0080] Os métodos de adição / modificação de genes são bem conhecidos na técnica e são aplicáveis à presente invenção. Por exemplo, os métodos de administração de CAR ou nocaute de gene podem ser realizados por métodos de transfecção estáveis ou transitórios ou por transdução lentiviral ou retroviral. A modificação do gene pode ser realizada com esses ou outros métodos pelo uso de, por exemplo, CRISPR, talen ou outras tecnologias semelhantes.

### **EXEMPLOS**

#### **Exemplo 1: Material de Partida, Separação de MNC e Isolamento de Células**

I

[0081] O material de partida Sangue da Placenta (que inclui sangue do cordão umbilical humano (UCB) e/ou perfusato de placenta humana (HPP)) é coletado com consentimento informado através de LifebankUSA. Após a coleta, os materiais de partida são enriquecidos para células mononucleares (MNC) usando sedimentação Hetastarch RBC ou separação de células por gradiente de densidade Ficoll-Paque. MNC então passa por um processo de seleção positiva

para depletar as células T regulatórias CD25+ (Tregs), seguido pela seleção positiva para células T CD4+ e CD8+ usando kits de separação de célula de esferas Miltenyi. Alíquotas de células T isoladas são retiradas para sorologia e teste de esterilidade, bem como análise de fenótipo, antes das células serem congeladas.

[0082] O fenótipo das células P-T isoladas é distinto das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). As células P-T contêm >78% de células T CD3+ CD56-T e consistem principalmente em células T CD3+ CD45RA+ CCR7+ CD27+ naïve com baixas frequências de células T de memória central CD3+ CD45RA- CCR7+ CD27+ e células T de memória efetora CD3+ CD45RA- CCR7- CD27+. A depleção de CD25 reduziu significativamente a frequência de Tregs CD3+ CD4+ CD25+ CD127- dentro das células P-T para menos de 0,5%.

[0083] Material de partida adicional para incluir, mas ainda não testado, células-tronco hematopoiéticas CD34 / células T da placenta derivadas de progenitor. O processo de expansão e diferenciação de progenitores em células T pode levar de 50 a 60 dias. É importante notar que as populações mostradas abaixo com os protocolos atuais têm populações significativas de células CD4+ / CD8+ presentes, no entanto, células T positivas únicas totalmente diferenciadas podem ser prontamente selecionadas / enriquecidas.

[0084] A avaliação das células T derivadas do perfusato de placenta foi concluída, mas o procedimento de isolamento precisa ser otimizado, pois o procedimento atual produz baixos números de células, viabilidade e pureza de células T.

#### Exemplo 2: Ativação e Expansão de Célula T

Células P-T não modificadas:

[0085] As células P-T isoladas são descongeladas, sofrem depleção de CD25 usando esferas Miltenyi ant-CD25 para a remoção de CD4+ CD25+ CD127- Tregs (podem ser incluídas antes da etapa de isolamento de célula T) e são ativadas

usando Dynabeads anti-CD3 / anti-CD28 (Razão Esfera: Célula 1:1) da Invitrogen ou usando nanopartícula anti-CD3 / anti-CD28 Transact (diluição volumétrica 1:100) de Miltenyi. As células são então expandidas usando 100 IU / mL IL-2, 10 ng / mL IL-7 + 10 ng / mL IL-15 ou 100 IU / mL IL-2 + 10 ng / mL IL-7. Re-estimulações adicionais são concluídas nos dias 12-14 e as células são expandidas até o dia 21 em vasos Grex para maximizar o número de vezes de expansão.

[0086] As células P-T não modificadas podem ser expandidas em até 600 vezes com estimulação inicial e até 3.600 vezes com re-estimulação (RS) no Dia 14 quando cultivadas até o Dia 20.

[0087] Sob várias condições de cultura, o P-T expandido de 20 dias não modificado exibiu um fenótipo de diferenciação inicial em comparação com o pós-descongelamento (PT), PBMCs não cultivadas e consistiu principalmente em células T naïve CD3+ CD45RA+ CD62L+ e células T de memória central CD3+ CD45RA- CD62+, enquanto as PBMCs pós-descongelamento não cultivadas consistiram principalmente em células T efetoras de memória e terminais CD3+ CD45RA - / + CD62L- mais diferenciadas. Dado o estado de diferenciação inicial das células P-T, rodadas adicionais de estimulação devem ser viáveis e aumento significativamente o número de vezes de expansão para suportar a fabricação "sem receita médica" de CAR-T alogênico derivado da placenta, enquanto mantém uma mistura balanceada de células T de memória central que irá persistir no paciente e células T efetoras que irão imediatamente atingir e exterminar as células tumorais.

Células P-T modificadas com CAR:

[0088] Células T isoladas (que sofreram depleção de CD25 antes do congelamento) foram descongeladas e ativadas usando nanopartículas Transact de anti-CD3 / anti-CD28 (diluição volumétrica 1:100) de Miltenyi. As células

foram então expandidas em vasos Grex usando 100 IU / mL de IL-2. No Dia 3, as células foram transduzidas com lentivírus CD19 CAR (LV) ou retrovírus (RV) em placas revestidas com retronectina, usando o método de pré-rotação viral. As células foram então cultivadas até o Dia 15, com alimentação de meios ocorrendo a cada 2-3 dias.

[0089] As células P-T modificadas com CD19 CAR podem ser expandidas 237-336 vezes após 15 dias em cultura, sem re-estimulação.

[0090] Após quinze dias de cultura, as células P-T modificadas com CD19 CAR exibiram um fenótipo de diferenciação de células T distinto em comparação com células T derivadas de CD19 CAR PBMC. As células P-T consistiam em uma mistura precisa de células T CD3+ CD45RA + CCR7 + naíve / células T de memória de células-tronco e células T efetoras CD3+ CD45RA + CCR7-, enquanto as células T CD19 CAR derivadas de PBMC consistiram principalmente em células T de memória efetoras CD3+ CD45RA- CCR7- e células T efetoras CD3+ CD45RA+ CCR7. As células P-T NT (não transduzidas) e P-T CD19 CAR RV consistiram em mais células T naíve / T scm do que células P-T CD19 CAR LV.

[0091] Além disso, células T de memória efetoras derivadas de PBMC (T em) e células T efetoras (T ef) expressaram níveis significativamente maiores do marcador de exaustão CD57, enquanto a expressão de células P-T foi baixa.

[0092] A maior frequência e mistura de células T efetoras e células T de células-tronco / naíve de memória dentro das células P-T, junto com a baixa expressão de CD57, representa um produto CAR-T que pode atingir e exterminar de forma eficiente as células tumorais, enquanto mantém a capacidade de auto-renovar e reabastecer seus subconjuntos de células T mais diferenciados ao longo do tempo.

[0093] No geral, as células T do Dia 15 P-T NT e P-CD19 CAR expressaram altos níveis de CD45RA, CD27, CCR7, CD127 e CD28, e expressaram baixos níveis

do marcador de exaustão CD57 e marcadores de ponto de controle imunológico (reguladores negativos das respostas imunes) PD -1, Lag-3 e Tim-3.

[0094] A eficiência de transdução do CD19 CAR foi medida incubando as células com um reagente CD19 Fc-Fitc e quantificando a porcentagem de células CD19 CAR+ usando citometria de fluxo. No dia 15, as células P-T expressaram CD19 CAR quando transduzidas com todos os Ms scFv LV ou RV (de Vector Builder, SignaGen ou Sorrento) e expressaram CD19 CAR quando transduzidas com sequências Hu scFv JK2 e JL, todas consistindo no domínio coestimulatório 4-1BB. As células P-T não expressaram CD19 CAR quando transduzidas com a sequência Hu scFv JK1, contendo o domínio coestimulatório de CD28. MOI/concentrações ideais para cada CAR CD19 foram determinadas para ser: MOI 50 para Ms scFv CD19 CAR LV de Vector Builder, MOI 100 para SignaGen Ms scFv CD19 CAR LV, MOI 200 para SignaGen Hu scFv CD19 CAR LV e 2,5X para Ms scFv CD19 CAR RV de Sorrento (titulador calculado desconhecido).

[0095] As células T CAR P-CD19 do dia 15 exibiram alta viabilidade e pureza de células T CD3+ CD56-, independentemente do vetor viral usado para a transdução. As células P-T transduzidas com Vector Builder Ms scFv CD19 CAR LV resultaram em células T CD4+ significativamente maiores, em comparação com a mesma sequência Ms scFv CD19 CAR LV produzida pela SignaGen. As células P-T transduzidas com Ms scFv CD19 CAR da Sorrento resultaram na maior frequência de células T CD8+ e uma mistura equilibrada de células T CD4+ e CD8+.

[0096] Usando MOIs/concentrações otimizadas para cada tipo de vírus CD19 CAR, a expressão de CD19 CAR variou de 22-70% nas células P-T do dia 15. Ms scFv CD19 CAR LV de Vector Builder resultou na maioria de sua expressão de CD19 CAR sendo expressa em células T CD4+, enquanto Ms scFv CD19 CAR RV de Sorrento resultou em uma mistura igual de expressão de CD19 CAR em células

T CD4+ e CD8+, e a maior frequência total da expressão de CD19 CAR nas células T CD8+.

Exemplo 3: Atividade in vitro de CD19 CAR e CD20 CAR

Atividade Citolítica das Células P-CD19 CAR-T do dia 15 contra Linhagens de Células Cancerígenas

[0097] As células UCB-T ativadas foram transduzidas com retrovírus CD19 CAR ou lentivírus nos dias 2-4 de cultura UCB-T usando espinoculação. A expressão de CAR foi detectada usando proteína de fusão CD19-Fc recombinante marcada com FITC ou anticorpo anti-Myc PE, no caso de o vetor CAR conter uma etiqueta Myc. A atividade de UCB-CAR-T foi avaliada usando os dois ensaios a seguir.

[0098] Células UCB-T transduzidas por CAR CD19 exterminam especificamente alvos de câncer CD19+ Daudi em níveis comparáveis às células T CD19 CAR de PBMC, mas não exterminam células CD19-K562.

[0099] As células UCB-T transduzidas por CD20 CAR exterminam especificamente alvos de câncer CD20+ Daudi em níveis comparáveis às células T CD20 CAR de PBMC, mas não exterminam células CD20-Molp8.

[00100] As células UCB-T transduzidas por CD19 CAR secretam especificamente citocinas pró-inflamatórias IFN-g e GM-CSF, e a proteína efetora citolítica Perforina em resposta a alvos de câncer Daudi CD19+, mas não em resposta às células CD19- K562.

[00101] *In vitro*, a atividade funcional das células P-CD19 CAR T também foi avaliada em relação às linhagens de células CD19+ de Linfoma de Burkitt (Daudi) e CD19+ de Leucemia Linfoblástica Aguda (Nalm6) em um ensaio de citotoxicidade baseado em citometria de fluxo de 4 horas e ensaio de citotoxicidade cinética ACEA. As células CD19-K562 foram incluídas como controles negativos para avaliar o extermínio não específico em ambos os

ensaios.

[00102] Em ambos os ensaios de citotoxicidade cinética ACEA e fluxo de 4 horas, as células P-CD19 CAR-T exterminaram especificamente as células CD19+ Daudi e Nalm6, mas não exterminaram as células CD19- K562. No ensaio de citotoxicidade de 4 horas, a atividade P-CD19 CAR vs. alvos Nalm6 foi comparável às células CD19 CAR T de PBMC, enquanto no ensaio de citotoxicidade cinética ACEA, a atividade P-CD19 CAR-T foi comparável às células CD19 CAR de T de PBMC para alvos Daudi e Nalm6.

[00103] Além disso, a atividade funcional in vitro de células P-CD19 CAR T foi avaliada em relação às linhas de células CD19+ de Linfoma de Burkitt (Daudi) e CD19+ Leucemia Linfoblástica Aguda (Nalm6) em um ensaio de Liberação de Citocinas. As células P-CD19 CAR-T foram co-cultivadas com alvos CD19+ em uma razão E:T de 1:1 por 24 horas, e os sobrenadantes da cultura celular foram coletados e analisados quanto à secreção de várias citocinas e proteínas efetoras. Três doadores de células P-T que foram transduzidas com CD19 CAR RV foram avaliados/comparados com células CD19 CAR RV T derivadas de PBMC.

[00104] Além disso, as células P-CD19 CAR-T secretaram citocinas pró-inflamatórias e proteínas efetoras (GM-CSF, Perforina, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL2, Granzima B e Granzima A) de uma maneira específica do antígeno quando co-cultivadas com alvos CD19+ Daudi e Nalm6. Contra tanto alvos CD19+ Daudi quanto Nalm6, células P-CD19 CAR T secretaram concentrações mais altas de GM-CSF, Perforina, TNF- $\alpha$ , granzima B e especialmente IL-2 em comparação com suas partes de contagem derivadas de PBMC. A secreção significativamente maior de IL-2 é indicativa de uma população menos diferenciada e mais semelhante à célula tronco e pode promover maior expansão de células T, função e sobrevivência de células T aumentadas.

#### Exemplo 4: Atividade de P-CD19 CAR-T in vivo

[00105] In vivo, a atividade antitumoral de células P-CD19 CAR T foi avaliada usando um modelo de xenoinxerto de linfoma disseminado em camundongos NSG. Células Daudi expressando luciferase ( $3 \times 10^6$ ) foram injetadas intravenosamente (IV) no Dia 0, seguido por injeção IV de células CAR P-CD19 T. As células P-T foram dosadas de acordo com as frequências de CD8+ CD19 CAR+ descritas na tabela 1 (P-T: RV: uma dose de  $14 \times 10^6$  no Dia 7; LV: uma dose de  $20 \times 10^6$  no Dia 7 ou três doses de  $20 \times 10^6$  nos Dias 7, 10 e 14). A imagem de bioluminescência (BLI) e a sobrevivência foram usadas como pontos finais do estudo primário.

Grupo	Tratamento	# dos animais	Cronograma de Dosagem	Dosagem de Células T	Pré-congelamento % de CD19 CAR + CD8+ (de CD3+)	Dose de Células CD19 CAR + CD8+	ROA
1	Veículo (PBS)	5	Dia 7	N/A	N/A	N/A	IV
2	CD19-CAR RV de PBMC	5	Dia 7	7MM	30,59%	2,14 MM	
3		5	Dia 7	2 MM	30,59%	0,612 MM	
4	P-T CD19-CAR RV	5	Dia 7	14MM	15,01%	2,1 MM	
5	P-T CD19-CAR LV-TRAC KO	5	Dia 7	20MM	3,11%	0,622 MM	
6	P-T CD19-CAR LV (multidose)	5	Dias 7, 10, 14	20MM	3,50%	3 x 0,7 MM = 2,1 MM	

[00106] As células P-CD19 CAR T foram bem toleradas e seguras neste modelo de camundongo, mesmo em três doses de  $20 \times 10^6$  de células T

modificadas com não TRAC. Todas as células P-CD19 CAR T reduziram significativamente a carga tumoral e melhoraram a sobrevivência. Quatro semanas após o tratamento, o grupo de veículo teve uma taxa de mortalidade de 100%, enquanto todos os animais do grupo tratado com P-CD19 CAR T (N=5) permaneceram vivos sem sintomas clínicos, incluindo perda de peso. Os grupos tratados com P-CD19 CAR LV gerenciaram a carga tumoral, bem como o grupo tratado com CD19 CAR de PBMC (7MM). Multidoses (3X) com células P-CD19 CAR LV demonstraram melhora em relação a uma única dose e exibiram gerenciamento de tumor e sobrevivência ligeiramente melhor do que pelo grupo tratado com CD19-CAR RV de PBMC (7MM) (ambos dosados em um total de CD19-CAR+ Células T CD8+ 2,1 MM). Notavelmente, a dose única de células P-CD19 CAR LV (células T CD19-CAR+ CD8+ 0,6MM) reduziu a carga tumoral e melhorou a sobrevivência melhor do que o grupo tratado com CD19 CAR RV de PBMC 2MM (também células T CD19-CAR+ CD8+ 0,6MM). Notavelmente, os camundongos tratados com P-CD19 CAR RV superaram todos os grupos de tratamento e células tumorais erradicaram com 100% de sobrevivência até o Dia 109. O fenótipo de células T menos diferenciado, junto com a presença de células T naïve/scm e efetoras, uma boa mistura de células T CD4+ e CD8+, maior expressão de CD8+ CD19 CAR+ e maior secreção de citocinas (especialmente IL2 para suportar a função de células T / sobrevivência), todos aqui neste documento, acredita-se que contribuem coletivamente para a maior eficácia e sobrevivência aumentada observada *in vivo* com células P-CD19 CAR T, especialmente as células T P-CD19 CAR RV.

[00107] Os camundongos sobreviventes do grupo tratado com P-CD19 CAR RV foram então desafiados novamente com células tumorais Daudi adicionais. No Dia 122, células Daudi expressando luciferase ( $3 \times 10^6$ ) foram injetadas por intravenosamente (IV) nos camundongos sobreviventes tratados com P-CD19

CAR RV, bem como camundongos NSG naïve da mesma idade (6 meses de idade), para servir como o novo grupo de controle do veículo.

[00108] Este estudo ainda está em andamento, mas no Dia 151 (28 dias após o novo desafio) observamos BLI significativamente menor (carga do tumor) e nenhum sintoma clínico (perda de peso) dentro do grupo de novo desafio P-CD19 CAR RV, enquanto detectamos aumento no BLI e perda de peso com o grupo de controle do Veículo. O BLI, o peso corporal e a sobrevivência continuarão a ser monitorados e espera-se que continuem melhorando.

#### Exemplo 5: Nocaute do Receptor de células T (TRAC) em células T UCB

[00109] O TRAC foi direcionado usando RNA guia (gRNA) contra o primeiro éxon do locus TRAC. Formas de RNA quimicamente modificadas de Cas9 e gRNA foram transfectadas em células P-T no dia 6-8 da cultura P-T por meio de Nucleofecção (Lonza). A eficiência da modificação genética foi monitorada por citometria de fluxo usando anticorpos contra TCR $\alpha\beta$  ou CD3.

[00110] Em três experimentos separados, a eficiência de nocaute do TRAC foi medida 3 dias após a transfecção. A data no eixo x indica a hora da transfecção. Mais de 90% de nocaute do gene TRAC foram alcançados independentemente do método de ativação de P-T e das condições de cultura (Dynabeads com IL2 ou Transact com IL7 e IL15). B. A proliferação e a viabilidade celular foram minimamente impactadas pelo processo CRISPR. Não há mudança significativa da proliferação e viabilidade celular entre os diferentes grupos.

[00111] Além disso, quando as células P-T foram transduzidas com CD19 CAR LV ou RV no Dia 3, seguido por transfecção e TRAC KO usando CRISPR no Dia 6, Dia 15, as células P-T NT-TRAC KO e P-CD19 CAR-TRAC KO exibiram >97% de Eficiência de TRAC KO.

[00112] Além disso, TRAC KO não resultou em nenhuma mudança significativa na expressão de CD19 CAR ou na atividade citolítica *in vitro* vs. CD19

+ Daudi e alvos Nalm6 em células P-T.

Exemplo 6: Alorreatividade de Células UBC-T Medida em Ensaio in vitro

[00113] Dois ensaios independentes foram usados para medir a alorreatividade de PMBCs contra células P-T, ou células P-T contra PBMCs. No primeiro, a alorreatividade foi medida como a atividade de exterminar células de um doador contra outro em uma co-cultura de 4 horas. As células alvos foram marcadas com PKH26 e a citotoxicidade foi expressa como porcentagem de células alvos exterminadas sobre o total de células alvos. No segundo, a alorreatividade foi medida como proliferação preferencial de células T de um doador quando co-cultivadas com outro. As células de dois doadores são marcadas com corantes diferentes (CFSE e PKH26) e co-cultivadas na proporção de 1:1 por 4 dias. A diluição do corante é indicativa de proliferação celular e pode ser expressa como uma diminuição da porcentagem de células com alta intensidade ou mudança da intensidade média de fluorescência.

[00114] Em dois experimentos separados, PBMCs ou células T derivadas de PBMC foram co-cultivadas com células P-T. PBMCs de um doador exterminaram PBMCs de outro doador com alta eficiência. Mas as PBMCs não exterminaram as células P-T (CBT). Em um experimento separado, células T derivadas de PBMC (PBT) a linhagem celular de câncer RPMI8226 (RPMI) com alta eficiência. Mas elas tiveram atividade mínima em exterminar células P-T (CBT). As células P-T também não exterminaram as células T derivadas de PBMC.

[00115] As células P-T e as PBMCs de controle foram marcadas com PKH26 e as PBMCs são marcadas com CFSE. PBMC marcadas com CFSE, P-T (CBT) marcada com PKH26 e cultura mista de PBMC rotulada com CFSE ou PKH26 serviram como controles. Há menor porcentagem de células PKH26-hi P-T (CBT) em comparação com a cultura apenas P-T, indicativo de proliferação preferencial de células P-T em co-cultura com PBMCs.

[00116] Consistente com este resultado, o MFI de células P-T também caiu em co-cultura com PBMCs em comparação com células P-T apenas e PBMC com controle de PBMC indicativo de melhor proliferação. Ao contrário, o MFI de PBMCs em co-cultura aumentou em comparação com PBMCs apenas ou PBMC com cultura de PBMC.

#### Exemplo 7: Alorreatividade de Células P-T em Modelos Animais

[00117] A alorreatividade (xeno-alorreatividade) de células P-T expandidas de 21 dias não modificadas foi testada em um modelo de camundongo NCG de GvHD. Neste modelo, PBMC causa GvHD, que pode ser medido como perda de peso. 30 milhões de células P-T depletadas em CD25 de três doadores e PMBCs de controle foram injetadas em camundongos NCG por meio de IV. O peso do animal foi monitorado ao longo do tempo.

[00118] A mudança do peso corporal dos animais foi expressa como porcentagem do peso corporal no dia da injeção das células. Cada linhagem representa um camundongo. Todos os cinco animais do grupo PBMC perderam peso ao longo de 28 dias e tiveram que ser sacrificados. Nenhum no grupo P-T teve perda de peso significativa e induziu xeno-GvHD. As células P-T foram depletadas em CD25 antes da expansão para remover Tregs, portanto, a falta de GvHD não é atribuída a células T regulatórias imunológicas CD4+ CD25+ CD127-FoxP3+. Estudos adicionais de GvHD estão em andamento para avaliar a alorreatividade das células T P-CD19 CAR-T e P-CD19 CAR-TRAC KO.

[00119] A presente invenção não deve ser limitada no seu escopo pelas modalidades específicas descritas neste documento. De fato, várias modificações da invenção, além das descritas, irão se tornar evidentes aos versados na técnica, a partir da descrição anterior e figuras anexas. Tais modificações são destinadas a ser abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

[00120] Todas as referências citadas são incorporadas neste documento por referência na sua totalidade e para todos os propósitos na mesma medida como se cada publicação individual, pedido de patente ou patente fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado por referência na sua totalidade para todos os propósitos. A citação de qualquer publicação é para a sua divulgação antes da data de depósito e não deve ser interpretada como uma admissão de que a presente invenção não tem o direito de anteceder tal publicação em virtude de invenção anterior.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uma população de células T que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR), em que as ditas células T são células T da placenta.

2. A população de células T da reivindicação 1, em que as ditas células T da placenta são células T do cordão umbilical, células T do perfusato da placenta ou uma mistura das mesmas.

3. A população de células T da reivindicação 1, em que as ditas células T da placenta são células T do sangue do cordão umbilical.

4. A população de células T da reivindicação 1, em que as ditas células T da placenta são uma mistura de células T do cordão umbilical e células T do perfusato da placenta.

5. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-4, em que o dito CAR foi introduzido na célula por transfecção.

6. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-4, em que o dito CAR foi introduzido na célula por transdução viral.

7. A população de células T da reivindicação 6, em que o dito CAR foi introduzido na célula por transdução viral com um vetor retroviral.

8. A população de células T da reivindicação 6, em que o dito CAR foi introduzido na célula por transdução viral com um vetor lentiviral.

9. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-8, em que a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam CD45RA do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico.

10. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-9, em que a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam CD27 do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico.

11. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-10, em que a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam CCR7 do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico.

12. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-11, em que a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam CD127 do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico.

13. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-12, em que a dita população de células T tem uma porcentagem menor de células que expressam CD57 do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico.

14. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-13, em que a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam CD62L do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico.

15. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-14, em que a dita população de células T tem uma porcentagem menor de células que expressam CD25 do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico.

16. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-15, em que a dita população de células T tem uma porcentagem maior de células que expressam Lag-3<sup>+</sup> do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico.

17. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-16, em que a dita população de células T tem uma porcentagem menor de células que expressam Tim-3 do que uma população de células T de células mononucleares

do sangue periférico.

18. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-17, em que a dita população de células T exibe maior extermínio *in vitro* de uma linhagem de células cancerígenas do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico.

19. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-18, em que a dita população de células T expressa uma quantidade maior de perforina em um desafio *in vitro* contra uma linhagem de células cancerígenas do que uma população de células T de células mononucleares de sangue periférico.

20. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-19, em que a dita população de células T expressa uma quantidade maior de GM-CSF em um desafio *in vitro* contra uma linhagem de células cancerígenas do que uma população de células T de células mononucleares de sangue periférico.

21. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-20, em que a dita população de células T expressa uma quantidade maior de TNF-a em um desafio *in vitro* contra uma linhagem de células cancerígenas do que uma população de células T de células mononucleares de sangue periférico.

22. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-21, em que a dita população de células T expressa uma quantidade maior de IL-2 em um desafio *in vitro* contra uma linhagem de células cancerígenas do que uma população de células T de células mononucleares de sangue periférico.

23. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-22, em que a dita população de células T expressa uma quantidade maior de granzima B em um desafio *in vitro* contra uma linhagem de células cancerígenas do que uma população de células T de células mononucleares de sangue periférico.

24. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-23, em que a dita população de células T produz maior sobrevivência em um modelo de

câncer *in vivo* do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico.

25. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-24, em que a dita população de células T produz perda de peso corporal diminuída em um modelo de câncer *in vivo* do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico.

26. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-25, em que a dita população de células T produz doença do enxerto *versus* hospedeiro (GvHD) diminuída em um modelo de câncer *in vivo* do que uma população de células T de células mononucleares do sangue periférico.

27. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 9-26, em que a dita população de células T de células mononucleares do sangue periférico também expressa um dito CAR.

28. A população de células T da reivindicação 27, em que o dito CAR foi introduzido na dita população de células T de células mononucleares do sangue periférico por transfecção.

29. A população de células T da reivindicação 27, em que o dito CAR foi introduzido na dita população de células T de células mononucleares do sangue periférico por transdução viral.

30. A população de células T da reivindicação 29, em que o dito CAR foi introduzido na dita população de células T de células mononucleares do sangue periférico por transdução viral com um vetor retroviral.

31. A população de células T da reivindicação 29, em que o dito CAR foi introduzido na dita população de células T de células mononucleares do sangue periférico por transdução viral com vetor letiviral.

32. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-31, em que o dito CAR que foi introduzido a dita população de células T de células

mononucleares do sangue periférico é o mesmo CAR expresso pela dita população de células T.

33. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-32, em que a dita população de células T compreende uma alteração genética adicional para reduzir a imunogenicidade contra um hospedeiro.

34. A população de células T da reivindicação 33, em que a dita alteração genética é um nocaute de gene.

35. A população de células T da reivindicação 34, em que o dito nocaute de gene é um nocaute do receptor de células T (TCR).

36. A população de células T da reivindicação 34, em que o dito nocaute de gene é um nocaute da constante alfa do receptor de células T (TRAC).

37. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 33-36, em que a dita alteração genética adicional é efetuada por transfecção, transdução retroviral ou transdução lentiviral.

38. A população de células T de qualquer uma das reivindicações 33-36, em que a dita alteração genética adicional é efetuada pelo uso de tecnologia CRISPR, talen ou dedo de zn.

39. O método para tratar câncer ou um sintoma do mesmo em um paciente em necessidade do mesmo, o método compreendendo a etapa de administrar ao paciente uma quantidade da população de células T de qualquer uma das reivindicações 1-38 eficaz para aliviar o câncer ou sintoma do mesmo no paciente.

40. O método da reivindicação 39, em que o dito câncer é um câncer hematológico.

41. O método da reivindicação 40, em que o dito câncer hematológico é um câncer de células B.

42. O método de qualquer uma das reivindicações 39-41, em que a

população de células T é alogênica ao dito paciente.

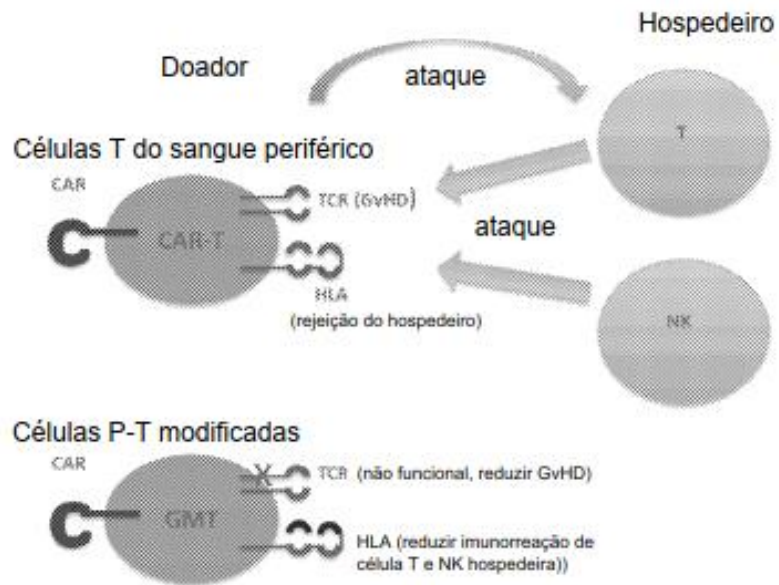
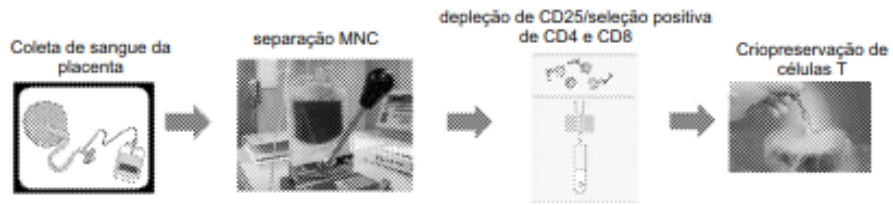
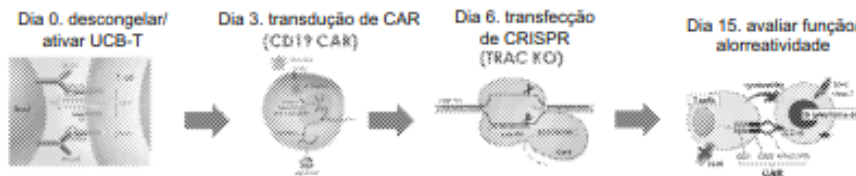


FIG. 1

**PROCESSAMENTO E ISOLAMENTO DE CÉLULA T:****EXPANSÃO E MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE P-T****FIG. 2**

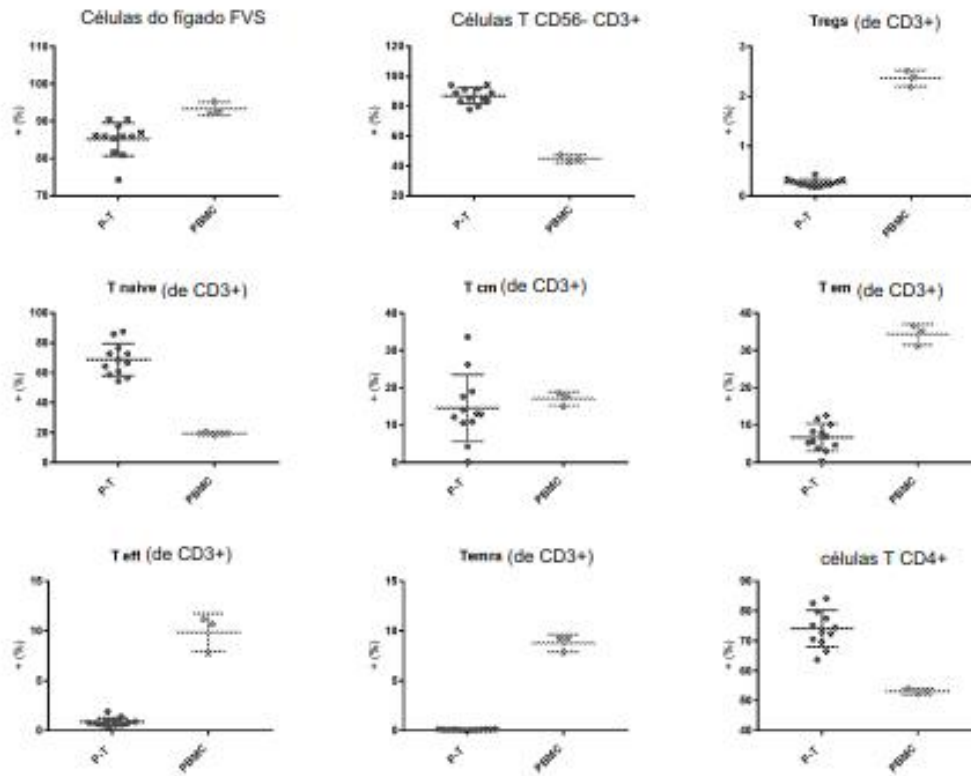


FIG. 3

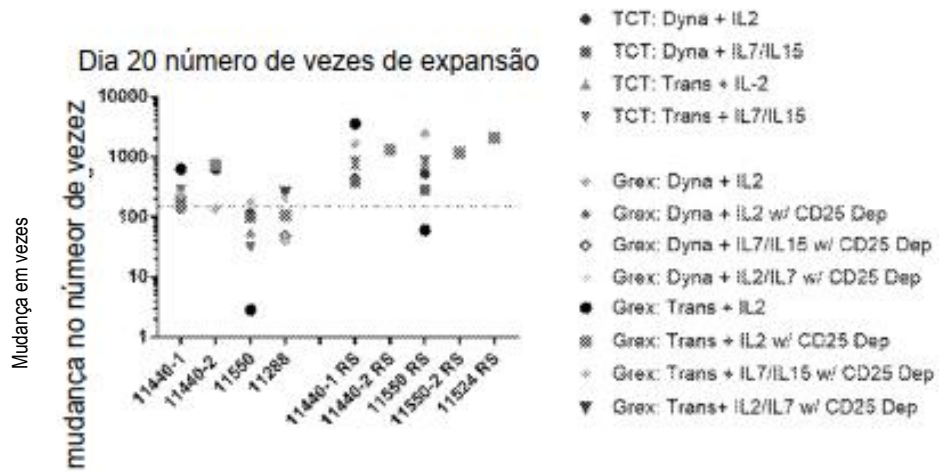


FIG. 4

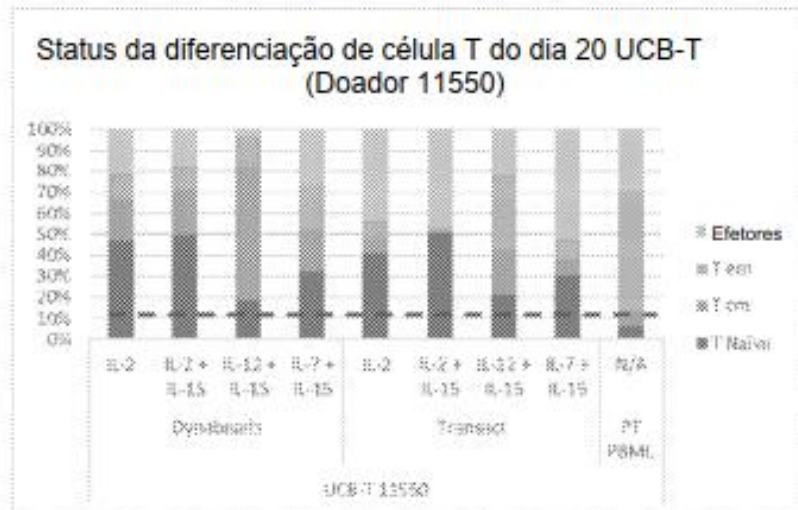
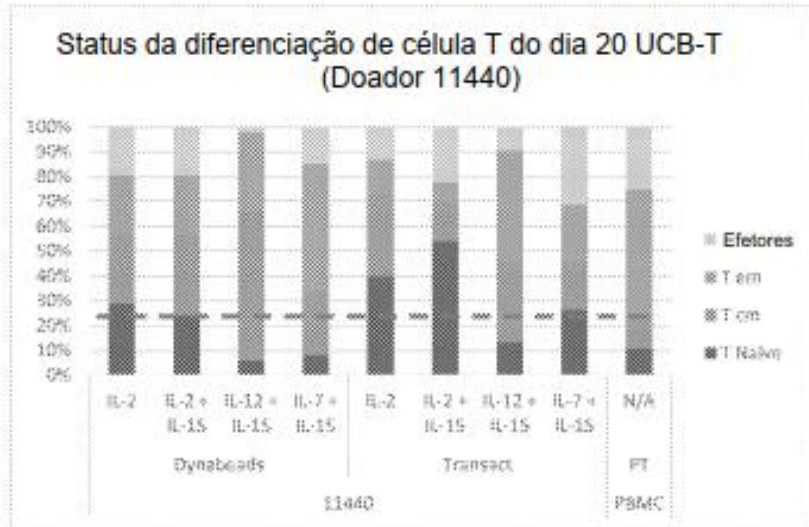


FIG. 5

Número de vezes da expansão de 2019 P-CD19 CAR D0-D15

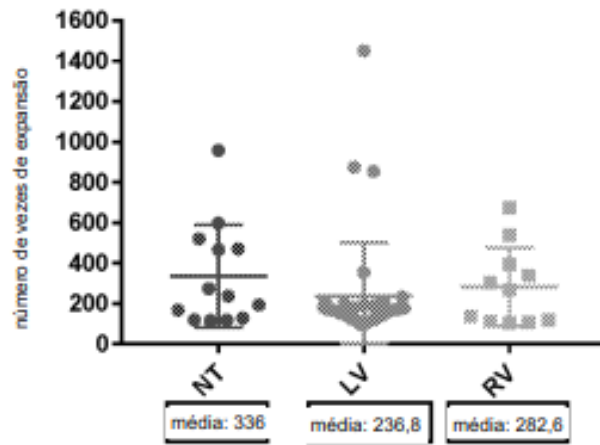


FIG. 6

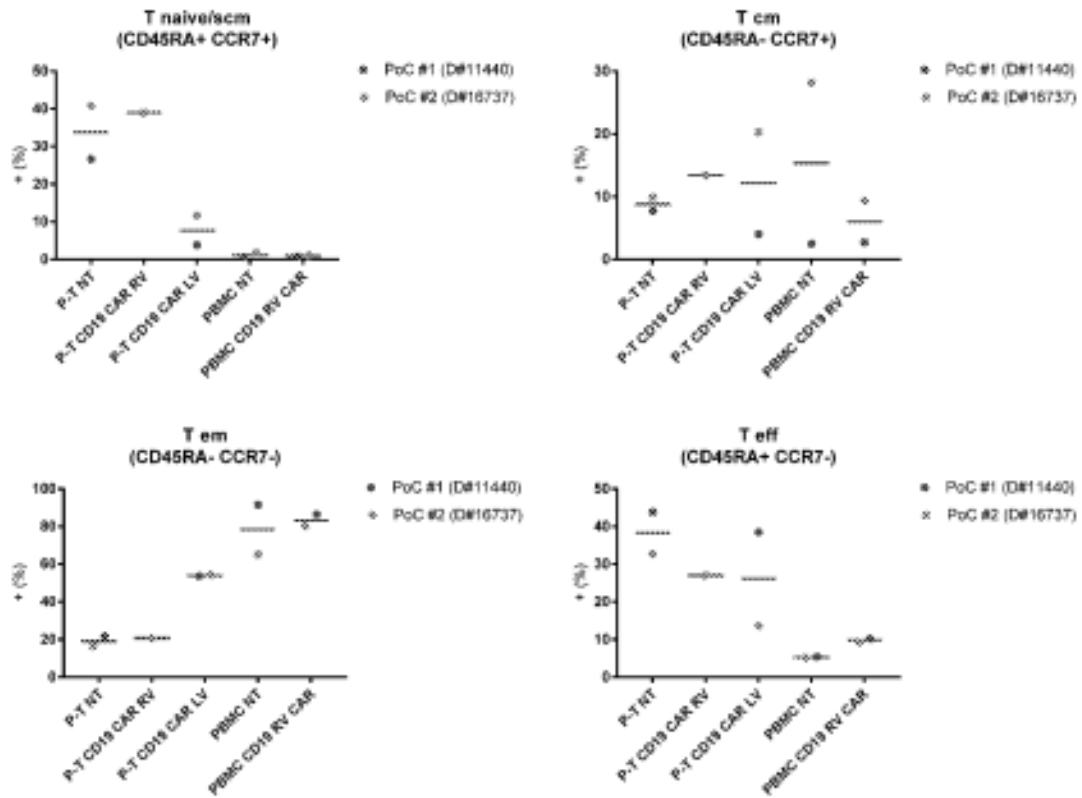


FIG. 7

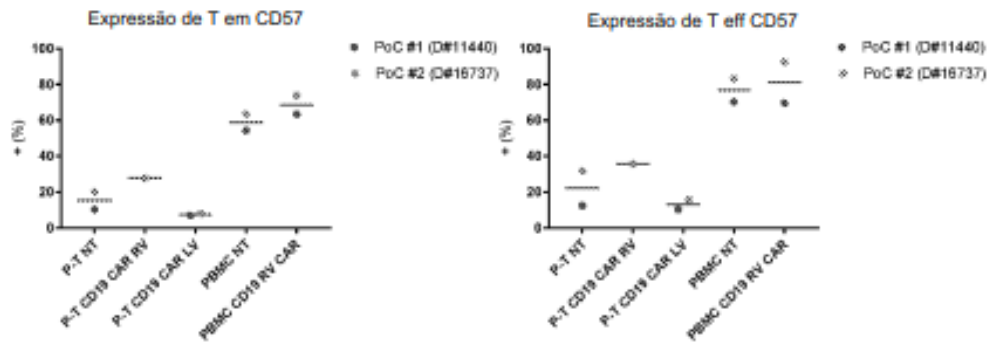


FIG. 8

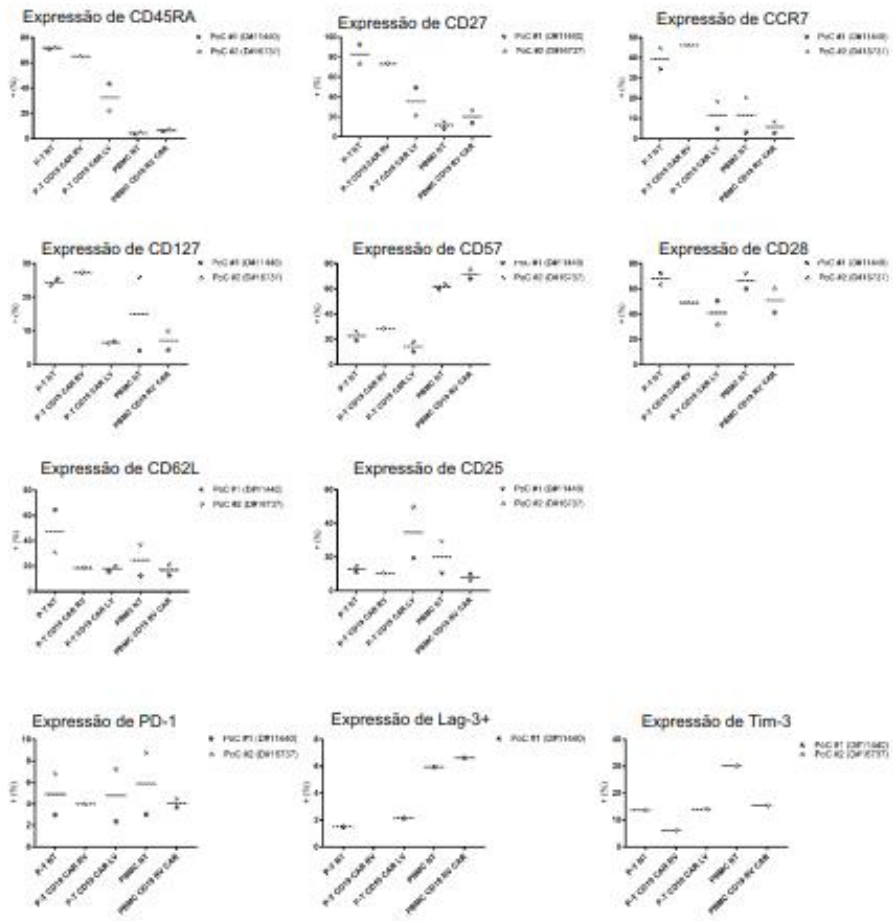


FIG. 9

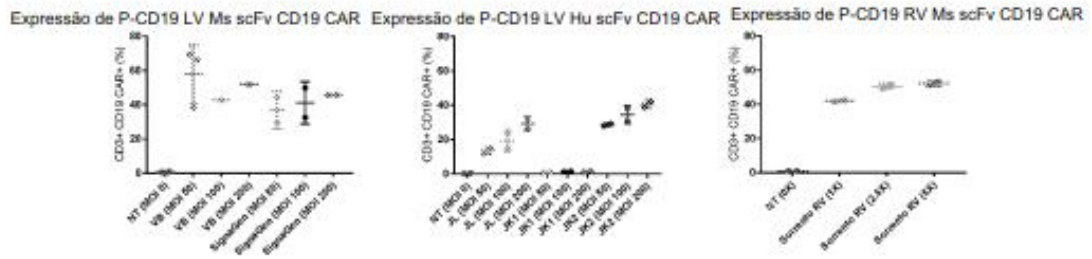


FIG. 10

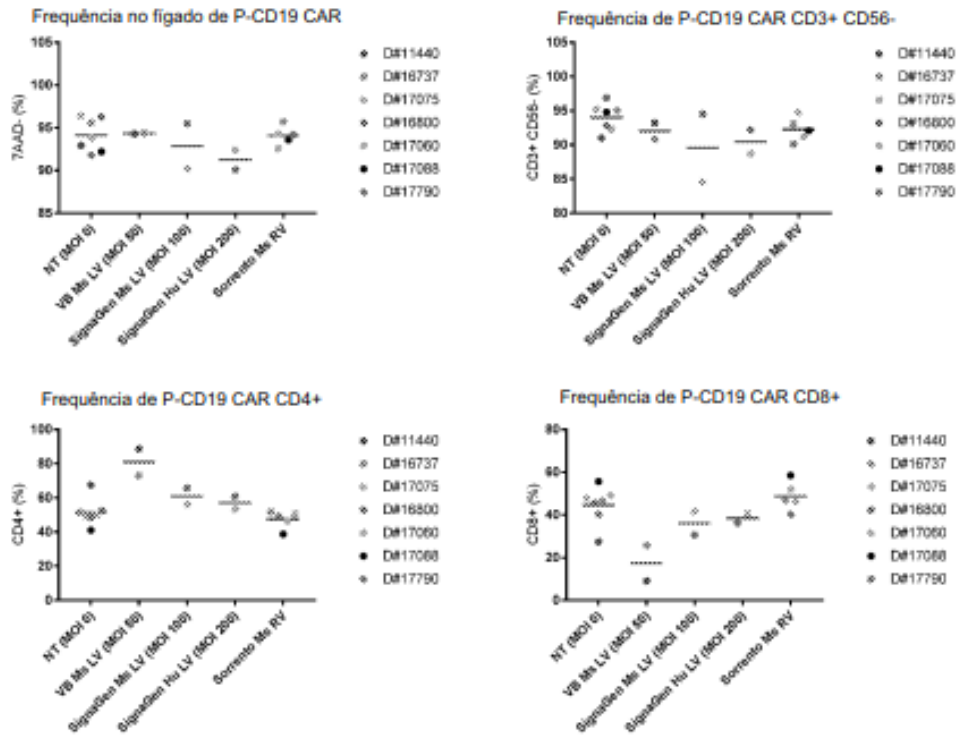


FIG. 11



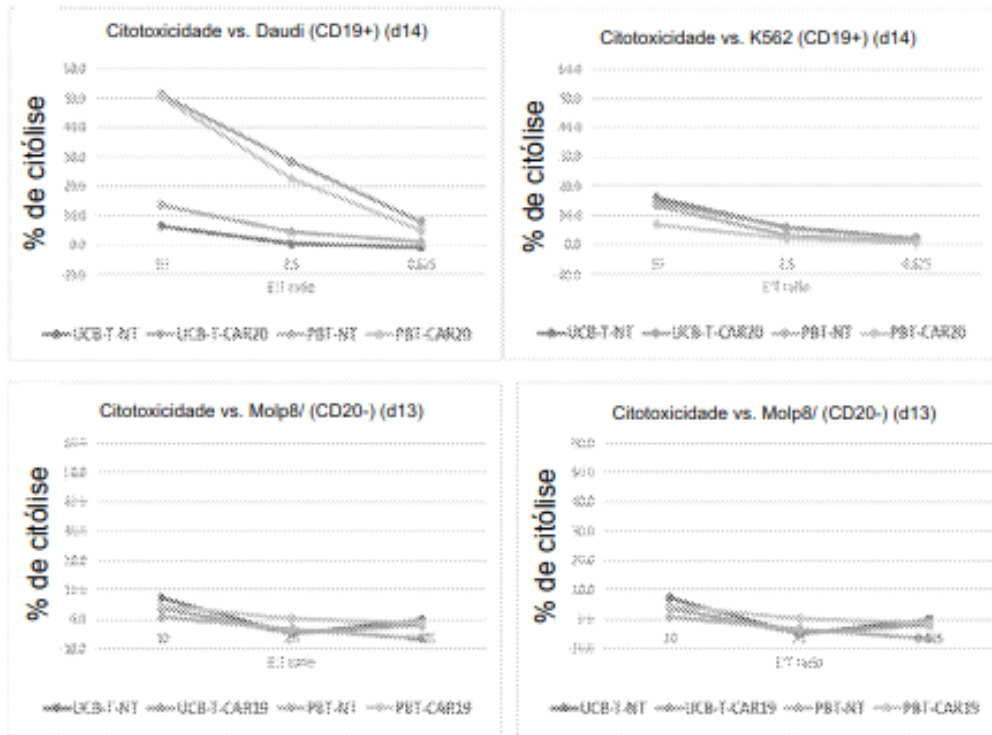


FIG. 13

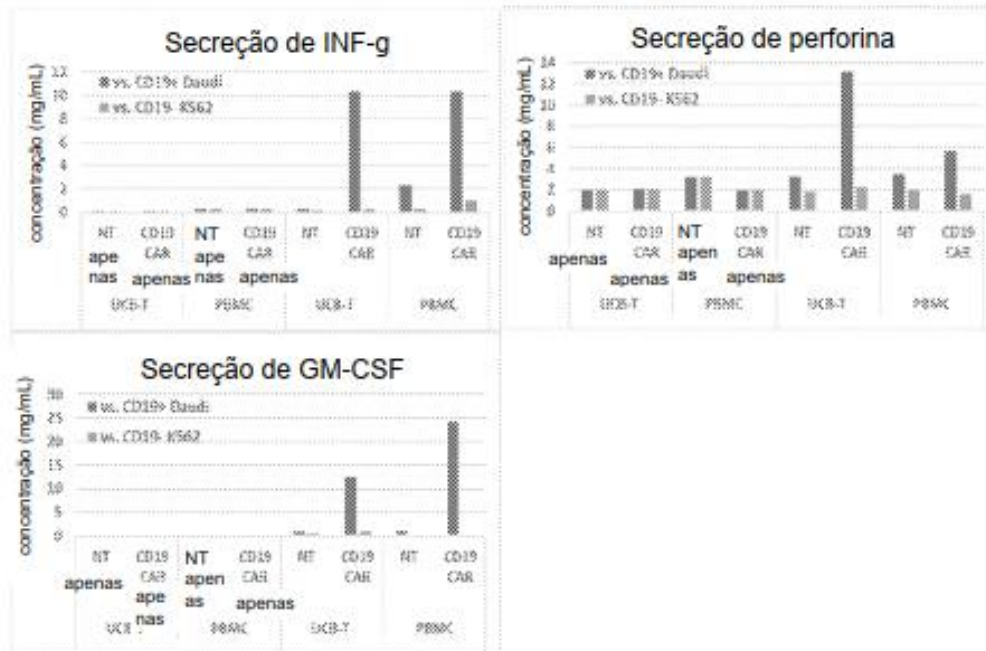


FIG. 14

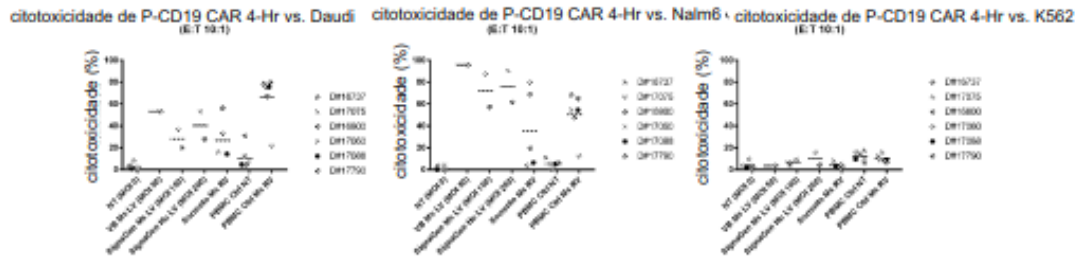


FIG. 15

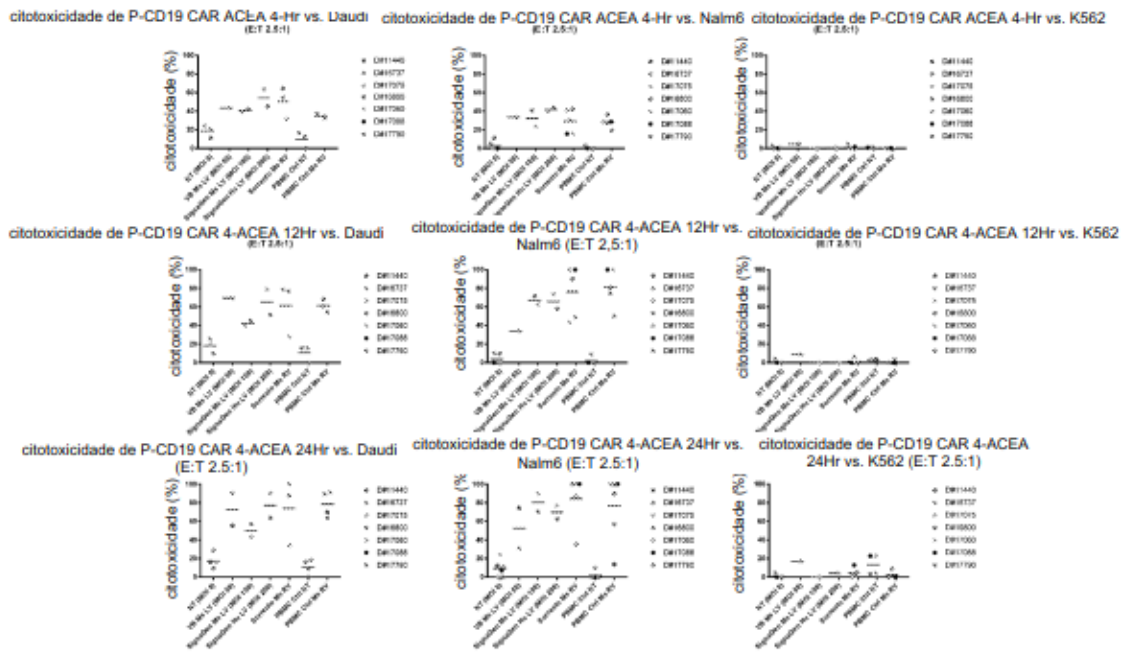


FIG. 16

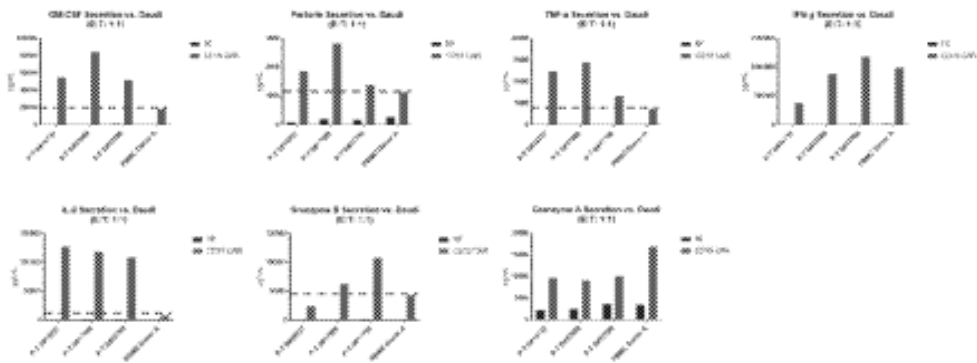


FIG. 17

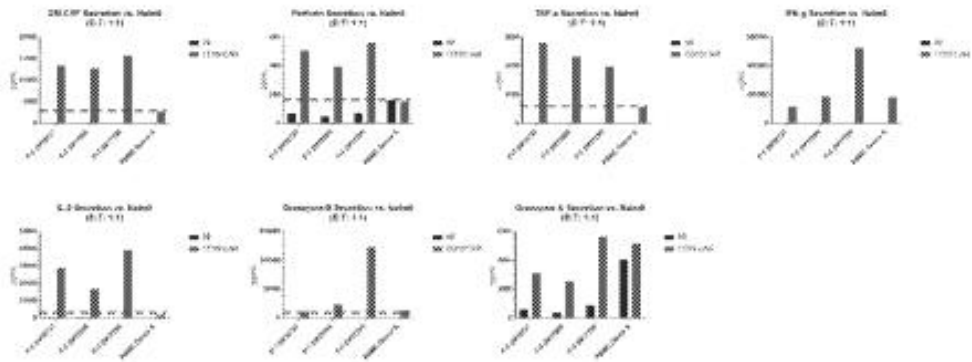


FIG. 18

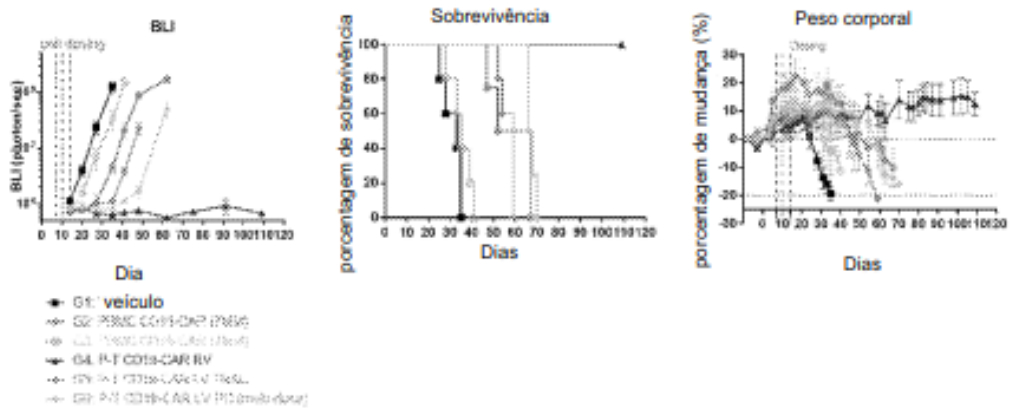


FIG. 19

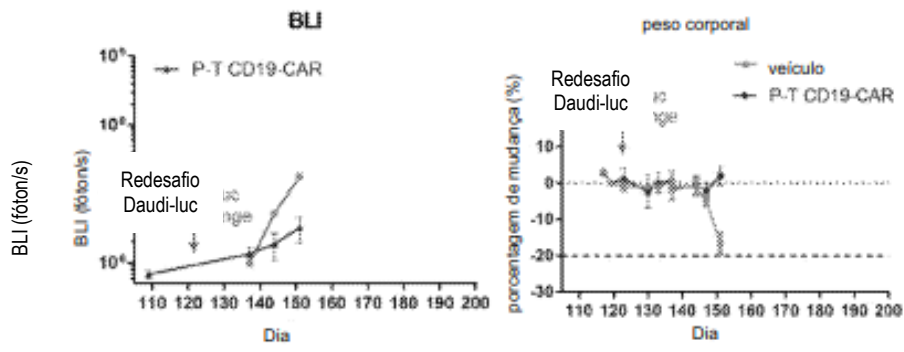
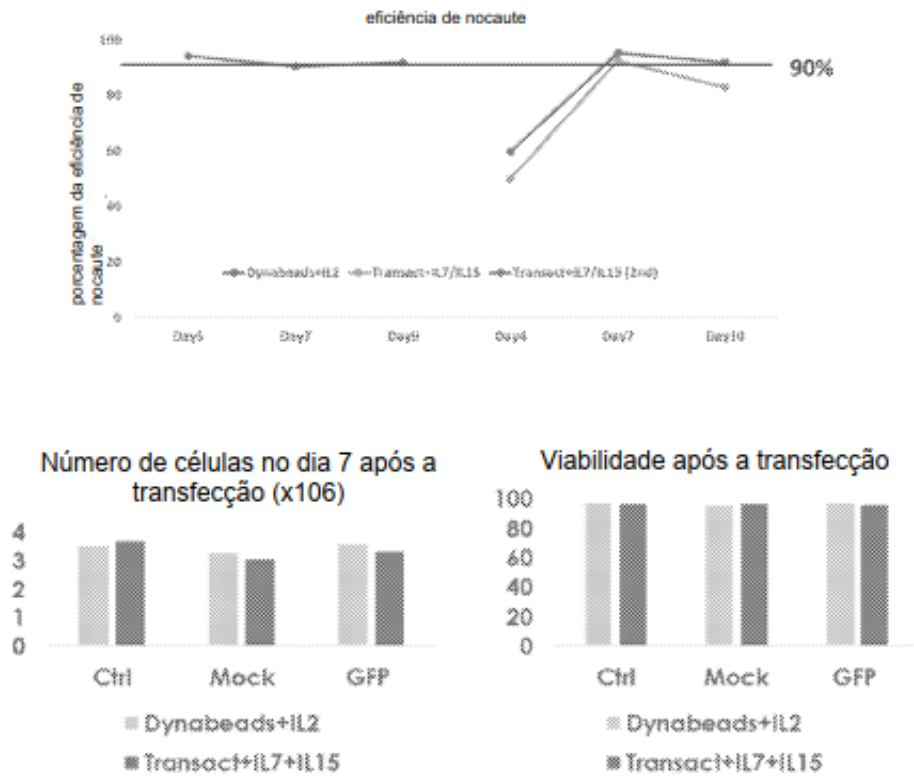


FIG. 20



**FIG. 21**

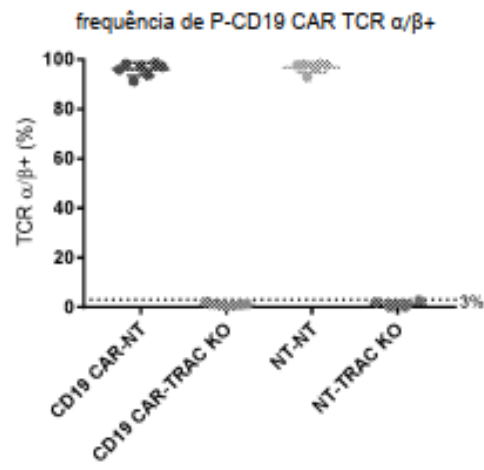


FIG. 22

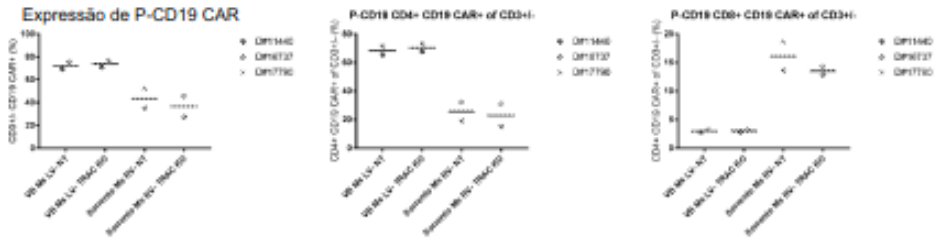


FIG. 23

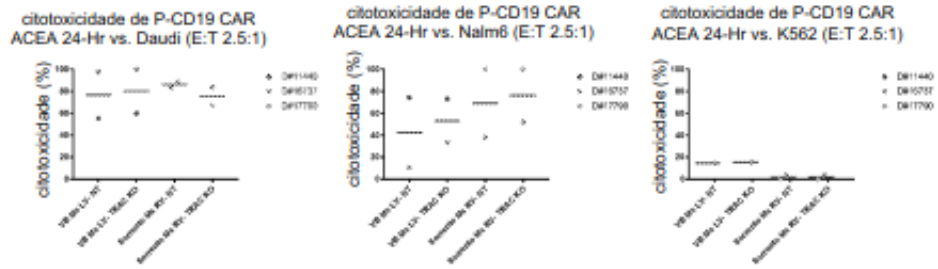


FIG. 24

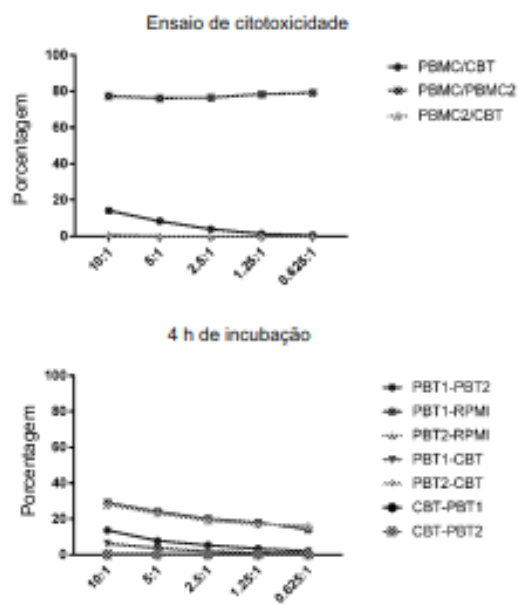


FIG. 25

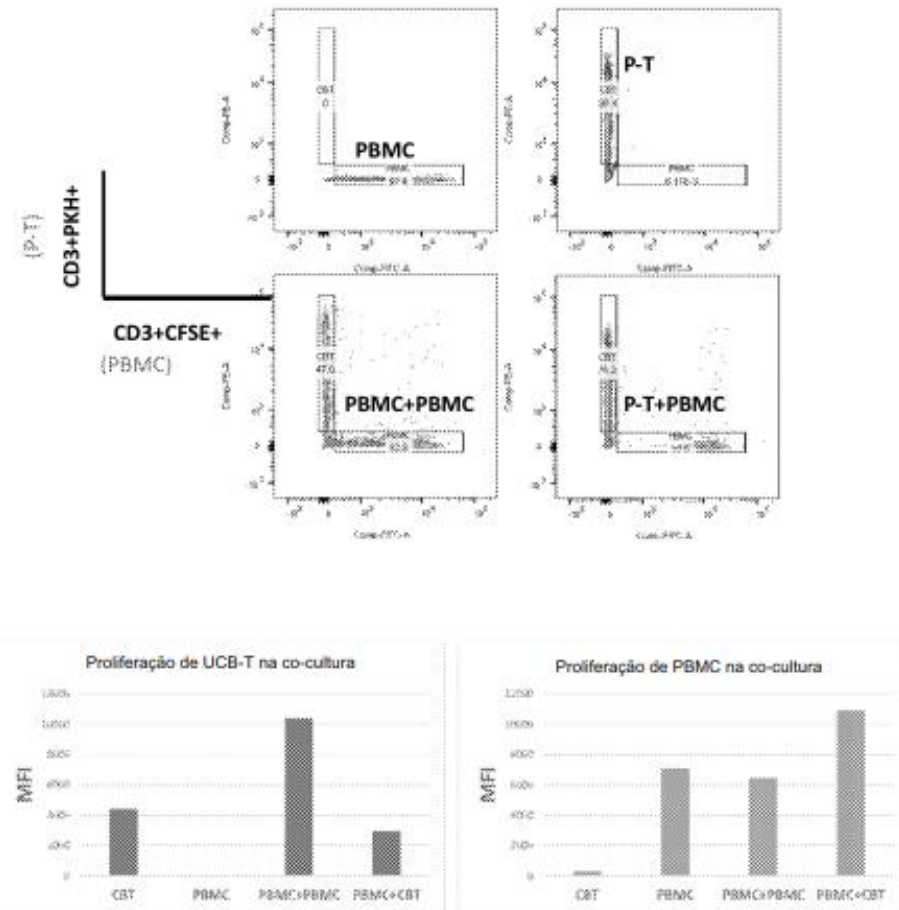


FIG. 26

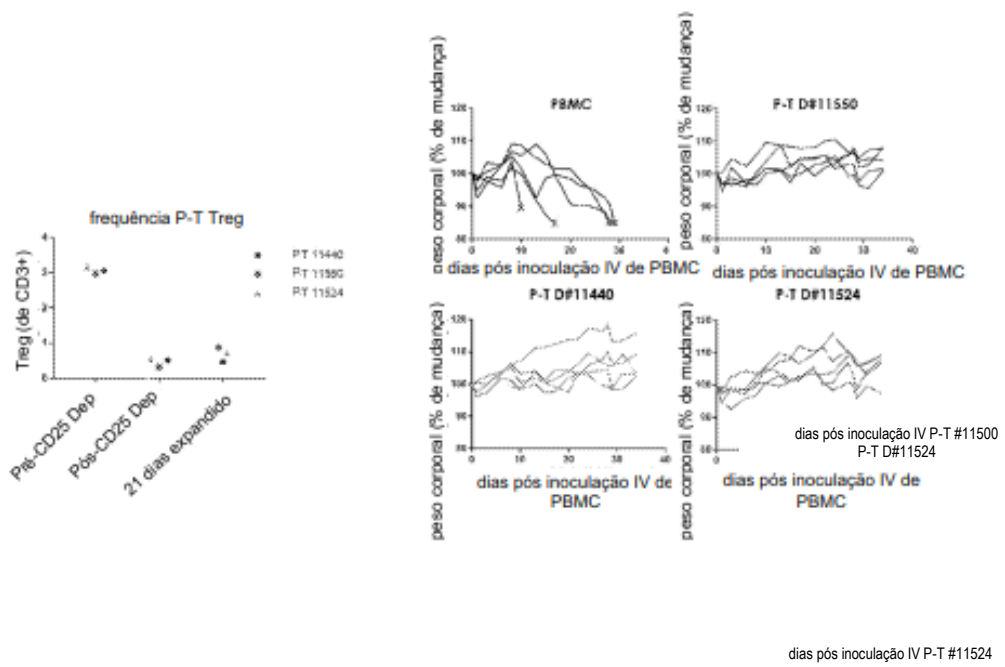


FIG. 27

RESUMO**CÉLULAS CAR-T ALOGÊNICAS DERIVADAS DA PLACENTA E USOS DA MESMAS**

A presente invenção divulga populações de células T que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR), em que as ditas células T são células T da placenta derivadas do sangue do cordão umbilical, perfusato da placenta ou uma mistura dos mesmos. Demonstrou-se que tais populações de células são melhoradas em inúmeros aspectos em relação a populações alternativas de células, tais como aquelas derivadas de células T de células mononucleares de sangue periférico. Também divulga métodos de tratar câncer, tal como um câncer hematológico, por exemplo, um câncer de células B, ou um sintoma do mesmo em um paciente com necessidade do mesmo. Estes métodos compreendem administrar ao paciente uma quantidade da população de células T de qualquer uma da invenção eficaz para aliviar o câncer ou sintoma do mesmo no paciente.