

**COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REPROGRAMAÇÃO DE TCR USANDO
PROTEÍNAS DE FUSÃO ESPECÍFICAS PARA O ALVO
REFERÊNCIA CRUZADA**

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório U.S. nº 62/703.824, depositado em 26 de julho de 2018, do Pedido de Patente Provisório U.S. nº 62/725.666, depositado em 30 de agosto de 2018, Pedido de Patente Provisório U.S. nº 62/703.834, depositado em 26 de julho de 2018, Pedido de Patente Provisório U.S. nº 62/727.469, depositado em 5 de setembro de 2018, e Pedido de Patente Provisório U.S. nº 62/727.459, depositado em 5 de setembro de 2018, cada um dos quais é inteiramente incorporado neste documento por referência.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0002] A maioria dos pacientes com tumores sólidos em estágio tardio são incuráveis com terapia padrão. Além disso, as opções tradicionais de tratamento muitas vezes têm efeitos colaterais graves. Numerosas tentativas foram feitas para envolver o sistema imunológico de um paciente para rejeitar células cancerosas, uma abordagem coletivamente referida como imunoterapia contra câncer. Entretanto, vários obstáculos tornam bastante difícil atingir a eficácia clínica. Embora centenas de assim chamados antígenos de tumores tenham sido identificados, estes são muitas vezes derivados de si mesmos e, portanto, podem direcionar a imunoterapia contra câncer contra tecido saudável ou são pouco imunogênicos. Além disso, as células cancerígenas usam múltiplos mecanismos para tornarem-se invisíveis ou hostis à iniciação e propagação de um ataque imunológico por imunoterapias contra câncer.

[0003] Os desenvolvimentos recentes que utilizam receptor de antígeno quimérico (CAR) modificaram a terapia com células T autólogas, a qual se baseia no redirecionamento de células T geneticamente manipuladas para uma molécula de superfície celular apropriada em células cancerígenas, mostram resultados promissores no aproveitamento do poder do sistema imunológico para tratar malignidades de células B (consulte, *por exemplo*, Sadelain et al., *Cancer Discovery* 3:388-398 (2013)). Os resultados clínicos com células T de CAR específico de CD19 (chamado CTL019) mostraram remissões completas em pacientes que sofrem de leucemia linfocítica crônica (CLL), bem como na leucemia linfoblástica

aguda (ALL) em crianças (ver, *por exemplo*, Kalos et al., *Sci Transl Med* 3:95ra73 (2011), Porter et al., *NEJM* 365:725-733 (2011), Grupp et al., *NEJM* 368:1509-1518 (2013)). Uma abordagem alternativa é o uso de cadeias alfa e beta de receptor de células T (TCR) selecionadas para um antígeno peptídico associado ao tumor para células T autólogas geneticamente manipuladas. Estas cadeias de TCR formarão complexos de TCR completos e fornecerão as células T com um TCR para uma segunda especificidade definida. Foram obtidos resultados encorajadores com células T autólogas modificadas que expressam as cadeias alfa e beta de TCR específico de NY-ESO-1 em pacientes com carcinoma sinovial.

[0004] Além da capacidade de células T geneticamente manipuladas que expressam um CAR ou um segundo TCR reconhecerem e destruírem respectivas células-alvo *in vitro/ex vivo*, a terapia bem-sucedida com pacientes com células T manipuladas requer que as células T sejam capazes de forte ativação, expansão, persistência ao longo do tempo e, em caso de doença recorrente, para permitir uma resposta de 'memória'. A alta e gerenciável eficácia clínica das células T de CAR é atualmente limitada a malignidades de células B positivas para CD19 e BCMA aos pacientes de sarcoma sinovial que expressam peptídeo de NY-ESO-1 expressando HLA-A2. Existe uma clara necessidade de melhorar as células T geneticamente manipuladas para atuarem de forma mais ampla contra várias malignidades humanas.

SUMÁRIO

[0005] São fornecidas neste documento proteínas de fusão (TFPs) de receptor de células T (TCR), células T manipuladas para expressar uma ou mais TFPs e seus métodos de uso para o tratamento de doenças.

[0006] De acordo com um aspecto, é fornecida neste documento uma composição farmacêutica que compreende (I) uma célula T de um sujeito humano, em que a célula T compreende uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) compreendendo (a) uma subunidade TCR compreendendo (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (ii) um domínio transmembranar de TCR, e (iii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador de um domínio de sinalização intracelular; e (b) um domínio de ligação ao antígeno compreendendo um domínio de ligação anti-MUC16, um domínio de

ligação anti-IL13R α 2 ou um domínio de ligação anti-mesotelina (MSLN); e (II) um carreador farmacologicamente aceitável; em que a subunidade TCR e o domínio de ligação ao antígeno estão operativamente ligados; em que a TFP interage funcionalmente com um TCR quando expresso na célula T.

[0007] Em algumas modalidades, a célula T exibe citotoxicidade aumentada para uma célula que expressa um antígeno que interage especificamente com o domínio de ligação ao antígeno em comparação com uma célula T que não contém a TFP.

[0008] Em algumas modalidades, o domínio extracelular TCR, o domínio transmembranar TCR e o domínio intracelular TCR da subunidade TCR são derivados de uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3 epsilon, CD3 gama ou CD3 delta.

[0009] Em algumas modalidades, o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR da subunidade de TCR são derivados de uma subunidade única de um complexo de TCR, em que a subunidade única é uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3 epsilon, CD3 gama ou CD3 delta.

[0010] De acordo com um aspecto, é fornecida neste documento uma composição farmacêutica que compreende (I) uma célula T de um sujeito humano, em que a célula T compreende uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) compreendendo (a) uma subunidade de TCR compreendendo (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (ii) um domínio transmembrana e (iii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador de um domínio de sinalização intracelular; e (b) um scFv ou anticorpo de domínio único compreendendo um domínio de ligação anti-MUC16, um domínio de ligação anti-IL13R α 2 ou um domínio de ligação anti-mesotelina (MSLN); e (II) um carreador farmacologicamente aceitável; em que a subunidade de TCR e o anti-MUC16 ou o anti-IL13R α 2 ou o domínio de ligação anti-MSLN estão operativamente ligados; em que os domínios de sinalização extracelular, transmembrana e intracelular da subunidade de TCR são derivados apenas de uma subunidade de TCR diferente de uma cadeia alfa de TCR ou uma cadeia beta de TCR; em que a TFP interage funcionalmente com um TCR quando expressa na célula T; e em que a célula T

exibe citotoxicidade aumentada para uma célula que expressa um antígeno que interage especificamente com o anti-MUC16 ou um domínio de ligação anti-IL13R α 2 em comparação com uma célula T que não contém a TFP.

[0011] Em algumas modalidades, a sequência que codifica o anti-MUC16 ou o anti-IL13R α 2 ou o domínio de ligação anti-MSLN está conectada à sequência que codifica o domínio extracelular de TCR por uma sequência que codifica um ligante peptídico. Em algumas modalidades, o ligante peptídico compreende (G₄S)_n, em que G é glicina, S é serina e n é um número inteiro de 1 a 4.

[0012] Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-MUC16 compreende (a) uma sequência de CDR1 de cadeia pesada (HC) GRTVSSLF, GRAVSSLF ou GDSL DGYV, (b) uma sequência de CDR2 de HC ISRYSLYT ou ISGDGSMR, e (c) uma sequência de CDR3 de HC ASKLEYTSNDYDS ou AADPPTWDY. Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-MUC16 compreende uma sequência com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou 100% de identidade de sequência de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 35 ou SEQ ID NO: 40.

[0013] Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-IL13R α 2 compreende (a) uma sequência CDR1 de cadeia pesada (HC) GFTSDYYI ou GFASDDYI, (b) uma sequência HC CDR2 ISSKYANT ou ISSRYANT, e (c) uma sequência HC CDR3 AADTRRYTCPDIATMHRNFDS ou AMDSRVTCPRISTRNFDS. Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-IL13R α 2 compreende uma sequência com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou 100% de identidade de sequência de SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 71 ou SEQ ID NO: 76. Em algumas modalidades, a identidade de sequência é determinada usando um algoritmo BLAST com um tamanho de palavra de 6, uma matriz BLOSUM62, uma penalidade de existência de 11 e uma penalidade de extensão de 1.

[0014] Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-MSLN compreende uma sequência com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou 100% de identidade de sequência de SEQ ID NO: 97 ou SEQ ID NO: 98. Em algumas modalidades, a

composição farmacêutica é substancialmente livre de soro. Em algumas modalidades, o scFv ou anticorpo de domínio único é um scFv. Em algumas modalidades, o scFv ou anticorpo de domínio único é um anticorpo de domínio único. Em algumas modalidades, o anticorpo de domínio único é um domínio V_H. Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA codificado compreende um domínio de ligação anti-TAA e em que as células T têm maior ou mais atividade citotóxica eficiente do que células T CD8⁺ ou CD4⁺ compreendendo um ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) compreendendo (a) o domínio de ligação anti-TAA, operacionalmente ligado a (b) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de CD28 (c) um domínio transmembrana de CD28 (d) pelo menos uma porção de um domínio intracelular de CD28 e (e) a domínio intracelular CD3 zeta. Em algumas modalidades, a molécula de TFP codificada interage funcionalmente com um complexo de TCR endógeno, pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno ou uma combinação destes quando expresso na célula T. Em algumas modalidades, a célula T é uma célula T primária. Em algumas modalidades, a célula T é uma célula T CD4⁺ humana. Em algumas modalidades, a célula T é uma célula T CD8⁺ humana. Em algumas modalidades, a célula T compreende ainda um ácido nucleico que codifica um primeiro polipeptídeo compreendendo pelo menos uma porção de uma molécula inibidora selecionada do grupo que consiste em PD-1 e BTLA, em que pelo menos uma porção de uma molécula inibidora está associada com um segundo polipeptídeo compreendendo um sinal positivo de um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o segundo polipeptídeo compreende um domínio coestimulador e um domínio de sinalização primário provenientes de uma proteína selecionada do grupo que consiste em CD28, CD27, ICOS, CD3 ζ , 41-BB, OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160 e B7-H3. Em algumas modalidades, a produção de IL-2 ou IFN γ pela célula T é aumentada na presença de uma célula que expressa um antígeno que interage especificamente com o domínio de ligação anti-TAA em comparação com uma célula T que não contém a TFP. Em algumas modalidades, a célula é uma população de células T CD8⁺ ou CD4⁺ humanas, em que uma célula T individual da população compreende pelo menos duas moléculas de TFP, ou pelo menos duas células T da população coletivamente compreendem pelo menos duas

moléculas de TFP; em que as pelo menos duas moléculas de TFP compreendem um domínio de ligação anti-TAA, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular; e em que pelo menos uma das pelo menos duas moléculas de TFP interage funcionalmente com um complexo de TCR endógeno, pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno ou uma combinação destes. Em algumas modalidades, a subunidade de TCR é derivada apenas de CD3 epsilon. Em algumas modalidades, a subunidade de TCR é derivada apenas de CD3 gama. Em algumas modalidades, a subunidade TCR é derivada apenas de CD3 delta.

[0015] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento um método para fornecer uma imunidade antitumoral em um mamífero, compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz de uma população de células T transduzidas com uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma fusão de receptor de células T (TCR) proteína de fusão (TFP) compreendendo (a) uma subunidade de TCR compreendendo (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR e (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador de um domínio de sinalização intracelular de TCR; e (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação ao antígeno que é um domínio de ligação anti-TAA; em que a subunidade TCR e o domínio de anticorpo estão operativamente ligados, em que a TFP incorpora em um TCR quando expresso em uma célula T e em que níveis mais baixos de citocinas são liberados após o tratamento em comparação com os níveis de citocinas de um mamífero tratado com um CAR-T célula compreendendo o mesmo domínio de anticorpo. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular de TCR é derivado de CD3 epsilon ou CD3 gama. Em algumas modalidades, a subunidade de TCR compreende ainda um domínio transmembrana de TCR. Em algumas modalidades, o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR são derivados de uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia delta de TCR, uma cadeia gama de TCR, CD3 epsilon, CD3 gama ou CD3 delta. Em algumas modalidades, o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR são derivados de uma subunidade única de um complexo de TCR, em que a subunidade única é uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia

delta de TCR, uma cadeia gama de TCR, CD3 epsilon, CD3 gama ou CD3 delta.

[0016] Em algumas modalidades, o domínio de anticorpo é um domínio V_{HH} anti-MUC16 com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou 100% de identidade de sequência a uma sequência estabelecida em SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 35 ou SEQ ID NO: 40. Em algumas modalidades, o domínio de anticorpo é um domínio V_{HH} anti-IL13R α 2 com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou 100% de identidade de sequência a uma sequência estabelecida em SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 71 ou SEQ ID NO: 76. Em algumas modalidades, a identidade de sequência é determinada usando um algoritmo BLAST com um tamanho de palavra de 6, uma matriz BLOSUM62, uma penalidade de existência de 11 e uma penalidade de extensão de 1. Em algumas modalidades, a célula é uma célula T autóloga. Em algumas modalidades, a célula é uma célula T alogênica. Em algumas modalidades, o mamífero é um humano.

[0017] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento um método para tratar um mamífero com uma doença associada com a expressão de um tumor associado a antígeno (TAA) (por exemplo, MUC16, IL13R α 2, ou MSLN) compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz de uma população de células T transduzidas com uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma fusão de receptor de células T (TCR) proteína de fusão (TFP) compreendendo (a) uma subunidade de TCR compreendendo (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR e (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador de um domínio de sinalização intracelular de CD3 epsilon ou CD3 gama; e (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação ao antígeno que é um domínio de ligação anti-TAA; em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operativamente ligados, em que a TFP incorpora em um TCR quando expresso em uma célula T e em que níveis mais baixos de citocinas são liberados após o tratamento em comparação com os níveis de citocinas de um mamífero tratado com uma célula CAR-T compreendendo o mesmo domínio de anticorpo.

[0018] Em algumas modalidades, o domínio de anticorpo é um domínio V_{HH}

com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou 100% de identidade de sequência com uma sequência estabelecido na SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 35 ou SEQ ID NO: 40. Em algumas modalidades, o domínio do anticorpo é um domínio V_{HH} com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou 100% de identidade de sequência com uma sequência estabelecido na SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 71 ou SEQ ID NO: 76. Em algumas modalidades, a identidade de sequência é determinada usando um algoritmo BLAST com um tamanho de palavra de 6, uma matriz BLOSUM62, uma penalidade de existência de 11 e uma penalidade de extensão de 1. Em algumas modalidades, a célula é uma célula T autóloga. Em algumas modalidades, a célula é uma célula T alogênica. Em algumas modalidades, a doença associada à expressão do TAA é selecionada do grupo que consiste em uma doença proliferativa, um câncer, uma malignidade e uma indicação não relacionada ao câncer associada à expressão do TAA, por exemplo, MUC16, IL13R α 2 ou MSLN. Em algumas modalidades, a doença é um câncer selecionado do grupo que consiste em glioblastoma, mesotelioma, carcinoma de células renais, câncer de estômago, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer cervical, câncer cerebral, câncer de fígado, câncer pancreático, câncer de tireoide, câncer de bexiga, câncer de ureter, câncer de rim, câncer do endométrio, câncer de esôfago, câncer gástrico, carcinoma tímico, colangiocarcinoma, câncer de estômago e qualquer combinação destes. Em algumas modalidades, a doença é um câncer selecionado do grupo que consiste em glioblastoma, mesotelioma, adenocarcinoma papilífero seroso de ovário, carcinoma de células claras de ovário, carcinoma de ovário de Muller misto, carcinoma de ovário endométrioide mucinoso, adenocarcinoma pancreático, carcinoma uterino seroso, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma ductal biliar extra-hepático, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma esofágico, adenocarcinoma colorretal, adenocarcinoma de mama, uma doença associada à expressão de MUC16, uma doença associada à expressão IL13R α 2, uma doença associada à expressão de MSLN e qualquer combinação destes. Em algumas modalidades, as células que expressam uma molécula de TFP são administradas em combinação com um agente que aumenta

a eficácia de uma célula que expressa uma molécula de TFP. Em algumas modalidades, para uma determinada citocina, pelo menos 10% menos quantidade da citocina dada é liberada após o tratamento em comparação com uma quantidade da citocina dada de um mamífero tratado com uma célula CAR-T compreendendo o mesmo domínio de anticorpo. Em algumas modalidades, a dada citocina compreende uma ou mais citocinas selecionadas do grupo consistindo em IL-2, IFN- γ , IL-4, TNF- α , IL-6, IL-13, IL-5, IL-10, sCD137, GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , e qualquer combinação destes. Em algumas modalidades, o crescimento de um tumor no mamífero é inibido de modo que um tamanho do tumor seja no máximo 10%, no máximo 20%, no máximo 30%, no máximo 40%, no máximo 50% ou no máximo 60% de um tamanho de um tumor em um mamífero tratado com células T que não expressam a TFP após pelo menos 8 dias de tratamento, em que o mamífero tratado com células T que expressam TFP e o mamífero tratado com células T que não expressam a TFP têm o mesmo tamanho do tumor antes do tratamento. Em algumas modalidades, o crescimento do tumor no mamífero é completamente inibido. Em algumas modalidades, o crescimento tumoral no mamífero é completamente inibido por pelo menos 20 dias, pelo menos 30 dias, pelo menos 40 dias, pelo menos 50 dias, pelo menos 60 dias, pelo menos 70 dias, pelo menos 80 dias, pelo menos 90 dias, pelo menos 100 dias, ou mais. Em algumas modalidades, a população de células T transduzidas com TFP mata uma quantidade semelhante de células tumorais em comparação com as células CAR-T que compreendem o mesmo domínio de anticorpo. Em algumas modalidades, a população de células T transduzidas com a TFP tem um perfil de expressão gênica diferente das células CAR-T que compreendem o mesmo domínio de anticorpo. Em algumas modalidades, um nível de expressão de um gene é diferente nas células T transduzidas com a TFP do que um nível de expressão do gene nas células CAR-T compreendendo o mesmo domínio de anticorpo. Em algumas modalidades, o gene tem uma função na apresentação do antígeno, sinalização de TCR, homeostase, metabolismo, sinalização de quimiocina, sinalização de citocina, sinalização do receptor tipo toll, sinalização de MMP e molécula de adesão ou sinalização relacionada ao TNFR.

[0019] De acordo com um aspecto, é fornecida neste documento uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de fusão (TFP)

de receptor de células T (TCR) compreendendo (a) uma subunidade de TCR compreendendo (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR e (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador de um domínio de sinalização intracelular de CD3 epsilon; e (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-TAA; em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operativamente ligados, e em que a TFP se incorpora em um TCR quando expressa em uma célula T.

[0020] De acordo com um aspecto, é fornecida neste documento uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de células T (TCR) compreendendo (a) uma subunidade de TCR compreendendo (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR e (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador de um domínio de sinalização intracelular de CD3 gama; e (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-TAA em que a subunidade TCR e o domínio de anticorpo estão operativamente ligados, e em que a TFP se incorpora em um TCR quando expressa em uma célula T.

[0021] De acordo com um aspecto, é fornecida neste documento uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de células T (TCR) compreendendo (a) uma subunidade de TCR compreendendo (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR e (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador de um domínio de sinalização intracelular de CD3 delta; e (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-TAA; em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operativamente ligados, e em que a TFP se incorpora em um TCR quando expressa em uma célula T.

[0022] De acordo com um aspecto, é fornecida neste documento uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de células T (TCR) compreendendo (a) uma subunidade de TCR compreendendo (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR e (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador de um domínio de sinalização intracelular de TCR alfa; e (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-TAA; em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operativamente ligados, e em que a TFP se incorpora

em um TCR quando expressa em uma célula T.

[0023] De acordo com um aspecto, é fornecida neste documento uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de células T (TCR) compreendendo (a) uma subunidade de TCR compreendendo (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR e (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador de um domínio de sinalização intracelular de TCR beta; e (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-TAA; em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operativamente ligados, e em que a TFP se incorpora em um TCR quando expressa em uma célula T.

[0024] Em algumas modalidades, o domínio de anticorpo é um domínio de anticorpo humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o domínio de ligação a antígeno codificado está ligado ao domínio extracelular de TCR por uma sequência de ligante peptídico. Em algumas modalidades, a sequência de ligante peptídico codificada compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 1$ a 4. Em algumas modalidades, a subunidade TCR compreende um domínio extracelular de TCR. Em algumas modalidades, a subunidade de TCR compreende um domínio transmembrana de TCR. Em algumas modalidades, a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular de TCR. Em algumas modalidades, a subunidade de TCR compreende (i) um domínio extracelular de TCR, (ii) um domínio transmembrana de TCR e (iii) um domínio intracelular de TCR, em que pelo menos dois dentre (i), (ii) e (iii) são da mesma subunidade de TCR. Em algumas modalidades, a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador selecionado de um domínio de sinalização intracelular de CD3 epsilon, CD3 gama ou CD3 delta, ou uma sequência de aminoácidos com pelo menos uma modificação nesta. Em algumas modalidades, a subunidade TCR compreende um domínio intracelular compreendendo um domínio estimulador selecionado a partir de um domínio de sinalização funcional de 4-1BB e/ou um domínio de sinalização funcional de CD3 zeta ou uma sequência de aminoácido com pelo menos uma modificação nela. Em algumas modalidades, o domínio de anticorpo compreende um fragmento de anticorpo. Em algumas modalidades, o domínio do anticorpo compreende um scFv ou um domínio V_H .

[0025] Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico recombinante codifica (a) uma sequência de CDR1 de cadeia pesada (HC) GRTVSSLF, GRAVSSLF ou GDSL DGYV, (b) uma sequência de CDR2 de HC ISRYSLYT ou ISGDGSMR, e (c) uma sequência de CDR3 de HC ASKLEYTSNDYDS, ou AADPPTWDY. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico recombinante codifica (a) uma sequência de CDR1 de cadeia pesada (HC) GFTSDYYI ou GFASDDYI, (b) uma sequência de CDR2 de HC ISSKYANT ou ISSRYANT, e (c) uma sequência de CDR3 de HC AADTRRYTCPDIATMHRNFDS ou AMDSRRVTCPEISTMHRNFDS. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico isolada codifica um domínio variável de cadeia pesada com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou 100% da sequência identidade com uma sequência estabelecida em SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 35 ou SEQ ID NO: 40. Em algumas modalidades, o domínio do anticorpo é um domínio V_{HH} com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou 100% de identidade de sequência com uma sequência estabelecido na SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 71 ou SEQ ID NO: 76. Em algumas modalidades, a identidade de sequência é determinada usando um algoritmo BLAST com um tamanho de palavra de 6, uma matriz BLOSUM62, uma penalidade de existência de 11 e uma penalidade de extensão de 1. Em algumas modalidades, a TFP inclui um domínio extracelular de uma subunidade de TCR que compreende um domínio extracelular ou porção deste de uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste em uma cadeia TCR alfa, uma cadeia TCR beta, uma subunidade TCR CD3 epsilon, uma subunidade CD3 gama TCR, uma subunidade CD3 delta TCR, fragmentos funcionais destes, sequências de aminoácidos destas tendo pelo menos uma, mas não mais do que 20 modificações. Em algumas modalidades, a TFP codificada inclui um domínio transmembrana que compreende um domínio transmembrana de uma proteína selecionada do grupo que consiste em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 epsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, fragmentos funcionais destas, e sequências de aminoácidos das mesmas tendo pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações. Em algumas

modalidades, a TFP codificada inclui um domínio transmembrana que compreende um domínio transmembrana de uma proteína selecionada do grupo que consiste em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia zeta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 epsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, fragmentos funcionais das mesmas, e sequências de aminoácidos das mesmas tendo pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações.

[0026] Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico recombinante compreende ainda uma sequência que codifica um domínio co-estimulador. Em algumas modalidades, o domínio co-estimulador é um domínio de sinalização funcional obtido a partir de uma proteína selecionada do grupo que consiste em OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) e 4-1BB (CD137), e sequências de aminoácidos dos mesmos tendo pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações. Em algumas modalidades, pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações nas mesmas compreendem uma modificação de um aminoácido que medeia a sinalização celular ou uma modificação de um aminoácido que é fosforilado em resposta a um ligante que se liga à TFP. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico isolada é mRNA. Em algumas modalidades, a TFP inclui um motivo de ativação baseado em imunorreceptor de tirosina (ITAM) de uma subunidade de TCR que compreende um ITAM ou uma porção deste de uma proteína selecionada do grupo que consiste em subunidade de TCR CD3 zeta, subunidade de TCR CD3 epsilon, subunidade de TCR CD3 gama, subunidade TCR CD3 delta, cadeia TCR zeta, cadeia de receptor 1 de Fc epsilon, cadeia de receptor 2 de Fc epsilon, cadeia de receptor 1 de Fc gama, cadeia de receptor 2a de Fc gama, cadeia de receptor 2b1 de Fc gama, cadeia de receptor 2b2 de Fc gama, cadeia de receptor 3a de Fc gama, cadeia de receptor 3b de Fc gama, cadeia de receptor 1 de Fc beta, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, fragmentos funcionais destes e sequências de aminoácidos destes possuindo pelo menos uma mas não mais de 20 modificações a elas. Em algumas modalidades, o ITAM substitui um ITAM de CD3 gama, CD3 delta ou CD3 epsilon. Em algumas modalidades, o ITAM é selecionado do grupo que consiste em subunidade de TCR

de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 epsilon, subunidade de TCR de CD3 gama e subunidade de TCR de CD3 delta e substitui um ITAM diferente selecionado do grupo que consiste na subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 epsilon, subunidade de TCR de CD3 gama e subunidade de TCR de CD3 delta. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende um análogo de nucleotídeo. Em algumas modalidades, o análogo de nucleotídeo é selecionado do grupo que consiste em 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil, 2'-desoxi, T-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropil (2'-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietil (2'-O-DMAEOE), 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA) modificado, um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido nucleico de etileno (ENA), um ácido nucleico peptídico (PNA), um ácido nucleico de 1',5'-anidrohexitol (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo de tiolfosfonato e uma 2'-fluoro N3-P5'-fosforamidita. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico recombinante compreende ainda uma sequência líder.

[0027] De acordo com um aspecto, é fornecida neste documento uma molécula polipeptídica recombinante codificada pela molécula de ácido nucleico recombinante descrita neste documento.

[0028] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento uma molécula de TFP recombinante compreendendo um domínio de ligação anti-TAA (por exemplo, um domínio de ligação MUC16, IL13Ra2 ou MSLN), um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular.

[0029] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento uma molécula de TFP recombinante compreendendo um domínio de ligação anti-TAA, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno.

[0030] De acordo com um aspecto, é fornecida neste documento uma molécula de TFP recombinante compreendendo um domínio de ligação anti-TAA, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de integrar funcionalmente em um complexo de TCR endógeno.

[0031] Em algumas modalidades, a molécula de TFP recombinante compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo compreendendo um anti-MUC16, um anti-IL13R α 2 ou um domínio de ligação anti-MSLN, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular.

[0032] Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA é um scFv ou um domínio V_{HH} ou V_H.

[0033] Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA compreende uma cadeia pesada com 95-100% de identidade com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 35, ou SEQ ID NO: 40, um fragmento funcional deste, ou uma sequência de aminoácidos deste tendo pelo menos uma, mas não mais do que 30 modificações. Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA compreende uma cadeia pesada com 95-100% de identidade com uma sequência de aminoácidos de NO: 51, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 71, ou SEQ ID NO: 76, um fragmento funcional deste, ou uma sequência de aminoácidos deste tendo pelo menos uma, mas não mais do que 30 modificações.

[0034] Em algumas modalidades, a identidade de sequência é determinada usando um algoritmo BLAST com um tamanho de palavra de 6, uma matriz BLOSUM62, uma penalidade de existência de 11 e uma penalidade de extensão de 1.

[0035] Em algumas modalidades, a molécula de TFP recombinante compreende um domínio extracelular de TCR que compreende um domínio extracelular ou porção deste de uma proteína selecionada do grupo que consiste em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 epsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, fragmentos funcionais destes e sequências de aminoácidos destes tendo pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações. Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA codificado está ligado ao domínio extracelular de TCR por uma sequência de ligante peptídico. Em algumas modalidades, a região de ligante peptídico compreende (G₄S)_n, em que n = 1 a 4.

[0036] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento um ácido nucleico que compreende uma sequência que codifica um TFP.

[0037] Em algumas modalidades, o ácido nucleico é selecionado do grupo

que consiste em um DNA e um RNA. Em algumas modalidades, o ácido nucleico é um mRNA. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende um análogo de nucleotídeo. Em algumas modalidades, o análogo de nucleotídeo é selecionado do grupo que consiste em 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil, 2'-desoxi, T-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropil (2'-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietil (2'-O-DMAEOE), 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA) modificado, um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido nucleico de etileno (ENA), um ácido nucleico peptídico (PNA), um ácido nucleico de 1',5'-anidrohexitol (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo de tiolfosfonato e uma 2'-fluoro N3-P5'-fosforamidita. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende ainda um promotor. Em algumas modalidades, o ácido nucleico é um ácido nucleico transcrito *in vitro*. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende ainda uma sequência que codifica uma cauda poli (A). Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende ainda uma sequência 3'UTR.

[0038] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento um vetor que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica um TFP.

[0039] Em algumas modalidades, o vetor é selecionado do grupo que consiste em um DNA, um RNA, um plasmídeo, um vetor de lentivírus, um vetor adenoviral, um vetor do vírus do sarcoma de Rous (RSV), ou um vetor de retrovírus. Em algumas modalidades, o vetor compreende ainda um promotor. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor transcrito *in vitro*. Em algumas modalidades, uma sequência de ácido nucleico no vetor compreende ainda uma cauda poli(A). Em algumas modalidades, uma sequência de ácido nucleico no vetor compreende ainda uma 3'UTR.

[0040] Em algumas modalidades, é fornecida neste documento uma célula que compreende a molécula de ácido nucleico recombinante descrita neste documento. Em algumas modalidades, é fornecida neste documento uma molécula de polipeptídeo. Em algumas modalidades, é fornecida neste documento uma molécula de TFP. Em algumas modalidades, é fornecido neste documento um ácido nucleico. Em algumas modalidades, é fornecido neste documento um vetor. Em algumas modalidades, a célula é uma célula T humana. Em algumas modalidades, a célula T é uma célula T CD8+ ou CD4+ ou uma célula T CD4+

CD8+. Em algumas modalidades, a célula T é uma célula T gama delta. Em algumas modalidades, a célula compreende ainda um ácido nucleico que codifica uma molécula inibitória que compreende um primeiro polipeptídeo que compreende pelo menos uma porção de uma molécula inibidora, associada a um segundo polipeptídeo que compreende um sinal positivo a partir de um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, a molécula inibitória compreende um primeiro polipeptídeo que compreende pelo menos uma porção de PD1 e um segundo polipeptídeo que compreende um domínio co-estimulador e domínio de sinalização primário.

[0041] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento uma célula T CD8+ ou CD4+ humana que compreende pelo menos duas moléculas de TFP, com as moléculas de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-TAA, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno em e/ou sobre a superfície da célula T CD8+ ou CD4+.

[0042] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento um complexo de proteína compreendendo: (a) uma molécula de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-TAA, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular; e (b) pelo menos uma subunidade de TCR endógeno ou complexo de TCR endógeno.

[0043] Em algumas modalidades, o TCR compreende um domínio extracelular ou uma porção deste de uma proteína selecionada do grupo que consiste em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 epsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama e uma subunidade de TCR de CD3 delta. Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA codificado está ligado ao domínio extracelular de TCR por uma sequência de ligante peptídico. Em algumas modalidades, a região de ligante peptídico compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 1$ a 4.

[0044] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento um complexo de proteína que compreende (a) uma TFP codificado por qualquer uma das moléculas de ácido nucleico recombinante divulgadas neste documento e (b) pelo menos uma subunidade de TCR endógena ou complexo de TCR endógeno.

[0045] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento um complexo de proteína compreendendo: (a) uma molécula de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-TAA, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular; e (b) pelo menos uma subunidade de TCR endógeno ou complexo de TCR endógeno.

[0046] Em algumas modalidades, o TCR compreende um domínio extracelular ou uma porção deste de uma proteína selecionada do grupo que consiste em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 epsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama e uma subunidade de TCR de CD3 delta. Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA codificado está ligado ao domínio extracelular de TCR por uma sequência de ligante peptídico. Em algumas modalidades, a região de ligante peptídico compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 1$ a 4.

[0047] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento uma célula T CD8+ ou CD4+ humana compreendendo pelo menos duas proteínas TFP diferentes por complexo de proteína.

[0048] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento uma célula T CD8+ ou CD4+ humana compreendendo pelo menos duas moléculas de TFP diferentes codificadas pelas moléculas de ácido nucleico isoladas descritas neste documento.

[0049] De acordo com um aspecto, é fornecida neste documento uma população de células T CD8+ ou CD4+ em que as células T da população compreendem, individual ou coletivamente, pelo menos duas moléculas de TFP, com as moléculas de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-TAA, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno em e/ou sobre a superfície da célula T CD8+ ou CD4+.

[0050] De acordo com um aspecto, é fornecida neste documento uma população de células T CD8+ ou CD4+ humanas, em que as células T da população individual ou coletivamente compreendem pelo menos duas moléculas de TFP codificadas pela molécula de ácido nucleico recombinante descrita neste documento.

[0051] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento um método de produção de uma célula que compreende a transdução de uma célula T com a molécula de ácido nucleico recombinante descrita neste documento, o ácido nucleico descrito neste documento ou o vetor descrito neste documento.

[0052] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento um método para gerar uma população de células com RNA manipulado que compreende a introdução de um RNA transcrito *in vitro* ou RNA sintético em uma célula, em que o RNA compreende um ácido nucleico que codifica a molécula de TFP descrita neste documento.

[0053] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento um método para fornecer uma imunidade antitumoral em um mamífero, compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz da molécula de ácido nucleico recombinante descrita neste documento, a molécula de polipeptídeo descrita neste documento, uma célula que expressa a molécula de polipeptídeo descrita neste documento, a molécula de TFP descrita neste documento, o ácido nucleico descrito neste documento, o vetor descrito neste documento ou a célula descrita neste documento. Em algumas modalidades, a célula é uma célula T autóloga. Em algumas modalidades, a célula é uma célula T alogênica. Em algumas modalidades, o mamífero é um humano.

[0054] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento um método de tratamento de um mamífero com uma doença associada à expressão de MUC16, IL13R α 2 ou MSLN compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz da molécula de ácido nucleico isolada, a molécula de polipeptídeo descrita neste documento, uma célula expressando a molécula de polipeptídeo, a molécula de TFP descrita neste documento, o ácido nucleico, o vetor ou a célula descrita neste documento. Em algumas modalidades, a doença associada à expressão de MUC16, IL13R α 2, ou MSLN é selecionada do grupo que consiste em uma doença proliferativa, um câncer, uma malignidade, mielodisplasia, uma síndrome mielodisplásica, uma pré-leucemia, uma indicação não relacionada a câncer associada à expressão de MUC16, IL13R α 2 ou MSLN. Em algumas modalidades, a doença é câncer pancreático, câncer de ovário, câncer de mama ou qualquer combinação destes. Em algumas modalidades, as células que expressam uma molécula de TFP são administradas em combinação com um

agente que aumenta a eficácia de uma célula que expressa uma molécula de TFP. Em algumas modalidades, menos citocinas são liberadas no mamífero em comparação a um mamífero administrado com uma quantidade eficaz de uma célula T que expressa um receptor de antígeno quimérico anti-TAA (CAR). Em algumas modalidades, as células que expressam uma molécula de TFP são administradas em combinação com um agente que melhora um ou mais efeitos colaterais associados à administração de uma célula que expressa uma molécula de TFP. Em algumas modalidades, as células que expressam uma molécula de TFP são administradas em combinação com um agente que trata a doença associada ao TAA, por exemplo, MUC16, IL13R α 2 ou MSLN. Em algumas modalidades, a molécula de polipeptídeo, uma célula que expressa a molécula de polipeptídeo, a TFP recombinante, o ácido nucleico, o vetor, o complexo ou a célula, para uso como um medicamento.

[0055] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma TFP, uma molécula polipeptídica de uma TFP, uma célula que expressa a molécula polipeptídica de uma TFP, uma TFP recombinante, um ácido nucleico que codifica uma TFP, um vetor que compreende um ácido que codifica um TFP, um complexo de proteína ou uma célula, para uso como um medicamento. De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento um método de tratamento de um mamífero com uma doença associada à expressão de MUC16, IL13R α 2 ou MSLN compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz da molécula de ácido nucleico recombinante, a molécula de polipeptídeo, uma célula que expressa o molécula de polipeptídeo, a molécula de TFP recombinante, o ácido nucleico, o vetor ou a célula, em que menos citocinas são liberadas no mamífero em comparação a um mamífero administrado com uma quantidade eficaz de uma célula T que expressa um receptor de antígeno quimérico anti-TAA (CAR).

[0056] De acordo com um aspecto, é fornecida neste documento uma composição farmacêutica que compreende (I) uma célula T de um sujeito humano, em que a célula T compreende uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de fusão (TFP) de receptor de célula T (TCR) compreendendo (a) uma subunidade de TCR compreendendo (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, (ii) um domínio transmembrana de

TCR, e (iii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador de um domínio de sinalização intracelular; e (b) um domínio de ligação ao antígeno compreendendo um domínio de ligação anti-IL13R α 2; e (II) um carreador farmacologicamente aceitável; em que a subunidade TCR e o domínio de ligação anti-IL13R α 2 estão operativamente ligados; em que a TFP interage funcionalmente com um TCR quando expressa na célula T. Em algumas modalidades, o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR da subunidade de TCR são derivados de uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3 epsilon, CD3 delta ou CD3 gama. Em algumas modalidades, o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR da subunidade de TCR são derivados de uma subunidade única de um complexo de TCR, em que a subunidade única é uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3 epsilon, CD3 gama ou CD3 delta. Em algumas modalidades, a célula T exibe citotoxicidade aumentada para uma célula que expressa um antígeno que interage especificamente com o domínio de ligação anti-IL13R α 2 em comparação com uma célula T que não contém a TFP.

[0057] De acordo com um aspecto, é fornecido neste documento um método para fornecer uma imunidade antitumoral em um mamífero, compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz de uma população de células T transduzidas com uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica um receptor de células T (TCR) proteína de fusão (TFP) compreendendo uma subunidade de TCR compreendendo pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR e um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador de um domínio de sinalização intracelular; e um domínio de anticorpo humano ou humanizado compreendendo um domínio de ligação ao antígeno que é um domínio de ligação anti-mesotelina; em que a subunidade de TCR e o domínio do anticorpo estão operativamente ligados, em que a TFP se incorpora em um TCR quando expresso em uma célula T, e em que a população de células T mata preferencialmente as células tumorais com maior expressão de mesotelina comparativamente com células tumorais com menor expressão de mesotelina.

[0058] Em algumas modalidades, a subunidade de TCR compreende ainda

um domínio transmembrana de TCR. Em algumas modalidades, o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR são derivados de uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3 epsilon, CD3 gama ou CD3 delta. Em algumas modalidades, o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR da subunidade de TCR são derivados de uma subunidade única de um complexo de TCR, em que a subunidade única é uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3 epsilon, CD3 gama ou CD3 delta. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular de TCR é derivado de CD3 epsilon ou CD3 gama.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[0059] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados neste relatório descritivo são incorporados neste documento por referência na mesma medida como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse indicada específica e individualmente para ser incorporada por referência.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0060] O arquivo de pedido ou patente contém pelo menos uma figura executada em cor. As cópias desta patente ou publicação de pedido de patente com figura(s) colorida(s) serão fornecidas pelo Escritório mediante a solicitação e pagamento da taxa necessária. As características inovadoras da invenção são apresentadas com particularidade nas reivindicações anexas. Uma melhor compreensão das características e vantagens da presente invenção será obtida por referência à seguinte descrição detalhada que estabelece modalidades ilustrativas, nas quais os princípios da invenção são utilizados, e as figuras anexas das quais:

[0061] A **Figura 1** representa exemplos de sequências do clone IL13R α 2.

[0062] A **Figura 2** é um diagrama que ilustra a maneira como o ensaio de binning (seleção) de epítomos Pall Forte Bio Dip & Read AHC foi realizado. A ponta do biossensor AHC foi acoplada ao anticorpo 4H11 scFv-Fc (4H11) através do domínio Fc que foi então ligado ao peptídeo de antígeno ("Ag", por exemplo, MUC16, IL13R α 2, MSLN) através de seu domínio Fv. Os sdAbs (Ab2) foram então adicionados a 100 nM cada para avaliar a competição para ligação ao antígeno com o anticorpo 4H11 scFv-Fc.

[0063] A **Figura 3A** representa dados de um ensaio de lise de células tumorais testando a atividade *in vitro* de nanocorpos anti-IL13R α 2.

[0064] A **Figura 3B** representa dados experimentais que mostram a capacidade das células T TFP de induzir a produção de IFN γ e IL-2.

[0065] A **Figura 3C** representa dados experimentais de um ensaio de lise de células tumorais testando a atividade *in vitro* de nanocorpos anti-IL13R α 2.

[0066] A **Figura 3D** representa dados experimentais que mostram a capacidade das células T TFP de induzir a produção de IFN γ e IL-2.

[0067] A **Figura 3E** representa dados experimentais de um ensaio de lise de células tumorais testando a atividade *in vitro* de nanocorpos anti-IL13R α 2.

[0068] A **Figura 3F** representa dados experimentais que mostram a capacidade das células T TFP de induzir a produção de IFN γ e IL-2.

[0069] A **Figura 4** representa dados experimentais de um modelo IL13R α 2 U251 GBM testando a eficácia de células T IL13R α 2-TFP. O gráfico mostra os volumes médios do tumor medidos pelo compasso ao longo do tempo após a injeção subcutânea de 5×10^6 células U251 em camundongos NSG seguida por administração intravenosa de 1×10^7 células T IL13R α 2-TFP 4 dias depois.

[0070] As **Figuras 5A-C** mostram a titulação e a medição da afinidade de ligação do anticorpo de origem (lhama) e humanizado anti-MUC16 de cadeia única (V_{HH}). A **Figura 5A** é um diagrama que ilustra o procedimento experimental pelo qual os ligantes V_{HH} produzidos no Exemplo 5 são rastreados usando um biossensor NTA (superfície revestida com níquel). Os sdAbs MUC16 marcados com His (3,25 μ g/ml) são ligados ao biossensor e o peptídeo MUC16 é adicionado em concentrações de 0, 1,56, 6,25, 25, 50, 100 ou 200 nM. Tampão: 1X Octeto; 1x Corning® Cellgro® PBS (cat. 21-040-CM) contendo 0,02% de Tween® 20 a 30 °C. Sensores: Pall Forte Bio Dip & Read (cat. 18-5102). A **Figura 5B** (variantes de origem e humanizadas do clone R3Mu4) e a **Figura 5C** (variantes de origem e humanizadas do clone R3Mu29) mostram a cinética de ligação dos sdAbs ao alvo MUC16 (ver também Tabela 1). Essas curvas foram usadas para derivar a constante de afinidade de ligação para cada proteína e para avaliar o efeito da humanização na ligação ao antígeno.

[0071] As **Figuras 6A-C** mostram o binning de epítipo dos sdAbs anti-MUC16 em comparação com o aglutinante de ferramenta scFv-Fc específico de

MUC-16 4H11 usado como um controle positivo. A **Figura 6A** é um diagrama que ilustra a maneira como o ensaio de binning de epítomos Pall Forte Bio Dip & Read AHC foi realizado conforme mostrado na Figura 2 para ligantes IL13R α 2. A ponta do biossensor AHC foi acoplada ao anticorpo 4H11 scFv-Fc (4H11) através do domínio Fc que foi então ligado ao peptídeo do antígeno MUC16 (Ag) através do seu domínio Fv. Os sdAbs (Ab2) foram então adicionados a 100 nM cada para avaliar a competição para ligação ao antígeno MUC16 com o anticorpo 4H11 scFv-Fc. Conforme mostrado na **Figura 6B**, o MUC16 sdAbs - de origem (lhama) R3Mu4 e R3Mu29 de origem (lhama) mostram ligação ao peptídeo MUC16 após o aglutinante de ferramenta 4H11 já ter se ligado a ele, demonstrando que os sdAbs de origem reconhecem e caracterizam a um epítipo diferente de peptídeo MUC16 em comparação com o aglutinante de ferramenta 4H11 scFv-Fc. O controle negativo sem antígeno (peptídeo MUC16) não mostra ligação, descartando qualquer chance de ligação não específica. A **Figura 6C** representa epítomos de anticorpos relevantes no contexto da sequência do ectodomínio MUC16.

[0072] A **Figura 7** mostra gráficos de lise dependente da dose de MUC16-ectodomínio ("MUC16^{ecto}") que expressa células por células T que expressam uma proteína de fusão (TFP) de receptor de células T (TCR) que compreende uma subunidade de TCR e um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-MUC16. As células T mataram especificamente as células de câncer de ovário SKOV3-MUC16Cterm que foram transduzidas para superexpressar uma forma de MUC16 associada a uma célula C-terminal de uma forma dependente da dose, enquanto as células de origem SKOV3 negativas para MUC16 foram poupadas da morte mediada por células T. Da mesma forma, as células T que expressam o MUC16-TFP eliminaram as células OVCAR3-MUC16-Cterm que superexpressaram a forma associada à célula de MUC16. As células OVCAR3 de origem que expressam níveis baixos de MUC16 foram mortas apenas na proporção mais alta de células TFP-T para células-alvo. Da mesma forma, as células TFP-T somente liberaram citocinas quando o MUC16 estava presente nas células alvo, o que suporta a especificidade do anticorpo de domínio único.

[0073] A **Figura 8** representa dados experimentais de exemplo que mostram a potência de MUC16-TFP em ensaios celulares usando linhagens de células ovarianas que expressam níveis altos e baixos de MUC16. Nestes estudos,

observou-se que MUC16-TFP tem habilidades de morte preferenciais, dependendo do nível de MUC16 na superfície da célula tumoral. Mais precisamente, foi observado que MUC16-TFP mata células tumorais que expressam MUC16 alto de um modo dependente da dose, enquanto a morte de MUC16-TFP de células que expressam MUC16 baixo não foi observada nos níveis de dose usados nesses ensaios.

[0074] As **Figuras 9A-B** representam os resultados da quantificação do número de cópias MUC16^{ecto} baseada em citometria de fluxo. As células tumorais coradas com anticorpo 4H11-PE foram executadas em Fortessa® X-20 juntamente com as esferas Quantibrite. A intensidade fluorescente média geométrica (gMFI) foi calculada para as células, bem como para os grânulos (**Figura 9A**). O estoque de grânulos contém 4 populações fabricadas para ter um número diferente de moléculas de PE por grânulo (alto, moderado, baixo, negativo). Uma curva padrão foi gerada com base nas cópias fornecidas de moléculas de PE por grânulo versus o MFI medido para cada conjunto de grânulos. O número de cópias de MUC16^{ecto} em células tumorais foi então estimado com base na curva padrão gerada por grânulos. As cópias de MUC16^{ecto} nas células OVCAR3, OVCAR3-MUC16^{ecto}, SKOV3 e SKOV3-MUC16^{ecto} foram determinadas como 726, 3616, 39 e 2351, respectivamente (**Figura 9B**).

[0075] As **Figuras 10A-D** mostram uma série de gráficos que mostram a lise de células tumorais específicas de MUC16^{ecto} por células MUC16 TFP-T. As células T que expressam MUC16 TFPs mataram especificamente células SKOV3-MUC16^{ecto} que superexpressaram a forma associada a células de MUC16 (**Figura 10A**), enquanto as células SKOV3 de origem não foram mortas por células T que expressam MUC16 TFPs (**Figura 10B**). Da mesma forma, as células T que expressam MUC16 TFPs eliminaram as células OVCAR3-MUC16^{ecto} que superexpressaram a forma associada a células de MUC16 (**Figura 10C**). As células OVCAR3 de origem que expressam níveis baixos de MUC16^{ecto} foram apenas parcialmente mortas (**Figura 10D**).

[0076] As **Figuras 11A-H** mostram uma série de gráficos que mostram a produção de citocinas específicas de MUC16^{ecto} por células MUC16 TFP-T. As células T que expressam MUC16 TFPs secretaram IFN- γ e IL-2 quando cocultivadas com células SKOV3-MUC16^{ecto} (**Figura 11A e 11E**, respectivamente) ou

células OVCAR3-MUC16^{ecto} (**Figura 11C** e **11G**, respectivamente), mas não com células SKOV3 (**Figura 11B** e **11F**, respectivamente) ou células OVCAR3 (**Figura 11D** e **11H**, respectivamente).

[0077] A **Figura 12** representa a proliferação específica de MUC16^{ecto} de células T que expressam MUC16-TFPs. A proliferação específica de MUC16^{ecto} de células T MUC16-TFP foi determinada monitorando a diluição do sinal de rastreamento de células T (diminuição na intensidade do sinal de CellTrace™) por análise de citometria de fluxo. As células T que expressam MUC16-TFPs foram marcadas com CellTrace™ Far Red Proliferation Kit (Cat. nº C34564ThermoFisher), depois co-cultivadas com células SKOV3 ou SKOV3-MUC16^{ecto} na proporção de 1 para 1 por 3 dias. As células T que expressam MUC16-TFPs marcadas com o kit CellTrace Far Red Proliferation também foram estimuladas com meio sozinho ou com 1 µg/mL de anticorpo anti-CD3 ligado à placa (clone OKT-3, Cat nº 14-0037-82, Invitrogen) para 3 dias. As células T que expressam MUC16-TFPs mostraram proliferação específica de MUC16^{ecto}, demonstrada pela diminuição do sinal CellTrace quando co-cultivadas com células SKOV3-MUC16^{ecto}, mas não células SKOV3 (**Figura 12**).

[0078] A **Figura 13A-C** representa uma série de gráficos que mostram a atividade *in vivo* de células T MUC16-TFP. As células T que expressam MUC16-TFPs foram avaliadas em modelos de xenoenxerto de camundongo NSG de linhagens de células de carcinoma de ovário humano, células SKOV3-MUC16^{ecto} e células OVCAR3-MUC16^{ecto}. No modelo intraperitoneal de células SKOV3-MUC16^{ecto}, MUC16 TFP 1 mostrou diminuição significativa da carga tumoral em comparação com o nível da linha de base no dia 0 (dia da injeção de células T) (**Figura 13A**). De forma consistente, MUC16 TFP1 atrasou significativamente o crescimento do tumor em modelos subcutâneos de células SKOV3-MUC16^{ecto}, quando comparado com células T NT (**Figura 13B**). No modelo intraperitoneal de células OVCAR3-MUC16^{ecto}, MUC16 TFP1 e MUC16 TFP2 completaram o tumor eliminado dos camundongos (**Figura 13C**).

[0079] A **Figura 14A-B** são dois gráficos que mostram a capacidade diferencial de morte de células T MSLN-TFP contra MSLN alto (MSTO-MSLN_{alto}, 11006 cópias de MSLN de superfície) e tumores MSLN baixo (MSTO-MSLN_{baixo}, 198 cópias MSLN de superfície) em camundongos NSG carregando tumores

MSTO-MSLNalto ou MSTO-MSLNbaixo. Camundongos com tumor foram injetados por via intravenosa com células T não transduzidas (NT, 1×10^7 células T totais) ou células T MSLN-TFP (1×10^7 células T totais). As células T MSLN-TFP controlaram dramaticamente o crescimento de tumores elevados MSLN, em comparação com camundongos tratados com células T NT (**Figura 14A**). Por outro lado, a resposta antitumoral limitada foi observada em camundongos tratados com células T MSLN-TFP com tumores MSLN baixos (**Figura 14B**).

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0080] São descritas neste documento novas proteínas de fusão de subunidades de TCR, incluindo CD3 epsilon, CD3 gama e CD3 delta, e de cadeias alfa de TCR e beta de TCR com domínios de ligação específicos para antígenos de superfície celular que têm o potencial de superar as limitações de abordagens existentes.

[0081] São descritas neste documento novas proteínas de fusão que matam mais eficientemente células-alvo do que CARs, mas liberam níveis comparáveis ou menores de citocinas pró-inflamatórias. Essas proteínas de fusão e métodos de seu uso representam uma vantagem para as proteínas de fusão do receptor de células T (TCR) (TFPs) em relação aos CARs porque níveis elevados dessas citocinas foram associados a toxicidades limitantes de dose para terapias de CAR-T adotivas.

[0082] Em um aspecto, são descritas neste documento moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam uma proteína de fusão (TFP) de receptor de células T (TCR) que compreende uma subunidade de TCR e um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação de antígeno associado a antitumoral (TAA) (por exemplo, um IL13Ra2, MUC16 ou domínio de ligação MSLN). Em algumas modalidades, o domínio de anticorpo é um domínio de anticorpo humano ou humanizado. Em algumas modalidades, a subunidade de TCR compreende um domínio extracelular de TCR. Em outras modalidades, a subunidade de TCR compreende um domínio transmembrana de TCR. Ainda em outras modalidades, a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular de TCR. Em algumas modalidades, a subunidade de TCR compreende (i) um domínio extracelular de TCR, (ii) um domínio transmembrana de TCR e (iii) um domínio intracelular de TCR, em que pelo menos dois dentre (i), (ii) e (iii) são da mesma subunidade de TCR.

Em algumas modalidades, a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador selecionado de um domínio de sinalização intracelular de CD3 epsilon, CD3 gama ou CD3 delta, ou uma sequência de aminoácidos com pelo menos uma, duas ou três modificações nesta. Em algumas modalidades, a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular compreendendo um domínio estimulador selecionado a partir de um domínio de sinalização funcional de 4-1BB e/ou um domínio de sinalização funcional de CD3 zeta ou uma sequência de aminoácido com pelo menos uma modificação nela.

[0083] Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico isoladas compreendem (i) uma CDR1 de cadeia leve (LC), LC CDR2 e LC CDR3 de qualquer sequência de aminoácidos do domínio de ligação à cadeia leve anti-TAA fornecida neste documento, e/ou (ii) uma CDR1 de cadeia pesada (HC), HC CDR2 e HC CDR3 de qualquer sequência de aminoácidos de domínio de ligação à cadeia pesada anti-TAA fornecida neste documento.

[0084] Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico isolada compreende um HC CDR1, HC CDR2 e HC CDR3 de qualquer anticorpo de cadeia pesada anti-TAA ou anticorpo de domínio único fornecido neste documento. Por exemplo, anticorpos de cadeia pesada ou anticorpos de domínio único podem ser encontrados nos animais da família *Camelidae*. A família *Camelidae* (camelos: *Camelus dromedaries* uma corcova e *Camelus bactrianus* de duas corcovas; lhamas: *Lama glama*, *Lama guanicoe*, *Lama vicugna*; alpaca: *Vicugna pacos*), da subordem *Tylopoda*, da ordem *Artiodactyla* possuem um tipo especial de anticorpo adicional a anticorpos clássicos em seu soro. Esses anticorpos, chamados de anticorpos de cadeia pesada (HCAbs), são únicos em sua ausência de toda a cadeia leve e da primeira região constante de cadeia pesada (C_H1). Anticorpos semelhantes aos anticorpos apenas de cadeia pesada de camélídeos (cAbs) também foram encontrados em wobbegong, tubarões-lixia e ratfish pintados.

[0085] Em algumas modalidades, a região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos uma, duas ou três modificações, mas não mais do que 30, 20 ou 10 modificações de uma sequência de aminoácidos de uma região variável de cadeia leve fornecida neste documento ou uma sequência com 95-99% de identidade para uma sequência de aminoácidos

fornecida neste documento.e Em outras modalidades, a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos uma, duas ou três modificações, mas não mais do que 30, 20 ou 10 modificações de uma sequência de aminoácidos de uma região variável de cadeia pesada fornecida neste documento ou uma sequência com 95-99% de identidade para uma sequência de aminoácidos fornecida neste documento.

[0086] Em algumas modalidades, a TFP inclui um domínio extracelular de uma subunidade de TCR que compreende um domínio extracelular ou uma porção deste de uma proteína selecionada do grupo que consiste na cadeia alfa ou cadeia beta do receptor de células T, CD3 delta, CD3 epsilon ou CD3 gama, ou um fragmento funcional destes, ou uma sequência de aminoácidos com pelo menos uma, duas ou três modificações, mas não mais do que 20, 10 ou 5 modificações nela. Em outras modalidades, a TFP codificada inclui um domínio transmembrana que compreende um domínio transmembrana de uma proteína selecionada do grupo que consiste na cadeia alfa, beta das subunidades de TCR ou subunidades de TCR de CD3 epsilon, CD3 gama e CD3 delta, ou um fragmento funcional destas, ou uma sequência de aminoácidos com pelo menos uma, duas ou três modificações, mas não mais de 20, 10 ou 5 modificações nela.

[0087] Em algumas modalidades, a TFP codificada inclui um domínio transmembrana que compreende um domínio transmembrana de uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste na cadeia alfa, beta ou zeta do TCR, ou CD3 epsilon, CD3 gama, CD3 delta, CD45, CD2, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 e um fragmento funcional deste. Em algumas modalidades, a TFP codificada compreende um domínio transmembrana de uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos uma, duas ou três modificações, mas não mais do que 20, 10 ou 5 modificações, em que a proteína é selecionada a partir do grupo que consiste em a cadeia alfa, beta ou zeta do TCR ou CD3 epsilon, CD3 gama, CD3 delta, CD45, CD2, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 e um fragmento funcional destes.

[0088] Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA codificado está ligado ao domínio extracelular de TCR por uma sequência de ligante peptídico.

Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico codificada compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 1$ a 4. Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico codificada compreende uma sequência de ligante peptídico longa (LL). Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico longa codificada compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 2$ a 4. Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico codificada compreende uma sequência de ligante peptídico curta (SL). Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico curta codificada compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 1$ a 3.

[0089] Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico isoladas compreendem ainda uma sequência que codifica um domínio co-estimulador. Em alguns casos, o domínio co-estimulador é um domínio de sinalização funcional obtido a partir de uma proteína selecionada do grupo que consiste em DAP10, DAP12, CD30, LIGHT, OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) e 4-1BB (CD137) ou uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos uma, duas ou três modificações, mas não mais que 20, 10 ou 5 modificações nelas.

[0090] Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico isoladas compreendem ainda uma sequência líder.

[0091] Também são fornecidas neste documento moléculas de polipeptídeo isoladas codificadas por qualquer uma das moléculas de ácido nucleico previamente descritas.

[0092] Também são fornecidas neste documento, em outro aspecto, moléculas de proteína de fusão (TFP) de receptor de células T isoladas que compreendem um domínio de ligação anti-TAA, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular. Em algumas modalidades, as moléculas de TFP isoladas compreendem um anticorpo ou fragmento de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-TAA humano ou humanizado, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular. Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA é um domínio de ligação humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA não é humanizado. Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA compreende um anticorpo camelídeo ou um fragmento de anticorpo deste.

[0093] Em algumas modalidades, o domínio de anticorpo compreende um

fragmento de anticorpo. Em algumas modalidades, o domínio do anticorpo compreende um scFv, anticorpo de domínio único (sdAb) ou um domínio V_H .

[0094] Em algumas modalidades, o domínio de anticorpo humano ou humanizado compreende um fragmento de anticorpo. Em algumas modalidades, o domínio do anticorpo humano ou humanizado compreende um scFv, anticorpo de domínio único (sdAb) ou um domínio V_H .

[0095] Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA é um scFv, um anticorpo de domínio único (sdAb), um domínio V_{HH} ou V_H . Em outras modalidades, o domínio de ligação anti-TAA compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada de uma sequência de aminoácidos fornecida neste documento, ou um fragmento funcional desta, ou uma sequência de aminoácidos com pelo menos uma, duas ou três modificações, mas não mais do que 30, 20 ou 10 modificações de uma sequência de aminoácidos de uma região variável de cadeia leve fornecida neste documento, ou uma sequência com 95-99% de identidade com uma sequência de aminoácidos fornecida neste documento.

[0096] Em algumas modalidades, as moléculas de TFP isoladas compreendem um domínio extracelular de TCR que compreende um domínio extracelular ou uma porção deste de uma proteína selecionada do grupo que consiste na cadeia alfa ou beta do receptor de células T, CD3 delta, CD3 epsilon ou CD3 gama, ou um fragmento funcional destes, ou uma sequência de aminoácidos com pelo menos uma, duas ou três modificações, mas não mais do que 20, 10 ou 5 modificações nela.

[0097] Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA codificado está ligado ao domínio extracelular de TCR por uma sequência de ligante peptídico. Em alguns casos, a região de ligante peptídico compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 1$ a 4. Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico compreende uma sequência de ligante peptídico longa (LL). Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico longa compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 2$ a 4. Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico codificada compreende uma sequência de ligante peptídico curta (SL). Em alguns casos, a sequência de ligação curta compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 1$ a 3.

[0098] Em algumas modalidades, as moléculas de TFP isoladas compreendem uma sequência que codifica um domínio co-estimulador. Em outras

modalidades, as moléculas de TFP isoladas compreendem ainda uma sequência que codifica um domínio de sinalização intracelular. Ainda em outras modalidades, as moléculas de TFP isoladas compreendem ainda uma sequência líder.

[0099] Também são fornecidos neste documento vetores que compreendem uma molécula de ácido nucleico que codifica qualquer uma das moléculas de TFP anteriormente descritas. Em algumas modalidades, o vetor é selecionado do grupo que consiste em um DNA, um RNA, um plasmídeo, um vetor de lentivírus, um vetor adenoviral ou um vetor de retrovírus. Em algumas modalidades, o vetor compreende ainda um promotor. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor transcrito *in vitro*. Em algumas modalidades, uma sequência de ácido nucleico no vetor compreende ainda uma cauda poli(A). Em algumas modalidades, uma sequência de ácido nucleico no vetor compreende ainda uma 3'UTR.

[00100] Também são fornecidas neste documento células que compreendem qualquer um dos vetores descritos. Em algumas modalidades, a célula é uma célula T humana. Em algumas modalidades, a célula é uma célula T CD8+ ou CD4+. Em outras modalidades, a célula compreende ainda um ácido nucleico que codifica uma molécula inibitória que compreende um primeiro polipeptídeo que compreende pelo menos uma porção de uma molécula inibidora, associada a um segundo polipeptídeo que compreende um sinal positivo a partir de um domínio de sinalização intracelular. Em alguns casos, a molécula inibitória compreende um primeiro polipeptídeo que compreende pelo menos uma porção de PD1 e um segundo polipeptídeo que compreende um domínio co-estimulador e domínio de sinalização primário.

[00101] Em outro aspecto, são fornecidas neste documento moléculas de TFP isoladas que compreendem um domínio de ligação anti-TAA, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno. Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA é um domínio anti-TAA de ligação humano ou humanizado.

[00102] Em outro aspecto, são fornecidas neste documento moléculas de TFP isoladas que compreendem um domínio de ligação anti-TAA humano ou humanizado, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um

domínio de sinalização intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de se integrar funcionalmente em um complexo de TCR endógeno.

[00103] Em outro aspecto, é fornecida neste documento uma célula T CD8+ ou CD4+ humana compreendendo pelo menos duas moléculas de TFP, as moléculas de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-TAA humano ou humanizado, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou com pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno em e/ou sobre a superfície da célula T CD8+ ou CD4+ humana.

[00104] Em outro aspecto, são fornecidos neste documento complexos de proteína que compreendem i) uma molécula de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-TAA humano ou humanizado, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular; e ii) pelo menos um complexo de TCR endógeno.

[00105] Em algumas modalidades, o TCR compreende um domínio extracelular ou uma porção deste de uma proteína selecionada do grupo que consiste na cadeia alfa ou beta do receptor das células T, CD3 delta, CD3 epsilon ou CD3 gama. Em algumas modalidades, o domínio de ligação anti-TAA codificado está ligado ao domínio extracelular de TCR por uma sequência de ligante peptídico. Em alguns casos, a região de ligante peptídico compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 1$ a 4. Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico compreende uma sequência de ligante peptídico longa (LL). Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico longa compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 2$ a 4. Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico compreende uma sequência de ligante peptídico curta (SL). Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico curta compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 1$ a 3.

[00106] Também são fornecidas neste documento células T CD8+ ou CD4+ humanas que compreendem pelo menos duas proteínas de TFP diferentes por qualquer um dos complexos de proteína descritos.

[00107] Em outro aspecto, é fornecida uma população de células T CD8+ ou CD4+ humanas, em que as células T da população individual ou coletivamente compreendem pelo menos duas moléculas de TFP, as moléculas de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-TAA humano ou humanizado, um

domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo TCR endógeno em e/ou sobre a superfície das células T CD8+ ou CD4+ humana.

[00108] Em outro aspecto, é fornecida neste documento uma população de células T CD8+ ou CD4+ humanas, em que as células T da população individual ou coletivamente compreendem pelo menos duas moléculas de TFP codificadas por uma molécula de ácido nucleico isolada fornecida neste documento.

[00109] Em outro aspecto, são fornecidos neste documento métodos para produzir uma célula compreendendo transduzir uma célula T com qualquer um dos vetores descritos.

[00110] Em outro aspecto, são fornecidos neste documento métodos para gerar uma população de células de RNA manipuladas que compreendem introduzir um RNA transcrito *in vitro* ou RNA sintético em uma célula, em que o RNA compreende um ácido nucleico que codifica qualquer uma das moléculas de TFP descritas.

[00111] Em outro aspecto, são fornecidos neste documento métodos para fornecer uma imunidade antitumoral em um mamífero que compreende administrar, ao mamífero, uma quantidade eficaz de uma célula que expressa qualquer das moléculas de TFP descritas. Em algumas modalidades, a célula é uma célula T autóloga. Em algumas modalidades, a célula é uma célula T alogênica. Em algumas modalidades, o mamífero é um humano.

[00112] Em outro aspecto, são fornecidos neste documento métodos de tratamento de um mamífero com uma doença associada à expressão de um antígeno associado a tumor (TAA) (por exemplo, MUC16, IL13R α 2 ou MSLN) que compreende a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz da célula compreendendo qualquer uma das moléculas de TFP descritas. Em algumas modalidades, a doença associada à expressão de TAA (por exemplo, MUC16, IL13R α 2, MSLN) é selecionada a partir de uma doença proliferativa, como um câncer ou malignidade ou uma condição pré-cancerosa, como um câncer pancreático, um câncer de ovário, um câncer de estômago, mesotelioma, um câncer de pulmão ou um câncer endometrial, ou é uma indicação não relacionada ao câncer associada à expressão do TAA (por exemplo, MUC16, IL13R α 2, MSLN).

[00113] Em algumas modalidades, as células que expressam qualquer uma das moléculas de TFP são administradas em combinação com um agente que melhora um ou mais efeitos colaterais associados à administração de uma célula que expressa uma molécula de TFP. Em algumas modalidades, as células que expressam qualquer uma das moléculas de TFP descritas são administradas em combinação com um agente que trata a doença associada ao TAA (por exemplo, MUC16, IL13R α 2, MSLN).

[00114] Também são fornecidas neste documento qualquer uma das moléculas de ácido nucleico isoladas descritas, qualquer uma das moléculas de polipeptídeos isoladas descritas, qualquer uma das TFPs isoladas descritas, qualquer um dos complexos proteicos descritos, qualquer um dos vetores descritos ou qualquer uma das células descritas para uso como um medicamento.

Definições

[00115] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado como comumente compreendido por uma pessoa de conhecimento comum à técnica, à qual pertence a invenção.

[00116] O termo “um” e “uma” referem-se a um ou a mais do que um (ou seja, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, “um elemento” significa um elemento ou mais de um elemento.

[00117] Tal conforme usado neste documento, “cerca de” pode significar mais ou menos do que 1 ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 ou mais do que 30 por cento, dependendo da situação e conhecidos ou passível de ser conhecido por um versado na técnica.

[00118] Tal conforme usado neste documento, “sujeito”, ou “sujeitos” ou “indivíduos” podem incluir, mas não estão limitados a, mamíferos, tais como seres humanos, ou mamíferos não humanos, *por exemplo*, domesticados, agrícolas ou selvagens, animais, bem como aves, e animais aquáticos. “Pacientes” são sujeitos que sofrem ou estão em risco de desenvolver uma doença, distúrbio ou condição ou, de outra forma, que necessitem das composições e métodos fornecidos neste documento.

[00119] Tal conforme usado neste documento, “tratar” ou “tratamento” refere-se a quaisquer indícios de sucesso no tratamento ou melhoria da doença ou

condição. O tratamento pode incluir, por exemplo, reduzir, retardar ou aliviar a gravidade de um ou mais sintomas da doença ou condição, ou pode incluir a redução da frequência com que sintomas de uma doença, defeito, distúrbio ou condição adversa e similares, são experimentados por um paciente. Tal conforme usado neste documento, "tratar ou prevenir" é por vezes usado neste documento para se referir a um método que resulta em algum nível de tratamento ou melhoria da doença ou condição, e contempla um intervalo de resultados direcionados para essa finalidade, incluindo, mas não restrita à prevenção da condição inteiramente.

[00120] Tal conforme usado neste documento, "prevenir" refere-se à prevenção da doença ou condição, *por exemplo*, formação de tumores, no paciente. Por exemplo, se um indivíduo em risco de desenvolver um tumor ou outra forma de câncer for tratado com os métodos da presente invenção e não desenvolver posteriormente o tumor ou outra forma de câncer, então, a doença foi prevenida, pelo menos ao longo de um período de tempo, nesse indivíduo.

[00121] Tal conforme usado neste documento, uma "quantidade terapêuticamente eficaz" é a quantidade de uma composição ou um componente ativo desta suficiente para fornecer um efeito benéfico ou, de outra forma, reduzir um evento prejudicial não benéfico para o indivíduo a quem a composição é administrada. Por "dose terapêuticamente eficaz" neste documento se entende uma dose que produz um ou mais efeitos desejados ou desejáveis (*por exemplo*, benéfico) para os quais é administrado, tal administração ocorrendo uma ou mais vezes ao longo de um determinado período de tempo. A dose exata vai depender da finalidade do tratamento e vai ser determinável por um versado na técnica usando técnicas conhecidas (ver, *por exemplo* Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); and Pickar, *Dosage Calculations* (1999))

[00122] Tal conforme usado neste documento, uma "proteína de fusão de receptor de células T (TCR)" ou "TFP" inclui um polipeptídeo recombinante derivado dos vários polipeptídeos compreendendo o TCR que é, em geral, capaz de i) se ligar a um antígeno de superfície em células-alvo e ii) interagir com outros componentes de polipeptídeo do complexo de TCR intacto, normalmente quando co-localizado na ou sobre a superfície ou na superfície de uma célula T. Uma "célula T TFP" é uma célula T que foi transduzida de acordo com os métodos divulgados

neste documento e que expressa uma TFP, por exemplo, incorporada no TCR natural. Em algumas modalidades, a célula T é uma célula T CD4+, uma célula T CD8+ ou uma célula T CD4+/CD8+. Em algumas modalidades, a célula T TFP é uma célula NK. Em algumas modalidades,

[00123] Tal conforme usado neste documento, o termo "MUC16" também conhecido como mucina 16 ou CA125 (antígeno de câncer 125, antígeno de carcinoma 125 ou antígeno de carboidrato 125), refere-se a uma proteína que em humanos é codificada pelo gene *MUC16*. MUC16 é um membro da família das glicoproteínas da mucina e encontrou aplicação como um marcador tumoral ou biomarcador que pode estar elevado no sangue de alguns pacientes com tipos específicos de câncer ou outras condições que são benignas. MUC16 é usado como um biomarcador para detecção de câncer de ovário e foi encontrado para ser elevado em outros tipos de câncer, incluindo câncer endometrial, câncer de trompa de Falópio, câncer de pulmão, câncer de mama e câncer gastrointestinal. MUC16 também demonstrou suprimir a atividade de células assassinas naturais na resposta imunológica às células cancerosas (ver, por exemplo, Patankar et al., *Gynecologic Oncology* **99**(3); 704-13).

[00124] Tal conforme usado neste documento, o termo "IL13R α 2", também conhecido como cluster de diferenciação 213A2 (CD213A2), refere-se a uma proteína ligada à membrana que em humanos é codificada pelo gene *IL13R α 2*. IL13R α 2 é uma subunidade do complexo receptor da interleucina 13 e é um receptor da proteína IL13. IL13R α 2 foi encontrado para ser superexpressado em uma variedade de cânceres, incluindo gliomas pancreáticos, ovarianos, melanomas e malignos.

[00125] Tal conforme usado neste documento, o termo "MSLN" ou "mesotelina" refere-se a uma glicoproteína ligada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) de superfície celular de 40 kDa. A proteína mesotelina humana é sintetizada como um precursor de 69 kD que é então processado proteoliticamente. O terminal amino de 30 kD da mesotelina é secretado e é referido como fator de potenciação de megacariócitos (Yamaguchi et al., *J. Biol. Chem.* 269: 805 808, 1994). O terminal carboxila de 40 kD permanece ligado à membrana como mesotelina madura (Chang et al., *Natl. Acad. Sci. USA* 93:136 140, 1996; Scholler et al., *Cancer Lett* 247 (2007), 130-136). Sequências exemplificativas de ácido nucleico e aminoácido

mesotelina também podem ser determinadas a partir do transcrito do gene *MSLN* encontrado em (número de acesso NCBI NM_005823 ou número de acesso NCBI NM_013404. Conseqüentemente, onde os construtos conjugados divulgados neste documento são caracterizados por competição cruzada com um anticorpo de referência para mesotelina, ou um epítopo deste, a mesotelina é aquela relatada em Scholler et al., *Cancer Lett* 247 (2007), 130-136.

[00126] As seqüências de aminoácidos e de ácido nucleico humano e murino podem ser encontradas em um banco de dados público, tal como GenBank, UniProt e Swiss-Prot. Por exemplo, a seqüência de aminoácidos de MUC16 humano pode ser encontrada como o número de acesso UniProt/Swiss-Prot nº Q8WXI7. A seqüência de nucleotídeos que codifica MUC16 humano pode ser encontrada no nº de Acesso NM_024690. A seqüência de nucleotídeos que codifica a variante X1 do transcrito de MUC16 humano pode ser encontrada no nº de Acesso XM_017027486. A seqüência de nucleotídeos que codifica a variante X2 do transcrito de MUC16 humano pode ser encontrada no nº de Acesso XM_017027487. A seqüência de nucleotídeos que codifica a variante X3 do transcrito de MUC16 humano pode ser encontrada no nº de Acesso XM_017027488. A seqüência de nucleotídeos que codifica a variante X4 do transcrito de MUC16 humano pode ser encontrada no nº de Acesso XM_017027489. A seqüência de nucleotídeos que codifica a variante X5 do transcrito de MUC16 humano pode ser encontrada no nº de Acesso XM_017027490. A seqüência de nucleotídeos que codifica a variante X6 do transcrito de MUC16 humano pode ser encontrada no nº de Acesso XM_017027491. A seqüência de nucleotídeos que codifica a variante X7 do transcrito de MUC16 humano pode ser encontrada no nº de Acesso XM_017027492. A seqüência de nucleotídeos que codifica a variante X8 do transcrito de MUC16 humano pode ser encontrada no nº de Acesso XM_017027493. A seqüência de nucleotídeos que codifica a variante X9 do transcrito de MUC16 humano pode ser encontrada no nº de Acesso XM_017027494. A seqüência de nucleotídeos que codifica a variante X10 do transcrito de MUC16 humano pode ser encontrada no nº de Acesso XM_017027495. A seqüência de nucleotídeos que codifica a variante X11 do transcrito de MUC16 humano pode ser encontrada no nº de Acesso

XM_017027499. A sequência de nucleotídeos que codifica a variante X12 do transcrito de MUC16 humano pode ser encontrada no nº de Acesso XM_017027500. A sequência de nucleotídeos que codifica a variante X13 do transcrito de MUC16 humano pode ser encontrada no nº de Acesso XM_017027501. Em um exemplo, a porção de ligação ao antígeno de TFPs reconhece e se liga a um epítipo dentro do domínio extracelular da proteína MUC16 conforme expresso em uma célula de glioma, célula de iniciação de glioma, célula de mesotelioma normal ou maligno, célula de câncer ovariano, célula de adenocarcinoma pancreático ou célula de carcinoma escamoso.

[00127] A sequência de aminoácidos de IL13R α 2 humano pode ser encontrada como UniProt/Swiss-Prot Accession nº Q14627. A sequência de nucleotídeos que codifica IL13R α 2 humano pode ser encontrada no nº de Acesso NM_000640. A sequência de nucleotídeos que codifica o precursor IL13R α 2 humano pode ser encontrada no nº de Acesso NP_000631. Em um exemplo, a porção de ligação ao antígeno de TFPs reconhece e se liga a um epítipo dentro do domínio extracelular da proteína IL13R α 2 conforme expresso em uma célula de glioma, célula de iniciação de glioma, célula de mesotelioma normal ou maligno, célula de câncer ovariano, célula de adenocarcinoma pancreático ou célula de carcinoma escamoso.

[00128] O termo "anticorpo", tal conforme usado neste documento, refere-se a uma proteína, ou sequências de polipeptídeo derivadas de uma molécula de imunoglobulina, que se liga especificamente a um antígeno. Os anticorpos podem ser imunoglobulinas intactas de origem policlonal ou monoclonal, ou fragmentos destes, e podem ser derivados de fontes naturais ou recombinantes.

[00129] Os termos "fragmento de anticorpo" ou "domínio de ligação a anticorpo" referem-se a pelo menos uma porção de um anticorpo, ou variantes recombinantes destes, que contém o domínio de ligação a antígeno, ou seja, uma região variável determinante antigênica de um anticorpo intacto, que é suficiente para conferir reconhecimento e ligação específica do fragmento de anticorpo a um alvo, tal como um antígeno e o seu epítipo definido. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas não estão limitados a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv, fragmentos de anticorpos (sc)Fv ("scFv") de cadeia única, anticorpos lineares, anticorpos de domínio único ("sdAb" abreviado) (V_L ou V_H), domíniosV_{HH}

camelídeos, e anticorpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticorpo.

[00130] O termo "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 estão ligadas de forma contígua por meio de uma ligação de polipeptídeo flexível curto e capaz de ser expresso como uma única cadeia de polipeptídeo, e em que o scFv retém a especificidade do anticorpo intacto a partir do qual é derivado.

[00131] "Região variável de cadeia pesada" ou "V_H" (ou, no caso de anticorpos de domínio único, por exemplo, nanocorpos, "V_{HH}") em relação a um anticorpo refere-se ao fragmento de cadeia pesada que contém três CDRs interpostos entre os flaqueadores trechos conhecidos como regiões de framework, essas regiões de framework são geralmente mais conservadas do que as CDRs e formam uma estrutura em andaime para apoiar as CDRs.

[00132] A menos que especificado, tal conforme usado neste documento, um scFv pode ter as regiões variáveis V_L e V_H em qualquer ordem, *por exemplo*, em relação às extremidades N-terminal e C-terminal do polipeptídeo, o scFv pode compreender V_L-linker-V_H ou pode compreender V_H-linker-V_L.

[00133] A porção da composição de TFP da invenção que compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo deste pode existir em uma variedade de formas, em que o domínio de ligação a antígeno é expresso como parte de uma cadeia de polipeptídeo contígua incluindo, por exemplo, um fragmento de anticorpo de domínio único (sdAb) ou anticorpos de cadeia pesada HCAb, um anticorpo de cadeia única (scFv) derivado de um anticorpo murino, humanizado ou humano (Harbaxo et al., 1999, Em: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.; Harbaxo et al., 1989, Em: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., 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 a antígeno de uma composição de TFP da presente divulgação compreende um fragmento de anticorpo. Em um aspecto adicional, a TFP compreende um fragmento de anticorpo que compreende um scFv ou um sdAb.

[00134] O termo "cadeia pesada de anticorpo" refere-se ao maior dos dois

tipos de cadeias de polipeptídeos presentes em moléculas de anticorpo nas suas conformações de ocorrência natural e que normalmente determina a classe à qual o anticorpo pertence.

[00135] O termo "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 ("κ") e lambda ("λ") referem-se aos dois principais isotipos de cadeia leve de anticorpo.

[00136] O termo "anticorpo recombinante" refere-se a um anticorpo que é gerado utilizando tecnologia de DNA recombinante, tal como, por exemplo, um anticorpo expresso por um bacteriófago ou sistema de expressão de levedura. O termo também deve ser interpretado como significando um anticorpo que foi gerado pela síntese de uma molécula de DNA que codifica o anticorpo e tal molécula de DNA expressa uma proteína de anticorpo, ou uma sequência de aminoácidos especificando o anticorpo, em que o DNA ou a sequência de aminoácidos foi obtida utilizando tecnologia de DNA recombinante ou sequência de aminoácidos que está disponível e bem conhecida na técnica.

[00137] O termo "antígeno" ou "Ag" refere-se a uma molécula que é capaz de ser ligada especificamente por um anticorpo, ou, de outra forma, provoca uma resposta imunológica. Esta resposta imunológica pode envolver a produção de anticorpos ou a ativação de células imunologicamente competentes específicas, ou ambas.

[00138] O versado na técnica entenderá que qualquer macromolécula, incluindo praticamente todas as proteínas ou peptídeos, pode servir como um antígeno. Além disso, os antígenos podem ser derivados de DNA recombinante ou genômico. Um versado na técnica compreenderá que qualquer DNA, que compreende sequências de nucleotídeo ou uma sequência de nucleotídeo parcial que codifica uma proteína que induz uma resposta imunológica, portanto, codifica um "antígeno" à medida que esse termo é usado neste documento. Além disso, um versado na técnica compreenderá que um antígeno não precisa ser codificado apenas por uma sequência de nucleotídeo de comprimento completo de um gene. É facilmente evidente que a presente divulgação inclui, mas não está limitada a, a utilização de sequências de nucleotídeo parciais de mais do que um gene e que estas sequências de nucleotídeo estão dispostas em várias combinações para

codificar polipeptídeos que induzem a resposta imunológica desejada. Além disso, alguém versado na técnica entenderá que um antígeno não precisa ser codificado por um "gene" de forma alguma. É prontamente evidente que um antígeno pode ser gerado sintetizado ou pode ser derivado de uma amostra biológica, ou poderia ser a macromolécula além de um polipeptídeo. Tal amostra biológica pode incluir, mas não está limitada a, uma amostra de tecido, uma amostra de tumor, uma célula ou um fluido com outros componentes biológicos.

[00139] O termo "efeito antitumoral" refere-se a um efeito biológico que pode ser manifestado por vários meios, incluindo, mas não limitado a, *por exemplo*, uma diminuição no volume tumoral, uma diminuição do número de células tumorais, uma diminuição no número de metástases, um aumento na expectativa de vida, diminuição na proliferação de células tumorais, diminuição na sobrevivência de células tumorais ou melhoria de vários sintomas fisiológicos associados à condição cancerígena. Um "efeito antitumoral" também pode ser manifestado pela capacidade dos peptídeos, polinucleotídeos, células e anticorpos da invenção na prevenção da ocorrência de tumor no primeiro lugar.

[00140] O termo "autólogo" refere-se a qualquer material derivado do mesmo indivíduo a quem posteriormente deve reintroduzido no indivíduo.

[00141] O termo "alogênico" refere-se a qualquer material derivado de um animal diferente da mesma espécie ou paciente diferente do 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 antígenicamente.

[00142] O termo "xenogênico" refere-se a um enxerto derivado de um animal de uma espécie diferente.

[00143] O termo "câncer" refere-se a uma doença caracterizada pelo crescimento rápido e descontrolado de células aberrantes. As células cancerosas podem se espalhar localmente ou através da corrente sanguínea e do sistema linfático para outras partes do corpo. Exemplos de vários cânceres são descritos neste documento e incluem, mas não estão limitados a, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pele, câncer pancreático, câncer colorretal, câncer renal, câncer de fígado, câncer de cérebro, câncer de

pulmão e similares.

[00144] A frase "doença associada à expressão de "MUC16, IL13R α 2 ou MSLN inclui, mas não está limitada a, uma doença associada à expressão de MUC16, IL13R α 2 ou MSLN ou condição associada a células que expressam MUC16, IL13R α 2 ou MSLN incluindo, *por exemplo*, doenças proliferativas, como câncer ou malignidade ou uma condição pré-cancerosa. Em um aspecto, o câncer é um glioblastoma. Em um aspecto, o câncer é um mesotelioma. Num aspecto, o câncer é um câncer pancreático. Num aspecto, o câncer é um câncer do ovário. Num aspecto, o câncer é um câncer cerebral. Num aspecto, o câncer é um câncer estomacal. Num aspecto, o câncer é um câncer do pulmão. Num aspecto, o câncer é um câncer do endométrio. As indicações não relacionadas ao câncer associadas à expressão de MUC16, IL13R α 2 ou MSLN incluem, mas não estão limitadas a, *por exemplo*, doença autoimune, (*por exemplo*, lúpus, artrite reumatoide, colite), distúrbios inflamatórios (alergia e asma) e transplante.

[00145] O termo "modificações da sequência conservativa" refere-se a modificações de aminoácidos que não afetam ou alteram significativamente as características de ligação do anticorpo ou fragmento de anticorpo contendo a sequência de aminoácidos. Tais modificações conservativas incluem substituições, adições e deleções de aminoácidos. As modificações podem ser introduzidas em um anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção por técnicas padrão conhecidas na técnica, tais como mutagênese direcionada ao sítio e mutagênese mediada por PCR. As substituições conservativas de aminoácidos são aquelas em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido que possui uma cadeia lateral semelhante. Famílias de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais semelhantes foram definidas na técnica. Essas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (*por exemplo*, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (*por exemplo*, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares sem carga (*por exemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não polares (*por exemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais ramificadas em beta (*por exemplo*, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (*por exemplo*, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Assim, um ou mais resíduos de aminoácidos dentro de uma TFP da invenção podem ser

substituídos por outros resíduos de aminoácidos da mesma família de cadeia lateral, e a TFP alterada pode ser testada usando os ensaios funcionais descritos neste documento.

[00146] O termo "estimulação" refere-se a uma resposta primária induzida ao se ligar um domínio estimulador ou molécula estimuladora (*por exemplo*, um complexo de TCR/CD3) com o seu ligante cognato, assim, mediando um evento de transdução de sinal, tal como, mas não limitado a, transdução de sinal por meio do complexo de TCR/CD3. A estimulação pode mediar a expressão alterada de certas moléculas, e/ou reorganização de estruturas citoesqueléticas e similares.

[00147] O termo "molécula estimuladora" ou "domínio estimulador" refere-se a uma molécula ou porção dela expressa por uma célula T que fornece a(s) sequência(s) de sinalização citoplasmática(s) primária(s) que regula (m) a ativação primária do complexo de TCR de forma estimuladora para pelo menos alguns aspectos da via de sinalização de células T. Em um aspecto, o sinal primário é iniciado, por exemplo, pela ligação de um complexo de TCR/CD3 com uma molécula de MHC carregada com peptídeo e que leva à mediação de uma resposta de células T, incluindo, mas não limitado a, proliferação, ativação, diferenciação e similares. Uma sequência de sinalização citoplasmática primária (também referida como "domínio de sinalização primário") que atua de forma estimuladora pode conter um motivo de sinalização que é conhecido como motivo de ativação de imunorreceptor baseado em tirosina ou "ITAM". Exemplos de um ITAM que contém sequência de sinalização citoplasmática primária que é de utilização particular na invenção inclui, mas não está limitada a, aqueles derivados de TCR zeta, FcR gama, FcR beta, CD3 gama, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (também conhecido como "ICOS") e CD66d.

[00148] O termo "célula apresentadora de antígeno" ou "APC" refere-se a uma célula do sistema imunológico, tal como uma célula acessória (*por exemplo*, uma célula B, uma célula dendrítica e similares), que exhibe um antígeno estrangeiro complexado com principais complexos de histocompatibilidade (do MHC) em sua superfície. As células T podem reconhecer esses complexos usando seus receptores de células T (TCRs). APCs processam antígenos e os apresentam para células T.

[00149] Um "domínio de sinalização intracelular", como o termo é usado

nesse documento, refere-se a uma porção intracelular de uma molécula. O domínio de sinalização intracelular gera um sinal que promove uma função efetora imunológica da célula contendo TFP, *por exemplo*, uma célula T que expressa TFP. Exemplos de função efetora imunológica, *por exemplo*, em uma célula T que expressa TFP, incluem atividade citolítica e atividade de células T helper, incluindo a secreção de citocinas. Em uma modalidade, o domínio de sinalização intracelular pode compreender um domínio de sinalização intracelular primário. Exemplos de domínios de sinalização intracelular primários 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 co-estimulador. Exemplos de domínios de sinalização intracelular co-estimuladores incluem aqueles derivados de moléculas responsáveis por sinais co-estimuladores ou estimulação independente de antígeno.

[00150] Um domínio de sinalização intracelular primário pode compreender um ITAM ("motivo de ativação de imunorreceptor baseado em tirosina"). Exemplos de ITAM que contém sequências de sinalização citoplasmática primária incluem, mas não estão limitados a, aqueles derivados de CD3 zeta, FcR gama, FcR beta, CD3 gama, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66d, DAP10 e DAP12.

[00151] O termo "molécula co-estimuladora" refere-se ao parceiro de ligação cognato em uma célula T que se liga especificamente com um ligante co-estimulador, assim, mediando uma resposta co-estimuladora pela célula T, tal como, mas não limitado a, proliferação. As moléculas estimuladoras são moléculas de superfície celular diferentes dos receptores de antígeno ou seus ligantes que são necessários para uma resposta imunológica eficiente. Moléculas co-estimuladoras incluem, mas não estão limitadas a, uma molécula MHC de classe 1, BTLA e um receptor de ligante Toll, bem como DAP10, DAP12, CD30, LIGHT, OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) e 4-1BB (CD137). Um domínio de sinalização intracelular co-estimulador pode ser a porção intracelular de uma molécula co-estimuladora. Uma molécula co-estimuladora pode ser representada nas seguintes famílias de proteínas: proteínas receptoras de TNF, proteínas semelhantes a imunoglobulinas, receptores de citocina, integrinas,

moléculas de ativação linfocítica de sinalização (proteínas SLAM) e receptores de células NK ativadoras. Exemplos de tais moléculas incluem CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFRR, HVEM, antígeno associado a função de linfócito 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, e um ligando que se liga especificamente a CD83, e similares. O domínio de sinalização intracelular pode compreender toda a porção intracelular, ou todo o domínio de sinalização intracelular nativo, da molécula a partir da qual é derivada, ou um fragmento funcional deste. O termo "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, símio e similares; e um "domínio co-estimulador de 4-1BB" é definido como os resíduos de aminoácidos 214-255 do Acesso GenBank nº AAA62478.2, ou os resíduos equivalentes de uma espécie não humana, *por exemplo*, camundongo, roedor, macaco, símio e similares.

[00152] O termo "codificação" refere-se à propriedade inerente de sequências específicas de nucleotídeos em um polinucleotídeo, tal como um gene, um cDNA ou um mRNA, servirem como modelos para a síntese de outros polímeros e macromoléculas em processos biológicos com uma sequência definida de nucleotídeos (*por exemplo*, rRNA, tRNA e mRNA) ou uma sequência definida de aminoácidos e as propriedades biológicas que dele resultam. Assim, um gene, cDNA ou RNA codifica uma proteína se a transcrição e tradução de mRNA correspondente ao gene que produz a proteína em uma célula ou outro sistema biológico. Tanto a fita codificadora, cuja sequência de nucleotídeos é idêntica à sequência de mRNA e é geralmente fornecida em listagens de sequências, quanto a fita não codificadora, usada como modelo para a transcrição de um gene ou cDNA, pode ser referida como codificando a proteína ou outro produto desse gene ou cDNA.

[00153] A menos que especificado de outra forma, uma "sequência de nucleotídeos que codifica uma sequência de aminoácidos" inclui todas as sequências de nucleotídeos que são versões degeneradas umas das outras e que codificam a mesma sequência de aminoácidos. A frase sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína ou um RNA também pode incluir íntrons na medida em que a sequência de nucleotídeos que codifica a proteína pode, em alguma versão,

conter um ou mais íntrons.

[00154] O termo "quantidade eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" é utilizado neste documento de forma intercambiável e refere-se a uma quantidade de um composto, formulação, material ou composição, tal como descrito neste documento, eficaz para atingir um resultado biológico ou terapêutico particular.

[00155] O termo "endógeno" refere-se a qualquer material a partir de ou produzido no interior de um organismo, célula, tecido ou sistema.

[00156] O termo "exógeno" refere-se a qualquer material introduzido ou produzido fora de um organismo, célula, tecido ou sistema.

[00157] O termo "expressão" refere-se à transcrição e/ou tradução de uma sequência de nucleotídeos particular acionada por um promotor.

[00158] O termo "vetor de transferência" refere-se a uma composição de matéria que compreende um ácido nucleico isolado e que pode ser usada para distribuir o ácido nucleico isolado para o interior de uma célula. Inúmeros vetores são conhecidos na técnica incluindo, mas não limitados a, polinucleotídeos lineares, polinucleotídeos associados a compostos iônicos ou anfifílicos, plasmídeos e vírus. Assim, o termo "vetor de transferência" inclui um plasmídeo replicante autônomo ou um vírus. O termo também deve ser interpretado a incluir ainda compostos não plasmídicos e não virais que facilitam a transferência de ácido nucleico para células, tais como, por exemplo, um composto de polilisina, lipossomas e similares. Exemplos de vetores de transferência viral incluem, mas não estão limitados a, vetores adenovirais, vetores adenovirais associados, vetores retrovirais, vetores lentivirais e similares.

[00159] O termo "vetor de expressão" refere-se a um vetor compreendendo um polinucleotídeo recombinante compreendendo sequências de controle de expressão ligadas operativamente a uma sequência de nucleotídeo a ser expressa. Um vetor de expressão compreende elementos de ação cis suficientes para a expressão; outros elementos para expressão podem ser fornecidos pela célula hospedeira ou em um sistema de expressão *in vitro*. Os vetores de expressão incluem todos aqueles conhecidos na técnica, incluindo cosmídeos, plasmídeos (*por exemplo*, nus ou contidos em lipossomas) e vírus (*por exemplo*, lentivírus, retrovírus, adenovírus e adenovírus associados) que incorporam o polinucleotídeo

recombinante.

[00160] O termo "lentivírus" refere-se a um gênero da família Retroviridae. Os lentivírus são únicos entre os retrovírus ao serem capazes de infectar células não divisórias; eles podem distribuir uma quantidade significativa de informação genética no DNA da célula hospedeira, assim, eles são um dos métodos mais eficientes de um vetor de aplicação de genes. HIV, SIV e FIV são exemplos de lentivírus.

[00161] O termo "vetor lentiviral" refere-se a um vetor derivado de pelo menos uma porção de um genoma de lentivírus, incluindo, em especial, um vetor lentiviral auto-inativante conforme fornecido em Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Outros exemplos de vetores de lentivírus que podem ser usados na clínica incluem, mas não estão limitados a, *por exemplo*, a tecnologia de distribuição do gene LENTIVECTOR™ da Oxford BioMedica, o sistema de vetor LENTIMAX™ da Lentigen e semelhantes. Tipos não clínicos de vetores lentivirais também estão disponíveis e seriam conhecidos por um versado na técnica.

[00162] O termo "homólogo" ou "identidade" refere-se à identidade da sequência da subunidade entre duas moléculas poliméricas, *por exemplo*, entre duas moléculas de ácido nucleico, tais como duas moléculas de DNA ou duas moléculas de RNA, ou entre duas moléculas de polipeptídeo. Quando uma posição de subunidade em ambas dentre as duas moléculas é ocupada pela mesma subunidade monomérica; *por exemplo*, se uma posição em cada uma dentre as duas moléculas de DNA é ocupada por adenina, então, elas são idênticas ou homólogas nessa posição. A homologia entre duas sequências é uma função direta do número de posições correspondentes ou homólogas; *por exemplo*, se metade (*por exemplo*, cinco posições em um polímero com dez subunidades de comprimento) das posições em duas sequências são homólogas, as duas sequências são 50% homólogas; se 90% das posições (*por exemplo*, 9 de 10) são correspondentes ou homólogas, as duas sequências são 90% homólogas.

[00163] Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (*por exemplo*, murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou fragmentos destes (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências de ligação a antígeno de anticorpos), as quais contêm uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Em sua maioria, os anticorpos humanizados e

fragmentos de anticorpo destes são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor ou fragmento de anticorpo) nas quais resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do receptor são substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo doador), tal como camundongo, rato ou coelho com a especificidade, afinidade e capacidade desejada. Em alguns casos, resíduos de região de framework (FR) de Fv da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, um anticorpo humanizado/fragmento de anticorpo pode compreender resíduos que não são encontrados nem no anticorpo receptor nem nas sequências de CDR ou de framework importadas. Essas modificações podem ainda refinar e aperfeiçoar o desempenho do anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado ou fragmento de anticorpo deste compreenderá substancialmente a totalidade de pelo menos um e, normalmente dois, domínios variáveis, em que todos ou substancialmente todas as regiões de CDR correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana e todas ou uma porção significativa das regiões de FR são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado ou fragmento de anticorpo também pode compreender pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), normalmente aquela de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, ver Jones et al., *Nature*, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329, 1988; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596, 1992.

[00164] O termo "Humano" ou "totalmente humano" refere-se a uma imunoglobulina, tal como um anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que a molécula inteira é de origem humana ou consiste em uma sequência de aminoácidos idêntica a uma forma humana do anticorpo ou imunoglobulina.

[00165] O termo "isolado" significa alterado ou removido do estado natural. Por exemplo, um ácido nucleico ou um peptídeo naturalmente presente em um animal vivo não está "isolado", mas o mesmo ácido nucleico ou peptídeo parcial ou completamente separado dos materiais coexistentes de seu estado natural está "isolado". Uma proteína ou ácido nucleico isolado podem existir em uma forma substancialmente purificada ou podem existir em um ambiente não nativo, tal como, por exemplo, em uma célula hospedeira.

[00166] No contexto da presente invenção, são utilizadas as seguintes

abreviaturas para as bases de ácido nucleico que ocorrem comumente. "A" refere-se à adenosina, "C" refere-se à citosina, "G" refere-se à guanosina, "T" refere-se à timidina e "U" refere-se à uridina.

[00167] O termo "operacionalmente ligado" ou "controle transcricional" refere-se à ligação funcional entre uma sequência reguladora e uma sequência de ácido nucleico heteróloga que resulta na expressão deste último. Por exemplo, uma primeira sequência de ácido nucleico é operacionalmente ligada a uma segunda sequência de ácido nucleico quando a primeira sequência de ácido nucleico é colocada em uma relação funcional com a segunda sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor está operacionalmente conectado a uma sequência codificadora se o promotor afeta a transcrição ou a expressão da sequência codificadora. As sequências de DNA operativamente ligadas podem ser contíguas entre si e, *por exemplo*, onde for necessário, unir duas regiões de codificação de proteína, estão no mesmo quadro de leitura.

[00168] O termo administração "parenteral" de uma composição imunogênica inclui, *por exemplo*, injeção subcutânea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) ou intraesternal, intratumoral ou técnicas de infusão.

[00169] O termo "ácido nucleico" ou "polinucleotídeo" refere-se a ácidos desoxirribonucleicos (DNA) ou ácidos ribonucleicos (RNA) e seus polímeros na forma de fita simples ou dupla. A menos que especificamente limitado, o termo abrange ácidos nucleicos contendo análogos conhecidos de nucleotídeos naturais que têm propriedades de ligação similares ao ácido nucleico de referência e são metabolizados de forma similar aos nucleotídeos de ocorrência natural. A menos que indicado o contrário, uma sequência de ácido nucleico específica abrange também implicitamente variantes modificadas de forma conservadora desta (*por exemplo*, substituições de códons degenerados), alelos, ortólogos, SNPs e sequências complementares, assim como a sequência indicada explicitamente. Especificamente, as substituições degeneradas de códons podem ser alcançadas gerando sequências nas quais a terceira posição de um ou mais códons selecionados (ou todos) é substituída com base mista e/ou resíduos de desoxinossina (Batzet et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); e Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

[00170] Os termos "peptídeo", "polipeptídeo" e "proteína" são utilizados de forma intercambiável, e referem-se a um composto formado por resíduos de aminoácidos ligados de forma covalente através de ligações peptídicas. Uma proteína ou peptídeo deve conter pelo menos dois aminoácidos, e nenhuma limitação é colocada sobre o número máximo de aminoácidos que podem compreender uma sequência da proteína ou do peptídeo. Os polipeptídeos incluem qualquer peptídeo ou proteína, compreendendo dois ou mais aminoácidos unidos uns aos outros por ligações peptídicas. Conforme usado neste documento, o termo refere-se a ambas as cadeias curtas, que também são comumente referidas na técnica como peptídeos, oligopeptídeos e oligômeros, por exemplo, e para cadeias mais longas, que geralmente são referidas na técnica como proteínas, das quais há muitos tipos. "Polipeptídeos" incluem, por exemplo, fragmentos biologicamente ativos, polipeptídeos substancialmente homólogos, oligopeptídeos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipeptídeos, polipeptídeos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusão, entre outros. Um polipeptídeo inclui um peptídeo natural, um peptídeo recombinante ou uma combinação destes.

[00171] O termo "promotor" refere-se a uma sequência de DNA reconhecida pela maquinaria de transcrição da célula, ou maquinaria sintética introduzida, que pode iniciar a transcrição específica de uma sequência de polinucleotídeo.

[00172] O termo "sequência promotora/reguladora" refere-se a uma sequência de ácido nucleico que pode ser usada para a expressão de um produto gênico operacionalmente ligado ao promotor/sequência reguladora. Em alguns casos, esta sequência pode ser uma sequência promotora de núcleo e, em outros casos, esta sequência pode também incluir uma sequência potencializadora e outros elementos reguladores que são necessários para a expressão do produto do gene. A sequência promotora/reguladora pode, por exemplo, ser uma que expressa o produto do gene de maneira específica de tecido.

[00173] O termo promotor "constitutivo" refere-se a uma sequência de nucleótidos que, quando operativamente ligada com um polinucleotídeo que codifica ou especifica um produto do gene, faz com que o produto do gene seja produzido em uma célula sob a maioria ou todas as condições fisiológicas da célula.

[00174] O termo promotor "induzível" refere-se a uma sequência de nucleotídeos que, quando operativamente ligada com um polinucleotídeo que

codifica ou especifica um produto do gene, faz com que o produto do gene seja produzido em uma célula substancialmente apenas quando um indutor que corresponde ao promotor está presente na célula.

[00175] O termo promotor "específico de tecido" refere-se a uma sequência nucleotídica que, quando operacionalmente ligada com um polinucleotídeo, codifica ou especificada por um gene, faz com que o produto do gene seja produzido em uma célula substancialmente apenas se a célula for uma célula do tipo de tecido correspondente ao promotor.

[00176] Os termos "ligante" e "ligante polipeptídico flexível", conforme usados no contexto de um scFv, referem-se a um ligante peptídico que consiste em aminoácidos, como glicina e/ou resíduos de serina usados isoladamente ou em combinação, para ligar peso variável e luz variável regiões de cadeia juntas. Em uma modalidade, o ligante polipeptídico flexível é um ligante Gly/Ser e compreende a sequência de aminoácidos (Gly-Gly-Gly-Ser)_n, onde n é um número inteiro positivo igual ou maior que 1. Por exemplo, n = 1, n = 2, n = 3, n = 4, n = 5, n = 6, n = 7, n = 8, n = 9 e n = 10. Em uma modalidade, os ligantes polipeptídicos flexíveis incluem, mas não estão limitados a, (Gly₄Ser)₄ ou (Gly₄Ser)₃. Em outra modalidade, os ligantes incluem múltiplas repetições de (Gly₂Ser), (GlySer) ou (Gly₃Ser). Também são incluídas no escopo da invenção ligações descritas em WO2012/138475 (incorporadas neste documento como referência). Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico compreende uma sequência de ligante peptídico longa (LL). Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico longa compreende (G₄S)_n, em que n = 2 a 4. Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico compreende uma sequência de ligante peptídico curta (SL). Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico curta compreende (G₄S)_n, em que n = 1 a 3.

[00177] Tal conforme usado utilizado neste documento, uma extremidade 5' (cap) (também denominada uma extremidade de RNA, uma extremidade de 7-metilguanossina de RNA ou uma extremidade de m⁷G de RNA) é um nucleotídeo de guanina modificado que foi adicionado à extremidade "frontal" ou 5' de um RNA mensageiro eucariótico pouco depois do início da transcrição. A extremidade 5' consiste em um grupo terminal que está ligado ao primeiro nucleotídeo transcrito. Sua presença é crítica para o reconhecimento pelo ribossoma e proteção contra

RNases. A adição de cap é acoplada à transcrição, e ocorre co-transcricionalmente, de modo que cada uma influencie a outra. Pouco depois do início da transcrição, a extremidade 5' do mRNA sendo sintetizado está ligada por um complexo de síntese de extremidade associado à RNA polimerase. Este complexo enzimático catalisa as reações químicas que podem ser necessárias para o capping do mRNA. A síntese prossegue como uma reação bioquímica de várias etapas. A fração de capping pode ser modificada para modular a funcionalidade do mRNA, tal como a sua estabilidade ou eficiência da tradução.

[00178] Tal conforme usado neste documento, "RNA transcrito *in vitro* " refere-se ao RNA, preferencialmente mRNA, o qual foi sintetizado *in vitro*. Geralmente, o RNA transcrito *in vitro* é gerado a partir de um vetor de transcrição *in vitro*. O vetor de transcrição *in vitro* compreende um modelo que é usado para gerar o RNA transcrito *in vitro*.

[00179] Conforme usado neste documento, um "poli(A)" é uma série de adenosinas ligadas por poliadenilação ao mRNA. Na modalidade preferencial de um construto para expressão transitória, o poliA está entre 50 e 5000, preferencialmente superior a 64, mais preferencialmente superior a 100, mais preferencialmente superior a 300 ou 400. As sequências poli(A) podem ser química ou enzimaticamente modificadas para modular a funcionalidade de mRNA, tal como localização, estabilidade ou eficiência da tradução.

[00180] Conforme usado neste documento, "poliadenilação" refere-se à ligação covalente de uma fração de poliadenilil ou sua variante modificada a uma molécula de RNA mensageiro. Em organismos eucarióticos, a maioria das moléculas de RNA mensageiro (mRNA) são poliadeniladas na extremidade 3'. A cauda de poli(A) 3' é uma sequência longa de nucleotídeos de adenina (frequentemente várias centenas) adicionada ao pré-mRNA através da ação de uma enzima, poliadenilato-polimerase. Nos eucariotas superiores, a cauda de poli(A) é adicionada a transcritos que contêm uma sequência específica, o sinal de poliadenilação. A cauda de poli(A) e a proteína a ela ligada ajudam a proteger o mRNA da degradação por exonucleases. A poliadenilação também é importante para o término da transcrição, exportação do mRNA do núcleo e tradução. A poliadenilação ocorre no núcleo imediatamente após a transcrição de DNA em RNA, mas, adicionalmente, também pode ocorrer posteriormente no citoplasma.

Após o término da transcrição, a cadeia de mRNA é clivada pela ação de um complexo de endonuclease associado à RNA polimerase. O sítio de clivagem é geralmente caracterizado pela presença da sequência de base AAUAAA perto do sítio de clivagem. Depois de o mRNA ter sido clivado, os resíduos de adenosina são adicionados à extremidade 3' livre no sítio de clivagem.

[00181] Tal conforme usado neste documento, "transitório" refere-se à expressão de um transgene não integrado durante um período de horas, dias ou semanas, em que o período de tempo de expressão é inferior ao período de tempo para a expressão do gene se integrado no genoma ou contido dentro de um replicon de plasmídeo estável na célula hospedeira.

[00182] O termo "via de transdução de sinal" refere-se à relação bioquímica entre uma variedade de moléculas de transdução de sinal que desempenham uma função na transmissão de um sinal de uma porção de uma célula para outra porção de uma célula. A frase "receptor de superfície celular" inclui moléculas e complexos de moléculas capazes de receber um sinal e transmitir um sinal através da membrana de uma célula.

[00183] O termo "sujeito" destina-se a incluir organismos vivos em que uma resposta imune pode ser induzida (*por exemplo*, mamíferos, humanos).

[00184] O termo, uma célula "substancialmente purificada" refere-se a uma célula que é essencialmente livre de outros tipos de células. Uma célula substancialmente purificada também se refere a uma célula que foi separada de outros tipos de células com os quais normalmente está associada no seu estado de ocorrência natural. Em alguns casos, uma população de células substancialmente purificadas refere-se a uma população homogênea de células. Em outros casos, este termo refere-se simplesmente a células que foram separadas das células com as quais elas estão naturalmente associadas em seu estado natural. Em alguns aspectos, as células são cultivadas *in vitro*. Em outros aspectos, as células não são cultivadas *in vitro*.

[00185] O termo "terapêutico", tal conforme usado neste documento, significa um tratamento. Um efeito terapêutico é obtido pela redução, supressão, remissão ou erradicação de um estado de doença.

[00186] O termo "profilaxia", tal conforme usado neste documento, significa a prevenção ou tratamento protetor para uma doença ou estado de doença.

[00187] No contexto da presente invenção, "antígeno tumoral", ou "antígeno de distúrbio hiperproliferativo" ou "antígeno associado a um distúrbio hiperproliferativo" refere-se a antígenos que são comuns a distúrbios hiperproliferativos específicos. Em certos aspectos, os antígenos do distúrbio hiperproliferativo da presente invenção são derivados de, cânceres, incluindo, mas não se limitando a, melanoma primário ou metastático, glioblastoma, mesotelioma, carcinoma de células renais, câncer de estômago, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer cervical, câncer de cérebro, câncer de fígado, câncer de pâncreas, rim, endométrio e câncer de estômago.

[00188] Em algumas modalidades, a doença é um câncer selecionado do grupo que consiste em mesotelioma, glioblastoma, adenocarcinoma papilífero seroso de ovário, carcinoma de células claras de ovário, carcinoma de ovário de Muller misto, carcinoma de ovário endometroide mucinoso, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma ductal pancreático, carcinoma uterino seroso, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma ductal biliar extra-hepático, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma esofágico, adenocarcinoma colorretal, adenocarcinoma de mama, uma doença associada à expressão de MUC16, IL13R α 2 ou MSLN e qualquer combinação destes.

[00189] O termo "transfectado", ou "transformado" ou "transduzido" refere-se a um processo pelo qual o ácido nucleico exógeno é transferido ou introduzido na célula hospedeira. Uma célula "transfectada" ou "transformada" ou "transduzida" é uma que foi transfectada, transformada ou transduzida com ácido nucleico exógeno. A célula inclui a célula do sujeito primária e sua progênie.

[00190] O termo "se liga especificamente" refere-se a um anticorpo, um fragmento de anticorpo ou um ligante específico, o qual reconhece e se liga a um parceiro de ligação cognato (*por exemplo*, MUC16, IL13R α 2, ou MSLN) presente em uma amostra, mas que não necessariamente e substancialmente reconhece ou liga outras moléculas na amostra.

[00191] Faixas: ao longo de toda esta divulgação, vários aspectos da presente divulgação podem ser apresentados em um formato de faixa. Deve-se entender que a descrição em formato de faixa é simplesmente por conveniência e brevidade e não deve ser interpretada como uma limitação inflexível sobre o escopo

da presente divulgação. Consequentemente, a descrição de uma faixa deve ser considerada como tendo divulgado especificamente todas as sub-faixas possíveis, bem como valores numéricos individuais nessa faixa. Por exemplo, a descrição de uma faixa como de 1 a 6 deve ser considerada como tendo subfaixas especificamente divulgadas, como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., bem como números individuais dentro dessa faixa, por exemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 e 6. Como outro exemplo, uma faixa como 95-99% de identidade inclui algo com 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade e inclui subfaixas, como 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% e 98-99% de identidade. Isto se aplica independentemente da amplitude da faixa.

DESCRIÇÃO

[00192] São fornecidas neste documento composições de matéria e métodos de utilização para o tratamento de uma doença, tal como câncer, utilizando proteínas de fusão de receptores de células T (TCR). Tal conforme usado neste documento, uma "proteína de fusão de receptor de células T (TCR)" ou "TFP" inclui um polipeptídeo recombinante derivado dos vários polipeptídeos compreendendo o TCR que é, em geral, capaz de i) se ligar a um antígeno de superfície em células-alvo e ii) interagir com outros componentes de polipeptídeo do complexo de TCR intacto, normalmente quando co-localizado na ou sobre a superfície ou na superfície de uma célula T. Conforme fornecido neste documento, TFPs fornecem benefícios substanciais em comparação com os Receptores de Antígenos Quiméricos. O termo "Receptor de Antígeno Quimérico" ou, alternativamente, um "CAR" refere-se a um polipeptídeo recombinante compreendendo um domínio de ligação a antígeno extracelular na forma de um scFv, um domínio transmembrana e domínios de sinalização citoplasmática (também referidos neste documento como "domínios de sinalização intracelulares") compreendendo um domínio de sinalização funcional derivado de uma molécula estimuladora como definido abaixo. Em geral, o domínio de sinalização intracelular central de um CAR é derivado da cadeia CD3 zeta que normalmente é encontrada associada ao complexo TCR. O domínio de sinalização de CD3 zeta pode ser fundido com um ou mais domínios de sinalização funcionais derivados de pelo menos uma molécula co-estimuladora, tal como 4-1BB (ou seja, CD137), CD27 e/ou CD28.

MUC16

[00193] MUC16 é um polipeptídeo antígeno associado a tumor, expresso pelo epitélio da superfície ocular humana na mucosa do brônquio, trompa de Falópio e útero. Uma função proposta do MUC16 pode ser fornecer uma barreira protetora e lubrificante contra partículas e agentes infecciosos nas superfícies mucosas. Altamente polimórfico, MUC16 é composto por três domínios, um domínio N-terminal rico em Ser-/Thr, um domínio de repetição entre onze e mais de 60 repetições em tandem parcialmente conservadas de em média 156 aminoácidos cada, e um domínio de C terminal de não repetição contendo uma sequência transmembrana e uma cauda citoplasmática curta. MUC16 pode ser fortemente O-glicosilado e N-glicosilado. O mRNA que codifica o polipeptídeo MUC16 expresso a partir do gene MUC16 pode ser significativamente, reprodutivelmente e detectavelmente superexpresso em certos tipos de tumores ovarianos, mamários e pancreáticos cancerosos humanos em comparação com os tecidos ovarianos, mamários e pancreáticos humanos normais correspondentes, respectivamente. Uma variedade de tipos independentes e diferentes de amostras de tecido ovariano humano canceroso analisadas quantitativamente para a expressão de MUC16 mostram que o nível de expressão de MUC16 nas amostras cancerosas pode ser variável, com um número significativo de amostras cancerosas mostrando pelo menos 6 vezes (para até um aumento de cerca de 580 vezes) na expressão de MUC16 quando comparado ao nível médio de expressão de MUC16 para o grupo de amostras de tecido ovariano normal analisadas. Em particular, a superexpressão de MUC16 detectável e reproduzível pode ser observada para tipos de câncer de ovário; adenocarcinoma endometriode, cistadenocarcinoma seroso, incluindo adenocarcinoma papilar e de células claras, em comparação com o tecido ovariano normal. Devido à sua superexpressão em certos tumores humanos, o polipeptídeo MUC16 e o ácido nucleico que codifica esse polipeptídeo são alvos para comparações quantitativas e qualitativas entre várias amostras de tecido de mamíferos. Os perfis de expressão do polipeptídeo MUC16 e do ácido nucleico que codifica esse polipeptídeo podem ser explorados para o diagnóstico e tratamento terapêutico de certos tipos de tumores cancerosos em mamíferos.

[00194] CA125 (antígeno de carcinoma 125 (O772P, CA-O772P, CA-125) é uma proteína de derramamento extracelular codificada pelo gene MUC16 e um

marcador sérico usado rotineiramente para monitorar pacientes com câncer de ovário. CA125 é um antígeno de diferenciação do ducto de Muller que é superexpresso nas células epiteliais do câncer de ovário e segregado para o sangue, embora sua expressão possa não estar totalmente confinada ao câncer de ovário. Os níveis séricos de CA125 podem estar elevados em cerca de 80% das pacientes com câncer epitelial de ovário (EOC), mas em menos de 1% das mulheres saudáveis. CA125 é uma glicoproteína gigante semelhante à mucina presente na superfície celular de células tumorais associadas a lectinas de superfície celular de ligação a beta-galactosídeo, que podem ser componentes da matriz extracelular implicada na regulação da adesão celular, apoptose, proliferação celular e progressão do tumor. A alta concentração sérica de CA125 pode ser típica de adenocarcinoma ovariano seroso, ao passo que não é elevada no câncer ovariano mucinoso. CA125 pode não ser recomendado para rastreamento de câncer de ovário porque o nível normal pode não excluir tumor. No entanto, a detecção de CA125 pode ser uma ferramenta padrão no monitoramento do curso clínico e do estado da doença em pacientes com neoplasias malignas confirmadas histologicamente. Numerosos estudos confirmaram a utilidade dos níveis de CA125 no monitoramento do progresso de pacientes com EOC e como um marcador sérico de câncer. Um aumento nos níveis de CA125 geralmente pode preceder a detecção clínica em cerca de 3 meses. Durante a quimioterapia, as alterações nos níveis séricos de CA125 podem se correlacionar com o curso da doença. CA125 pode ser usado como um marcador substituto para a resposta clínica em ensaios de novas drogas. Por outro lado, CA125 pode não ser útil no diagnóstico inicial de EOC por causa de sua elevação em uma série de condições benignas. O anticorpo CA125 específico MAb-B43.13 (oregovomab, OvaRex MAb-B43.13) estava em ensaios clínicos para pacientes com carcinoma de ovário como agente imunoterapêutico.

[00195] MUC16 (CA-125) pode desempenhar um papel no avanço da tumorigênese e na proliferação tumoral por vários mecanismos diferentes. Uma maneira pela qual o MUC16 ajuda o crescimento de tumores pode ser suprimindo a resposta das células assassinas naturais, protegendo assim as células cancerosas da resposta imunológica. Outra evidência de que MUC16 pode proteger as células tumorais do sistema imunológico pode ser a descoberta de que o

domínio de repetição em tandem fortemente glicosilado de MUC16 pode se ligar a galectina-1 (uma proteína imunossupressora). O MUC16 pode participar de interações célula a célula que permitem a metástase de células tumorais. Isso pode ser apoiado por evidências que mostram que o MUC16 pode se ligar seletivamente à mesotelina, uma glicoproteína normalmente expressa pelas células mesoteliais do peritônio (o revestimento da cavidade abdominal). As interações de MUC16 e mesotelina podem fornecer o primeiro passo na invasão das células tumorais do peritônio. A mesotelina também foi encontrada para ser expressa em vários tipos de câncer, incluindo mesotelioma, câncer de ovário e carcinoma de células escamosas. Como a mesotelina também é expressa por células tumorais, o MUC16 e as interações mesoteliais podem ajudar na reunião de outras células tumorais para o local de uma metástase, aumentando assim o tamanho da metástase. As evidências sugerem que a expressão da cauda citoplasmática de MUC16 pode permitir o crescimento das células tumorais, promover a motilidade celular e facilitar a invasão. Isso parece ser devido à capacidade do domínio C-terminal de MUC16 de facilitar a sinalização que leva a uma diminuição na expressão de E-caderina e aumentar a expressão de N-caderina e vimentina, que podem ser padrões de expressão consistentes com transição epitelial-mesenquimal. O MUC16 também pode desempenhar um papel na redução da sensibilidade das células cancerosas à terapia de drogas. Por exemplo, a superexpressão de MUC16 pode proteger as células dos efeitos de drogas genotóxicas, como a cisplatina.

IL13R α 2

[00196] A interleucina-13 é um regulador do microambiente imunológico durante uma resposta imunológica em condições fisiológicas normais e também no câncer. IL-13 liga-se a dois receptores diferentes IL13R α 1 e IL13R α 2. Na maioria das células, a IL-13 se liga ao monômero do receptor IL13R α 1 com baixa afinidade e se liga a IL4Ra para formar um complexo de heterodímero que leva à ativação da via a jusante do transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT) 6. A IL-13 se liga ao receptor IL13R α 2 em algumas células normais, como as células do testículo, mas também se liga ao receptor IL13R α 2 em células cancerosas com alta afinidade.

[00197] O transcrito de RNA para o gene IL13R α 2 que está localizado em Xq13.1-q28 codifica uma proteína de 380 aminoácidos que inclui uma sequência

de sinalização de 26 aminoácidos e um domínio intracelular curto de 17 aminoácidos. Em uma célula de glioblastoma, IL13R α 2 expressa até 30.000 sítios de ligação para a proteína IL-13.

[00198] Uma função proposta de IL13R α 2 é como um receptor chamariz que leva ao sequestro de IL-13 para longe de IL13R α 1. Como IL13R α 2 se liga a IL-13 disponível com maior afinidade e fornece mais sítios de ligação em comparação com IL13R α 1, o sequestro de IL-13 é promovido nas células. Em células normais, a ligação de IL-13 a IL13R α 1 ativa STAT6, que se transloca para o núcleo, onde exerce controle transcricional sobre genes contendo o promotor específico de parada de crescimento de N6, como 15-lipooxigenase-1. Isso pode levar à apoptose por meio do aumento da atividade da caspase-3. O sequestro de IL-13 pode, portanto, ser um mecanismo de escape de apoptose de células tumorais. Outra função proposta de IL13R α 2 é o bloqueio de IL13R α 1 por IL13R α 2 por bloqueio físico do docking de STAT6 ao receptor. A falta de docking STAT6 impede a ativação a jusante da apoptose. IL13R α 2 também induz a regulação positiva de STAT3 e linfoma 2 de células B em células de glioma.

[00199] IL13R α 2 é expresso em células iniciadoras de glioma e é expresso em cerca de 58% dos tumores cerebrais adultos e cerca de 83% dos pediátricos. Em cânceres de ovário e pancreático, promove a invasão e metástase através da via da proteína quinase/ativadora regulada por sinal extracelular 1. A expressão de IL13R α 2 em células imunológicas, como células supressoras derivadas de mielóide, também promove o escape imunológico do tumor e a progressão por meio de suprarregulação da transformação fator de crescimento β . A expressão aumentada de IL13R α 2 pode promover a progressão do tumor em glioma e outros modelos de tumor. A expressão de IL13R α 2 aumenta com o grau de malignidade do glioma e, portanto, pode fornecer um indicador de prognóstico para a sobrevivência do paciente. Os perfis de expressão do polipeptídeo IL13R α 2 e do ácido nucleico que codifica esse polipeptídeo podem ser explorados para o diagnóstico e tratamento terapêutico de certos tipos de tumores cancerígenos em mamíferos.

Proteínas de fusão (TFP) do receptor de células T (TCR)

[00200] A presente divulgação engloba construtos de DNA recombinante que codificam TFPs, em que a TFP compreende um fragmento de anticorpo que se liga especificamente a MUC16, IL13R α 2, ou MSLN, *por exemplo*, MUC16, IL13R α 2,

ou MSLN humano, em que a sequência do fragmento de anticorpo é contígua com e no mesmo quadro de leitura como uma sequência de ácido nucleico que codifica uma subunidade de TCR ou uma porção desta. As TFPs fornecidas neste documento são capazes de se associar a uma ou mais subunidades de TCR endógenas (ou, alternativamente, uma ou mais exógenas, ou uma combinação de endógenas e exógenas) para formar um complexo de TCR funcional.

[00201] Em um aspecto, a TFP da presente divulgação compreende um elemento de ligação de alvo específico, de outra forma, referido como um domínio de ligação a antígeno. A escolha da fração depende do tipo e número do antígeno-alvo que define a superfície de uma célula-alvo. Por exemplo, o domínio de ligação ao antígeno pode ser escolhido para reconhecer um antígeno-alvo que atua como um marcador de superfície celular em células alvo associadas a um estado de doença em particular. Assim, exemplos de marcadores de superfície celular que podem atuar como antígenos-alvo para o domínio de ligação a antígeno em uma TFP da invenção incluem aqueles associados a infecções virais, bacterianas e parasitárias; doenças autoimunes; e doenças cancerígenas (*por exemplo*, doenças malignas).

[00202] Em um aspecto, a resposta das células T mediada por TFP pode ser direcionada a um antígeno de interesse por meio da manipulação de um domínio de ligação a antígeno na TFP que se liga especificamente a um antígeno desejado.

[00203] Em um aspecto, a porção da TFP que compreende o domínio de ligação ao antígeno compreende um domínio de ligação a antígeno que visa MUC16, IL13R α 2 ou MSLN. Em um aspecto, o domínio de ligação ao antígeno tem como alvo MUC16, IL13R α 2 ou MSLN humano

[00204] O domínio de ligação ao antígeno pode ser qualquer domínio que se liga ao antígeno, incluindo, mas não limitado a, um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo recombinante, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado e um fragmento funcional deste, incluindo, mas não limitado a, um anticorpo de domínio único, tal como um domínio variável de cadeia pesada (V_H), um domínio variável de cadeia leve (V_L) e um domínio variável (V_{HH}) de um nanocorpo derivado de camélídeo, e a um suporte alternativo conhecido na técnica para funcionar como domínio de ligação a antígeno, tal como um domínio de fibronectina recombinante, anticalina, DARPIN e similares. Da mesma forma, um

ligante natural ou sintético que reconhece e se liga especificamente ao antígeno-alvo pode ser usado como domínio de ligação a antígeno para a TFP. Em alguns casos, é benéfico que o domínio de ligação a antígeno seja derivado da mesma espécie em que a TFP será finalmente utilizada. Por exemplo, para utilização em seres humanos, pode ser benéfico que o domínio de ligação a antígeno da TFP compreenda resíduos humanos ou humanizados para o domínio de ligação a antígeno de um anticorpo ou fragmento de anticorpo.

[00205] Assim, em um aspecto, o domínio de ligação ao antígeno compreende um anticorpo humanizado ou humano ou um fragmento de anticorpo, ou um anticorpo camélideo ou fragmento de anticorpo ou um anticorpo murino ou fragmento de anticorpo. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-TAA humano ou humanizado compreende um ou mais (*por exemplo*, todas as três) regiões de determinação complementares de cadeia leve 1 (LC CDR1), regiões de determinação complementares de cadeia leve 2 (LC CDR2) e regiões de determinação complementares de cadeia leve 3 (LC CDR3) de um domínio de ligação anti-TAA humano ou humanizado descrito neste documento, e/ou um ou mais (*por exemplo*, todas as três) regiões de determinação complementares de cadeia pesada 1 (HC CDR1), regiões de determinação complementares de cadeia pesada 2 (HC CDR2) e regiões de determinação complementares de cadeia pesada 3 (HC CDR3) de um domínio de ligação anti-TAA humano ou humanizado descrito neste documento, *por exemplo*, um domínio de ligação anti-TAA humano ou humanizado compreendendo um ou mais, *por exemplo*, todas as três, LC CDRs e um ou mais, *por exemplo*, todas as três, HC CDRs. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-TAA humano ou humanizado compreende um ou mais (*por exemplo*, todas as três) regiões de determinação complementares de cadeia pesada 1 (HC CDR1), regiões de determinação complementares de cadeia pesada 2 (HC CDR2) e regiões de determinação complementares de cadeia pesada 3 (HC CDR3) de um domínio de ligação anti-TAA humano ou humanizado descrito neste documento, *por exemplo*, o domínio de ligação anti-TAA humano ou humanizado tem duas regiões de cadeia pesada variáveis, cada uma compreendendo uma HC CDR1, uma HC CDR2 e uma HC CDR3 descrita neste documento. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-TAA humano ou humanizado compreende uma região variável de cadeia leve humana ou humanizada descrita neste

documento e/ou uma região variável de cadeia pesada humana ou humanizada descrita neste documento. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-TAA humano ou humanizado compreende uma região variável de cadeia pesada humanizada descrita neste documento, *por exemplo*, pelo menos duas regiões variáveis de cadeia pesada humanas ou humanizadas descritas neste documento. Numa modalidade, o domínio de ligação ao anti-TAA é um scFv compreendendo uma cadeia leve e uma cadeia pesada de uma sequência de aminoácidos fornecida neste documento. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-TAA (*por exemplo*, um scFv) compreende: uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos uma, duas ou três modificações (*por exemplo*, substituições), mas não mais do que 30, 20 ou 10 modificações (*por exemplo*, substituições) de uma sequência de aminoácidos de uma região variável de cadeia leve fornecida neste documento, ou uma sequência com 95-99% de identidade com uma sequência de aminoácidos fornecida neste documento; e/ou uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos uma, duas ou três modificações (*por exemplo*, substituições), mas não mais do que 30, 20 ou 10 modificações (*por exemplo*, substituições) de uma sequência de aminoácidos de uma região variável de cadeia pesada provida neste documento, ou uma sequência com 95-99% de identidade com uma sequência de aminoácidos fornecida neste documento. Em uma modalidade, o domínio de ligação humanizado ou humano ao anti-TAA é um scFv e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos descrita neste documento, é fixada a uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos descrita neste documento, através de um ligante peptídico, *por exemplo*, um ligante peptídico descrito neste documento. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-TAA humanizado inclui um ligante peptídico $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_n$, em que n é 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, de preferência 3 ou 4. A região variável de cadeia leve e a cadeia pesada região variável de um scFv pode ser, *por exemplo*, em qualquer uma das seguintes orientações: região variável de cadeia leve-ligante-região variável de cadeia pesada ou região variável de cadeia pesada-ligante-região variável de cadeia leve. Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico compreende uma sequência de ligante peptídico longa (LL). Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico longa compreende

(G₄S)_n, em que n = 2 a 4. Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico compreende uma sequência de ligante peptídico curta (SL). Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico curta compreende (G₄S)_n, em que n = 1 a 3.

[00206] Em alguns aspectos, um anticorpo não humano é humanizado, em que sequências ou regiões específicas do anticorpo são modificadas para aumentar a similaridade com um anticorpo produzido naturalmente em um humano ou um fragmento deste. Em um aspecto, o domínio de ligação a antígeno é humanizado.

[00207] Um anticorpo humanizado pode ser produzido usando uma variedade de técnicas conhecidas na técnica, incluindo, mas não se limitando a, enxerto de CDR (ver, *por exemplo*, Patente Europeia nº EP 239.400; Publicação Internacional nº WO 91/09967; e Patente U.S. nºs 5.225.539, 5.530.101 e 5.585.089, cada um dos quais é incorporado neste documento em sua totalidade por referência), estratificação ou recapeamento (ver, *por exemplo*, Patentes Europeias nºs EP 592.106 e EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28 (4 / 5): 489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7 (6): 805-814; e Roguska et al., 1994, *PNAS*, 91: 969-973, cada um dos quais é incorporado neste documento por sua totalidade por referência), embaralhamento de cadeia (ver, *por exemplo*, a Patente U.S. 5.565.332, que é incorporada neste documento em sua totalidade por referência), e as técnicas divulgadas, *por exemplo*, na Publicação de Pedido de Patente U.S. nº US2005 / 0042664, Patente U.S. Publicação do pedido nº US2005/0048617, U.S. Pat. nº 6.407.213, U.S. Pat. nº 5.766.886, Publicação Internacional nº WO 9317105, Tan et al., *J. Immunol.*, 169: 1119-25 (2002), Caldas et al., *Protein Eng.*, 13 (5): 353-60 (2000), Morea et al., *Methods*, 20 (3): 267-79 (2000), Baca et al., *J. Biol. Chem.*, 272 (16): 10678-84 (1997), Roguska et al., *Protein Eng.*, 9 (10): 895-904 (1996), Couto et al., *Cancer Res.*, 55 (23 Supp): 5973s-5977s (1995), Couto et al., *Cancer Res.*, 55 (8): 1717-22 (1995), Sandhu JS, *Gene*, 150 (2): 409-10 (1994), e Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235 (3): 959-73 (1994), cada um dos quais é incorporado neste documento na sua totalidade por referência. Frequentemente, os resíduos de framework nas regiões de framework serão substituídos com o resíduo correspondente do anticorpo doador de CDR para alterar, por exemplo, melhorar a ligação de antígeno. Essas substituições de framework são identificadas por métodos bem conhecidos na técnica, *por exemplo*, por modelagem das interações do CDR e resíduos de framework para identificar

resíduos de framework importantes para a ligação de antígeno e comparação de sequência para identificar resíduos de framework incomuns em posições particulares (ver, *por exemplo*, Queen et al., Patente U.S. 5.585.089; e Riechmann et al., 1988, Nature, 332: 323, que são incorporados neste documento por referência na sua totalidade.)

[00208] Um anticorpo humanizado ou fragmento de anticorpo tem um ou mais resíduos de aminoácido que permanecem nele a partir de uma fonte que não é humana. Esses resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente denominados resíduos de "importação", os quais são tomados normalmente a partir de um domínio variável de "importação". Conforme fornecido neste documento, os anticorpos humanizados ou fragmentos de anticorpo compreendem uma ou mais CDRs de moléculas de imunoglobulina não humanas e regiões de framework, em que os resíduos de aminoácidos compreendendo a framework são derivados completa ou principalmente de linhagem germinal humana. Múltiplas técnicas para humanização de anticorpos ou fragmentos de anticorpos são bem conhecidas na técnica e podem ser essencialmente realizadas seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)), substituindo CDRs de roedor ou sequências de CDR pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano, ou seja, CDR- enxerto (EP 239.400; Publicação PCT nº WO 91/09967; e Patentes U.S. nºs 4.816.567; 6.331.415; 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 6.548.640, cujos conteúdos são incorporados neste documento por referência em sua totalidade). Em tais anticorpos humanizados e fragmentos de anticorpo, substancialmente inferior a um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Anticorpos humanizados são anticorpos frequentemente humanos, em que alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de framework (FR) são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores. A humanização de anticorpos e fragmentos de anticorpos também pode ser alcançada por estratificação ou recapeamento (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28 (4/5): 489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7 (6): 805-814 (1994); e Roguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994)) ou embaralhamento de cadeia (Patente U.S. 5.565.332), cujos conteúdos são

incorporados neste documento por referência na sua totalidade.

[00209] A escolha de domínios variáveis humanos, tanto leves quanto pesados, para serem usados na fabricação de anticorpos humanizados é para reduzir a antigenicidade. De acordo com o denominado método de "melhor ajuste", a sequência de domínio variável de um anticorpo de roedor é testada contra toda a biblioteca das sequências de domínio variável humano conhecidas. A sequência humana que está mais próxima da do roedor é então aceita como a framework humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims et al., J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901 (1987), cujos conteúdos são incorporados neste documento por referência na sua totalidade). Outro método usa um framework particular derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias leves ou pesadas. O mesmo framework pode ser usado para vários anticorpos humanizados diferentes (ver, *por exemplo*, Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 89: 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151: 2623 (1993), cujos conteúdos são incorporados neste documento por referência na sua totalidade). Em algumas modalidades, a região de framework, *por exemplo*, todas as quatro regiões de framework, da região variável de cadeia pesada é derivada de uma sequência de linhagem germinal VH4-4-59. Em uma modalidade, a região framework pode compreender uma, duas, três, quatro ou cinco modificações, *por exemplo*, substituições, *por exemplo*, do aminoácido na sequência murina correspondente. Em uma modalidade, a região framework, *por exemplo*, todas as quatro regiões framework, da região variável de cadeia leve são derivadas de uma sequência da linhagem germinal VK3-1.25. Em uma modalidade, a região de framework pode compreender uma, duas, três, quatro ou cinco modificações, *por exemplo*, substituições, *por exemplo*, do aminoácido na sequência murina correspondente.

[00210] Em alguns aspectos, a porção de uma composição de TFP da presente divulgação que compreende um fragmento de anticorpo é humanizada com retenção de alta afinidade para o antígeno alvo e outras propriedades biológicas favoráveis. De acordo com um aspecto da presente divulgação, os anticorpos humanizados e fragmentos de anticorpo são preparados por um processo de análise das sequências de origem e diversos produtos humanizados

conceituais utilizando modelos tridimensionais das sequências de origem e humanizadas. Modelos tridimensionais de imunoglobulina estão comumente disponíveis e são familiares aos versados na técnica. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e exibem estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulina candidatas selecionadas. A inspeção destas exposições permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina do candidato, *por exemplo*, a análise dos resíduos que influenciam a capacidade de imunoglobulina do candidato para ligar p antígeno alvo. Desta forma, os resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências receptoras e de importação, de modo que a característica de anticorpo ou de fragmento de anticorpo desejada, tal como afinidade aumentada para o antígeno-alvo, seja atingida. Em geral, os resíduos de CDR estão diretamente e mais substancialmente envolvidos em influenciar a ligação ao antígeno.

[00211] Um anticorpo humanizado ou fragmento de anticorpo pode reter uma especificidade antigênica semelhante ao anticorpo original, *por exemplo*, na presente divulgação, a capacidade de se ligar a antígenos associados a tumor humano, tais como MUC16, IL13R α 2 ou MSLN. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado ou fragmento de anticorpo pode ter afinidade melhorada e/ou especificidade de ligação ao MUC16, IL13R α 2 ou MSLN humano.

[00212] Em um aspecto, o domínio de ligação anti-TAA (ou seja, o domínio de ligação MUC16, IL13R α 2 ou MSLN) é caracterizado por características funcionais particulares ou propriedades de um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Por exemplo, em um aspecto, a porção de uma composição de TFP da invenção que compreende um domínio de ligação a antígeno se liga especificamente ao MUC16, IL13R α 2 ou MSLN humano. Em um aspecto, a presente divulgação diz respeito a um domínio de ligação a antígeno compreendendo um anticorpo ou fragmento de anticorpo, em que o domínio de ligação a anticorpo se liga especificamente a uma proteína MUC16, IL13R α 2 ou MSLN ou um fragmento desta, em que o anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende uma cadeia leve variável e/ou uma cadeia pesada variável que inclui uma sequência de aminoácidos fornecida neste documento. Em certos aspectos, o scFv é contíguo e no mesmo quadro de leitura como uma sequência líder.

[00213] Em um aspecto, o domínio de ligação anti-TAA é um fragmento, *por exemplo*, um fragmento de variável de cadeia única (scFv). Em um aspecto, o domínio de ligação anti-TAA é um Fv, um Fab, um (Fab')₂, ou um anticorpo híbrido bi-funcional (*por exemplo*, bi-específico) (*por exemplo*, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). Em um aspecto, os anticorpos e fragmentos dos mesmos divulgados neste documento ligam-se a uma proteína MUC16, IL13R α 2 ou MSN com afinidade aumentada ou de tipo selvagem.

[00214] Também são fornecidos neste documento métodos para obter um domínio de ligação de antígeno de anticorpo específico para um antígeno alvo (*por exemplo*, MUC16, IL13R α 2, MLSN ou qualquer antígeno alvo descrito em outro lugar neste documento para alvos de domínios de ligação de fração de fusão), o método compreendendo fornecer por meio de adição, deleção, substituição ou inserção de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácidos de um domínio V_H estabelecido neste documento um domínio V_H que é uma sequência de aminoácidos variante do domínio V_H, opcionalmente combinando o domínio V_H assim fornecido com um ou mais domínios V_L e teste do domínio V_H ou combinação ou combinações V_H/V_L para identificar um membro de ligação específica ou um domínio de ligação de antígeno de anticorpo específico para um antígeno alvo de interesse (*por exemplo*, MUC16, IL13R α 2, MSLN) e opcionalmente com uma ou mais propriedades desejadas.

[00215] Em alguns casos, os domínios V_H e scFvs podem ser preparados de acordo com o método conhecido na técnica (ver, *por exemplo*, Bird et al., (1988) Science 242: 423-426 e Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). As moléculas de scFv podem ser produzidas ligando as regiões V_H e V_L usando ligantes polipeptídicos flexíveis. As moléculas de scFv compreendem um ligante peptídico (*por exemplo*, um ligante peptídico Ser-Gly) com um comprimento otimizado e/ou composição de aminoácidos. O comprimento do ligante peptídico pode afetar muito como as regiões variáveis de um scFv se dobram e interagem. De fato, se um ligante polipeptídico curto for empregado (*por exemplo*, entre 5-10 aminoácidos), o dobramento intracadeia é evitado. A dobra inter-cadeia também pode ser necessária para ligar as duas regiões variáveis para formar um sítio de ligação de epítipo funcional. Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico compreende uma sequência de ligante peptídico longa (LL). Em alguns casos, a

sequência de ligante peptídico longa compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 2$ a 4 . Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico compreende uma sequência de ligante peptídico curta (SL). Em alguns casos, a sequência do ligante peptídico curta compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 1$ a 3 . Para exemplos de orientação e tamanho do ligante peptídico, ver, *por exemplo*, Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. USA 90: 6444-6448, Patente U.S. nº 7.695.936, Publicação de Pedido de Patente U.S. nº 20050100543 e 20050175606 e Publicação PCT nº WO2006/020258 e WO2007/024715, todas incorporadas neste documento por referência.

[00216] Um scFv pode compreender um ligante peptídico de cerca de 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou mais do que 15 resíduos entre suas regiões V_L e V_H . A sequência do ligante peptídico pode compreender qualquer aminoácido de ocorrência natural. Em algumas modalidades, a sequência do ligante peptídico compreende aminoácidos glicina e serina. Em outra modalidade, a sequência do ligante peptídico compreende conjuntos de repetições de glicina e serina, tais como $(Gly_4Ser)_n$, onde n é um número inteiro positivo igual ou superior a 1. Em uma modalidade, o ligante peptídico pode ser $(Gly_4Ser)_4$ ou $(Gly_4Ser)_3$. A variação no comprimento do ligante peptídico pode reter ou aumentar a atividade, dando origem a uma eficácia superior em estudos de atividade. Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico compreende uma sequência de ligante peptídico longa (LL). Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico longa compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 2$ a 4 . Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico compreende uma sequência de ligante peptídico curta (SL). Em alguns casos, a sequência de ligante peptídico curta compreende $(G_4S)_n$, em que $n = 1$ a 3 .

Estabilidade e Mutações

[00217] A estabilidade de um domínio de ligação anti-TAA, *por exemplo*, moléculas de scFv (*por exemplo*, scFv solúvel) podem ser avaliadas em referência às propriedades biofísicas (*por exemplo*, estabilidade térmica) de uma molécula de scFv de controle convencional ou um anticorpo de comprimento total. Em uma modalidade, o scFv humano ou humanizado tem uma estabilidade térmica que é superior a cerca de 0,1, cerca de 0,25, cerca de 0,5, cerca de 0,75, cerca de 1, cerca de 1,25, cerca de 1,5, cerca de 1,75, cerca de 2, cerca de 2,5, cerca de 3, cerca de 3,5, cerca de 4, cerca de 4,5, cerca de 5, cerca de 5,5, cerca de 6, cerca de 6,5, cerca de 7, cerca de 7,5, cerca de 8, cerca de 8,5, cerca de 9, cerca de 9,5,

cerca de 10 graus, cerca de 11 graus, cerca de 12 graus, cerca de 13 graus, cerca de 14 graus ou cerca de 15 graus Celsius do que um scFv de origem nos ensaios descritos.

[00218] A estabilidade térmica melhorada do domínio de ligação anti-TAA, *por exemplo*, o scFv é posteriormente conferido a todo o construto de TAA-TFP, levando a propriedades terapêuticas melhoradas do construto de TFP anti-TAA. A estabilidade térmica do domínio de ligação anti-TAA, *por exemplo*, o scFv pode ser melhorado em pelo menos cerca de 2°C ou 3°C em comparação com um anticorpo convencional. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-TAA, *por exemplo*, o scFv tem uma estabilidade térmica melhorada de 1°C em comparação com um anticorpo convencional. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-TAA, *por exemplo*, o scFv tem uma estabilidade térmica melhorada de 2°C em comparação com um anticorpo convencional. Em outra modalidade, o scFv tem uma estabilidade térmica melhorada de 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C ou 15 °C em comparação com um anticorpo convencional. As comparações podem ser produzidas, por exemplo, entre as moléculas scFv, divulgadas neste documento, e as moléculas scFv ou fragmentos Fab de um anticorpo, a partir do qual o scFv V_H e V_L foram derivados. A estabilidade térmica pode ser medida usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma modalidade, T_M pode ser medido. Métodos para medir T_M e outros métodos para determinar a estabilidade da proteína são descritos abaixo.

[00219] As mutações em scFv (decorrentes da humanização ou mutagênese do scFv solúvel) alteram a estabilidade do scFv e melhoram a estabilidade geral do scFv e do construto anti-TAA TFP. A estabilidade do scFv humanizado é comparada com o scFv murino usando medições como T_M, desnaturação de temperatura e agregação de temperatura. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-TAA, *por exemplo*, um scFv, compreende pelo menos uma mutação decorrente do processo de humanização, de modo que o scFv mutado confere estabilidade melhorada ao construto anti-TAA TFP. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-TAA, *por exemplo*, o scFv compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mutações decorrentes do processo de humanização de modo que o scFv mutado confere estabilidade melhorada ao construto anti-TAA-TFP.

[00220] Em um aspecto, o domínio de ligação ao antígeno da TFP

compreende uma sequência de aminoácidos que é homóloga a uma sequência de aminoácidos do domínio de ligação ao antígeno, descrita neste documento, e o domínio de ligação ao antígeno retém as propriedades funcionais desejadas dos fragmentos de anticorpo anti-TAA, descritos neste documento. Em um aspecto específico, a composição de TFP da invenção compreende um fragmento de anticorpo. Em um aspecto adicional, esse fragmento de anticorpo compreende um scFv.

[00221] Em vários aspectos, o domínio de ligação ao antígeno do TFP é manipulado modificando um ou mais aminoácidos no interior de uma ou ambas as regiões variáveis (*por exemplo*, V_H e/ou V_L), *por exemplo*, no interior de uma ou mais regiões CDR e/ou no interior de uma ou mais regiões framework. Em um aspecto específico, a composição de TFP da invenção compreende um fragmento de anticorpo. Em um aspecto adicional, esse fragmento de anticorpo compreende um scFv.

[00222] Será entendido por uma pessoa de conhecimento comum à técnica que o anticorpo ou fragmento de anticorpo da presente divulgação pode ser adicionalmente modificado, de modo que varie na sequência de aminoácidos (*por exemplo*, do tipo selvagem), mas não na atividade desejada. *Por exemplo*, as substituições de nucleotídeos adicionais que levam a substituições de aminoácidos, em resíduos de aminoácidos "não essenciais", podem ser produzidas para a proteína. *Por exemplo*, um resíduo de aminoácidos não essencial em uma molécula pode ser substituído por outro resíduo de aminoácido da mesma família da cadeia lateral. Em outra modalidade, uma sequência de aminoácidos pode ser substituída por uma sequência estruturalmente semelhante que difere na ordem e/ou composição dos membros da família da cadeia lateral, *por exemplo*, pode ser feita uma substituição conservativa em que um resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido, tendo uma cadeia lateral semelhante.

[00223] As famílias de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais semelhantes foram definidas na técnica, incluindo cadeias laterais básicas (*por exemplo*, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (*por exemplo*, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (*por exemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (*por exemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina,

metionina, triptofano), cadeias laterais ramificadas beta (*por exemplo*, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (*por exemplo*, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).

[00224] A identidade percentual no contexto de dois ou mais ácidos nucleicos ou sequências de polipeptídeo refere-se a duas ou mais sequências que são iguais. Duas sequências são "substancialmente idênticas" se duas sequências têm uma porcentagem especificada de resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos que são iguais (*por exemplo*, 60% de identidade, opcionalmente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade em uma região especificada, ou, quando não especificado, em toda a sequência), quando comparada e alinhada para correspondência máxima em uma janela de comparação, ou região designada conforme medido usando um dos seguintes algoritmos de comparação de sequência ou por alinhamento manual e inspeção visual. Opcionalmente, a identidade existe ao longo de uma região que tem ao menos cerca de 50 nucleotídeos (ou 10 aminoácidos) de comprimento, ou mais preferencialmente ao longo de uma região que tem de 100 a 500 ou 1000 ou mais nucleotídeos (ou 20, 50, 200 ou mais grupos aminoácidos) de comprimento.

[00225] Para comparação de sequências, tipicamente uma sequência atua como uma sequência de referência, com a qual as sequências de teste são comparadas. Ao usar um algoritmo de comparação de sequência, o teste e as sequências de referência são inseridas em um computador, coordenadas de subsequência são projetadas, se necessário, e os parâmetros do programa de algoritmo da sequência são projetadas. Parâmetros de programa padrão podem ser usados, ou parâmetros alternativos podem ser projetados. O algoritmo de comparação de sequência, em seguida, calcula o percentual de identidades de sequência para a sequência de teste em relação à sequência de referência, com base nos parâmetros do programa. Os métodos de alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos na técnica. O alinhamento ideal de sequências para comparação pode ser conduzido, *por exemplo*, pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, por algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443, pela busca pelo método de similaridade de Pearson e Lipman, (1988)

Proc. Nat'l. USA 85: 2444, por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA em Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) ou por alinhamento manual e inspeção visual (ver, *por exemplo*, Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology). Dois exemplos de algoritmos que são adequados para determinar o percentual de identidade de sequência e similaridade de sequência são os algoritmos BLAST e BLAST 2.0, que são descritos em Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; and Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. O programa para realizar análises por BLAST está disponível publicamente através do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia. Os parâmetros do algoritmo para usar o BLAST de nucleotídeos para determinar a identidade da sequência de nucleotídeos podem usar parâmetros de pontuação com uma pontuação de correspondência/incompatibilidade de 1, -2 e em que os custos de lacuna são lineares. O comprimento da sequência que inicia um alinhamento ou o tamanho da palavra em um algoritmo BLAST pode ser definido como 28 para o alinhamento da sequência. Os parâmetros do algoritmo para usar a proteína BLAST para determinar uma identidade de sequência de peptídeo podem usar parâmetros de pontuação com uma matriz BLOSUM62 para atribuir uma pontuação para alinhar pares de resíduos e determinar a pontuação de alinhamento geral, em que os custos de lacuna podem ter uma penalidade de existência de 11 e uma penalidade de extensão de 1. O método de ajuste de matriz para compensar a composição de aminoácidos de sequências pode ser um ajuste de matriz de pontuação de composição condicional. O comprimento da sequência que inicia um alinhamento ou o tamanho da palavra em um algoritmo BLAST pode ser definido como 6 para o alinhamento da sequência.

[00226] Em um aspecto, a presente invenção contempla modificações da sequência de aminoácidos do anticorpo ou fragmento de partida (*por exemplo*, scFv) que geram moléculas funcionalmente equivalentes. Por exemplo, o V_H ou V_L de um domínio de ligação anti-TAA, *por exemplo*, scFv, compreendido no TFP pode ser modificado para reter pelo menos cerca de 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade da região framework V_H ou V_L inicial do domínio de ligação anti-TAA, *por exemplo*, scFv. A

presente invenção contempla modificações de todo o construto de TFP, *por exemplo*, modificações em uma ou mais sequências de aminoácidos dos vários domínios do construto de TFP, a fim de gerar moléculas funcionalmente equivalentes. O construto de TFP pode ser modificado para reter pelo menos cerca de 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade da construção de TFP inicial.

Domínio extracelular

[00227] O domínio extracelular pode ser derivado de uma fonte natural ou de uma fonte recombinante. Onde a fonte é natural, o domínio pode ser derivado de qualquer proteína, mas, em particular, uma proteína ligada à membrana ou transmembrana. Em um aspecto, o domínio extracelular é capaz de se associar ao domínio transmembranar. Um domínio extracelular de uso particular na presente divulgação pode incluir pelo menos a(s) região(ões) extracelular(es) de, *por exemplo*, a cadeia alfa, beta, gama, delta ou zeta do receptor de células T ou CD3 epsilon, CD3 gama ou CD3 delta, ou em modalidades alternativas, um domínio extracelular pode incluir pelo menos o domínio extracelular de CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 ou CD154. Em alguns casos, o domínio extracelular de TCR compreende um domínio extracelular ou porção do mesmo de uma proteína selecionada do grupo que consiste em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 epsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, fragmentos funcionais dos mesmos e sequências de aminoácidos dos mesmos, tendo pelo menos uma, mas não mais que 20 modificações.

Domínio Transmembrana

[00228] Em geral, uma sequência de TFP contém um domínio extracelular e um domínio transmembrana codificado por uma única sequência genômica. Em modalidades alternativas, uma TFP pode ser projetada para compreender um domínio transmembrana que é heterólogo ao domínio extracelular da TFP. Um domínio transmembrana pode incluir um ou mais aminoácidos adicionais adjacentes à região transmembrana, *por exemplo*, um ou mais aminoácidos associados com a região extracelular da proteína da qual a transmembrana foi

derivada (*por exemplo*, pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, ou mais aminoácidos da região extracelular) e/ou um ou mais aminoácidos adicionais associados com a região intracelular da proteína da qual a proteína transmembrana é derivada (*por exemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais aminoácidos da região intracelular). Em alguns casos, o domínio transmembrana pode incluir pelo menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ou mais aminoácidos da região extracelular. Em alguns casos, o domínio transmembrana pode incluir pelo menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ou mais aminoácidos da região intracelular. Em um aspecto, é usado o domínio transmembrana que é aquele associado a um dos outros domínios da TFP. Em alguns casos, os domínios transmembrana podem ser selecionados ou modificados por substituição de aminoácidos para evitar a ligação de tais domínios aos domínios transmembranas das proteínas da membrana de superfície iguais ou diferentes, *por exemplo*, para minimizar as interações com outros membros do complexo receptor. Em um aspecto, o domínio transmembrana é capaz de homodimerização com outro TFP na superfície de células T de TFP. Em um aspecto diferente, a sequência de aminoácidos do domínio transmembrana pode ser modificada ou substituída, de modo a minimizar as interações com os domínios de ligação do parceiro de ligação nativo presente no mesmo TFP.

[00229] O domínio transmembrana pode ser derivado de uma fonte natural ou de uma fonte recombinante. Quando a fonte é natural, o domínio pode ser derivado de qualquer proteína de ligação à membrana ou transmembrana. Em um aspecto, o domínio transmembrana é capaz de sinalizar ao(s) domínio(s) intracelular(es) sempre que a TFP se ligou a um alvo. Em alguns casos, a subunidade TCR compreende um domínio transmembrana que compreende um domínio transmembrana de uma proteína selecionada do grupo que consiste em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, uma cadeia zeta de TCR, uma subunidade CD3 epsilon TCR, uma subunidade CD3 gama TCR, uma subunidade CD3 delta TCR, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, fragmentos funcionais das mesmas, e suas sequências de aminoácidos tendo pelo menos uma, mas não mais do que 20 modificações. Em

alguns casos, o domínio transmembrana pode ser anexado à região extracelular da TFP, *por exemplo, o domínio de ligação ao antígeno da TFP, por exemplo, por meio de uma dobradiça, por exemplo, uma dobradiça de uma proteína humana. Por exemplo, em uma modalidade, a dobradiça pode ser uma dobradiça de imunoglobulina humana (Ig), por exemplo, uma articulação IgG4 ou uma articulação CD8a.*

Ligantes peptídicos

[00230] Opcionalmente, um ligante de oligo ou polipeptídeo curto, entre 2 e 10 aminoácidos de comprimento, pode formar a ligação entre o domínio transmembrana e a região citoplasmática da TFP. Um duplete de glicina-serina fornece um ligante peptídico particularmente adequado. Por exemplo, em um aspecto, o ligante peptídico compreende a sequência de aminoácidos de GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:99). Em algumas modalidades, o ligante peptídico é codificado por uma sequência de nucleotídeos de GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 100). Outros ligantes peptídico exemplares são apresentados na Tabela 4.

Domínio Citoplasmático

[00231] O domínio citoplasmático da TFP pode incluir um domínio de sinalização intracelular, se a TFP contiver polipeptídeos CD3 gama, delta ou épsilon; as subunidades de TCR alfa e TCR beta, em geral, estão ausentes em um domínio de sinalização. Um domínio de sinalização intracelular é, em geral, responsável pela ativação de pelo menos uma das funções efetoras normais da célula imunológica em que a TFP foi introduzida. O termo "função efetora" refere-se a uma função especializada de uma célula. A função efetora de uma célula T, por exemplo, pode ser atividade citolítica ou atividade helper incluindo a secreção de citocinas. Assim, o termo "domínio de sinalização intracelular" refere-se à porção de uma proteína que transduz o sinal da função efetora e direciona a célula para executar uma função especializada. Enquanto normalmente todo o domínio de sinalização intracelular possa ser empregado, em muitos casos não é necessário usar toda a cadeia. Na medida em que uma porção truncada do domínio de sinalização intracelular é usada, essa porção truncada pode ser usada no lugar da cadeia intacta, desde que transduza o sinal da função efetora. O termo domínio de sinalização intracelular pretende, portanto, incluir qualquer porção truncada do

domínio de sinalização intracelular suficiente para transduzir o sinal da função efetora.

[00232] Exemplos de domínios de sinalização intracelular para utilização na TFP da invenção incluem as sequências citoplasmáticas do receptor de células T (TCR) e co-receptores que atuam em conjunto para iniciar a transdução de sinal após o engate de receptor de antígeno, bem como qualquer derivado ou variante dessas sequências e qualquer sequência recombinante que tenha a mesma capacidade funcional.

[00233] Sabe-se que os sinais gerados por meio de TCR sozinho podem ser insuficientes para a ativação completa de células T naive e que um sinal secundário e/ou co-estimulatório pode ser necessário. Assim, pode-se dizer que a ativação de células T naive é mediada por duas classes distintas de sequências de sinalização citoplasmática: aquelas que iniciam a ativação primária dependente de antígeno através de TCR (domínios de sinalização intracelular primária) e aqueles que atuam de maneira independente de antígeno para fornecer um sinal secundário ou co-estimulador (domínio citoplasmático secundário, *por exemplo*, um domínio co-estimulador).

[00234] Um domínio de sinalização primária regula a ativação primária do complexo de TCR de forma estimuladora ou de forma inibitória. Os domínios de sinalização intracelular primária que atuam de forma estimuladora podem conter motivos de sinalização que são conhecidos como motivos de ativação do imunorreceptor baseados em tirosina (ITAMs).

[00235] Exemplos de ITAMs contendo domínios de sinalização intracelular primários que são de uso particular na invenção incluem aqueles dentre CD3 zeta, FcR gama, FcR beta, CD3 gama, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b e CD66d. Em uma modalidade, um TFP da presente divulgação compreende um domínio de sinalização intracelular, *por exemplo*, um domínio de sinalização primário de CD3-epsilon. Em uma modalidade, um domínio de sinalização primário compreende um domínio ITAM modificado, *por exemplo*, um domínio ITAM mutado que alterou (*por exemplo*, aumentou ou diminuiu) a atividade em comparação com o domínio ITAM nativo. Em uma modalidade, um domínio de sinalização primário compreende um domínio de sinalização intracelular primário contendo ITAM modificado, *por exemplo*, um domínio de sinalização intracelular

primário contendo ITAM aperfeiçoado e/ou truncado. Em uma modalidade, um domínio de sinalização primário compreende um, dois, três, quatro ou mais motivos de ITAM.

[00236] O domínio de sinalização intracelular da TFP pode compreender o domínio de sinalização CD3 zeta por si só ou pode ser combinado com qualquer outro(s) domínio(s) de sinalização intracelular desejado(s) útil(éis) no contexto de uma TFP da presente divulgação. Por exemplo, o domínio de sinalização intracelular da TFP pode compreender uma porção de cadeia de CD3 épsilon e um domínio de sinalização co-estimulador. O domínio de sinalização co-estimulador refere-se a uma porção da TFP compreendendo o domínio intracelular de uma molécula co-estimuladora. Uma molécula co-estimuladora é uma molécula de superfície celular diferente de um receptor de antígeno ou seus ligantes, que pode ser necessário para uma resposta eficiente de linfócitos a um antígeno. Exemplos de tais moléculas incluem CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, DAP10, DAP12, CD30, CD40, PD1, ICOS, antígeno-1 associado à função linfocitária (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, e um ligante que se liga especificamente com CD83 e semelhantes. Por exemplo, demonstrou-se que a co-estimulação de CD27 aumenta a expansão, a função efetora e a sobrevivência de células TFP-T humanas *in vitro* e aumenta a persistência de células T humanas e a atividade antitumoral *in vivo* (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706).

[00237] As sequências de sinalização intracelular no interior da porção citoplasmática do TFP da presente divulgação podem ser ligadas umas às outras em uma ordem aleatória ou específica. Opcionalmente, um ligante oligo ou polipeptídeo curto, por exemplo, entre 2 e 10 aminoácidos (*por exemplo*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos) de comprimento podem formar a ligação entre as sequências de sinalização intracelular.

[00238] Em uma modalidade, um duplete de glicina-serina pode ser utilizado como um ligante polipeptídico adequado. Em uma modalidade, um único aminoácido, *por exemplo*, uma alanina, uma glicina, pode ser usada como um ligante peptídico adequado.

[00239] Em um aspecto, a célula que expressa TFP descrita neste documento pode compreender adicionalmente uma segunda TFP, *por exemplo*, uma segunda TFP que inclui um domínio de ligação ao antígeno diferente, *por*

exemplo, para mesmo alvo (por exemplo, MUC16, IL13R α 2, MSLN) ou um alvo diferente (*por exemplo*, CD123). Em uma modalidade, quando a célula que expressa TFP compreende duas ou mais TFPs diferentes, os domínios de ligação ao antígeno das diferentes TFPs podem ser tais que os domínios de ligação ao antígeno não interagem entre si. Por exemplo, uma célula que expressa uma primeira e segunda TFP pode ter um domínio de ligação ao antígeno da primeira TFP, *por exemplo*, como um fragmento, *por exemplo*, um scFv, que não se associa com o domínio de ligação ao antígeno da segunda TFP, *por exemplo*, o domínio de ligação ao antígeno do segundo TFP é um V_{HH}. Em uma modalidade, o domínio de ligação ao antígeno é SD1 (SEQ ID NO:15), SD2 (SEQ ID NO:20), SD3 (SEQ ID NO:25), SD4 (SEQ ID NO:30), SD5 (SEQ ID NO:35) ou SD6 (SEQ ID NO:40). Em uma modalidade, o domínio de ligação ao antígeno é LSD1 (SEQ ID NO:51), H1-LSD1 (SEQ ID NO:56), H2-LSD1 (SEQ ID NO:61), LSD2 (SEQ ID NO:66), H1-LSD1 (SEQ ID NO:71) ou H2-LSD2 (SEQ ID NO:76). Em uma modalidade, o domínio de ligação ao antígeno é anti-MSLN VHH1 (SEQ ID NO:96) ou anti-MSLN VHH2 (SEQ ID NO:97).

[00240] Em outro aspecto, a célula que expressa TFP descrita neste documento pode expressar adicionalmente outro agente, *por exemplo*, um agente que intensifica a atividade de uma célula que expressa TFP. Por exemplo, em uma modalidade, o agente pode ser um agente que inibe uma molécula inibitória. Moléculas inibitórias, *por exemplo*, PD1, podem, em algumas modalidades, diminuir a capacidade de uma célula que expressa TFP para montar uma resposta efetora imune. Exemplos de moléculas inibitórias incluem PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 e TGFR beta. Em uma modalidade, o agente que inibe uma molécula inibidora compreende um primeiro polipeptídeo, *por exemplo*, uma molécula inibidora, associada a um segundo polipeptídeo que fornece um sinal positivo para a célula, *por exemplo*, um domínio de sinalização intracelular, descrito neste documento. Em uma modalidade, o agente compreende um primeiro polipeptídeo, *por exemplo*, de uma molécula inibidora, como PD1, LAG3, CTLA4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4 e TIGIT, ou um fragmento de qualquer um dos mesmos (*por exemplo*, pelo menos um porção de um domínio extracelular de qualquer um destes), e um segundo polipeptídeo que é um domínio de sinalização intracelular descrito neste documento (*por*

exemplo, compreendendo um domínio co-estimulador (*por exemplo*, 4-1BB, CD27 ou CD28, *por exemplo*, conforme descrito neste documento) e/ou um domínio de sinalização primário (*por exemplo*, um domínio de sinalização CD3 zeta, descrito neste documento). Em uma modalidade, o agente compreende um primeiro polipeptídeo de PD1 ou um fragmento do mesmo (*por exemplo*, pelo menos uma porção de um domínio extracelular de PD1), e um segundo polipeptídeo de um domínio de sinalização intracelular, descrito neste documento (*por exemplo*, um domínio de sinalização de CD28 descrito neste documento e/ou um domínio de sinalização de CD3 zeta, descrito neste documento). PD1 é um membro inibitório da família CD28 de receptores que também inclui CD28, CTLA-4, ICOS e BTLA. PD1 pode ser expresso em células B ativadas, células T e células mieloides (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). Foi demonstrado que dois ligantes para PD1, Ligante de Morte Programada 1 (PD-L1) e Ligante de Morte Programada 2 (PD-L2) regulam negativamente a ativação de células T mediante a ligação a PD1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 pode ser abundante em cânceres humanos (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). A supressão imunológica pode ser revertida ao inibir a interação local de PD1 com PD-L1.

[00241] Em uma modalidade, o agente compreende o domínio extracelular (ECD) de uma molécula inibidora, *por exemplo*, Morte Programada 1 (PD1) pode ser fundida a um domínio transmembrana e, opcionalmente, um domínio de sinalização intracelular, como 41BB e CD3 zeta (também referido neste documento como um PD1 TFP). Em uma modalidade, o PD1 TFP, quando usado em combinações com um anti-TAA TFP, descrito neste documento, melhora a persistência da célula T. Em uma modalidade, o TFP é um PD1 TFP compreendendo o domínio extracelular de PD 1. Alternativamente, são fornecidos TFPs contendo um anticorpo ou fragmento de anticorpo, como um scFv que se liga especificamente ao PD-L1 ou PD-L2.

[00242] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma população de células T que expressam TFP, *por exemplo*, células TFP-T. Em algumas modalidades, a população de células T que expressam TFP compreende uma

mistura de células que expressam diferentes TFPs. Por exemplo, em uma modalidade, a população de células TFP-T pode incluir uma primeira célula que expressa uma TFP com um domínio de ligação anti-TAA, descrito neste documento, e uma segunda célula que expressa uma TFP com um domínio de ligação anti-TAA diferente, *por exemplo*, um domínio de ligação anti-TAA, descrito neste documento, que difere do domínio de ligação anti-TAA no TFP expresso pela primeira célula. Como outro exemplo, a população de células que expressam TFP pode incluir uma primeira célula que expressa uma TFP que inclui um domínio de ligação anti-TAA, *por exemplo*, conforme descrito neste documento, e uma segunda célula que expressa uma TFP que inclui um domínio de ligação ao antígeno para um alvo diferente do anti-TAA TFP da primeira célula (por exemplo, com especificidade para MUC16, IL13R α 2 ou MSLN) (*por exemplo*, outro antígeno associado a tumor).

[00243] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece uma população de células em que pelo menos uma célula na população expressa uma TFP com um domínio anti-TAA, descrito neste documento, e uma segunda célula que expressa outro agente, *por exemplo*, um agente que aumenta a atividade de uma célula que expressa TFP. Por exemplo, em uma modalidade, o agente pode ser um agente que inibe uma molécula inibitória. Moléculas inibitórias, *por exemplo*, podem, em algumas modalidades, diminuir a capacidade de uma célula que expressa TFP para montar uma resposta efetora imune. Exemplos de moléculas inibitórias incluem PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 e TGFR beta. Em uma modalidade, o agente que inibe uma molécula inibidora compreende um primeiro polipeptídeo, *por exemplo*, uma molécula inibidora, associada a um segundo polipeptídeo que fornece um sinal positivo para a célula, *por exemplo*, um domínio de sinalização intracelular descrito neste documento.

[00244] São divulgados neste documento métodos para a produção de RNA transcrito *in vitro* que codifica TFPs. A presente invenção também inclui uma TFP que codifica o construto de RNA que pode ser transfectada diretamente em uma célula. Um método para gerar mRNA para uso em transfecção pode envolver a transcrição *in vitro* (IVT) de um modelo com primers especialmente projetados, seguido pela adição de poliA, para produzir um construto contendo a sequência não traduzida 3' e 5' ("UTR"), um sítio interno de entrada de ribossomo (IRES) e/ou 5'

cap, o ácido nucleico a ser expresso e uma cauda poliA, tipicamente de 50-2000 bases de comprimento. O RNA assim produzido pode eficientemente transfectar diferentes tipos de células. Em um aspecto, o modelo inclui sequências para a TFP.

[00245] Em um aspecto, o anti-TAA TFP é codificado por um RNA mensageiro (mRNA). Em um aspecto, o mRNA que codifica o anti-TAA TFP é introduzido em uma célula T para a produção de uma célula TFP-T. Em uma modalidade, o RNA TFP transcrito *in vitro* pode ser introduzido em uma célula como uma forma de transfecção transitória. O RNA é produzido por transcrição *in vitro* usando um modelo gerado por reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA de interesse de qualquer fonte pode ser convertido diretamente por PCR no interior de um modelo para síntese de mRNA *in vitro* usando primers apropriados e RNA polimerase. A fonte do DNA pode ser, por exemplo, DNA genômico, DNA plasmídico, DNA de fago, cDNA, sequência de DNA sintético ou qualquer outra fonte de DNA apropriada. O modelo desejado para transcrição *in vitro* é uma TFP da presente invenção. Em uma modalidade, o DNA a ser utilizado para PCR contém um quadro de leitura aberto. O DNA pode ser proveniente de uma sequência de DNA de ocorrência natural do genoma de um organismo. Em uma modalidade, o ácido nucleico pode incluir algumas ou todas as regiões 5' e/ou 3' não traduzidas (UTRs). O ácido nucleico pode incluir exons e introns. Em uma modalidade, o DNA a ser utilizado para PCR é uma sequência de ácido nucleico humano. Em outra modalidade, o DNA a ser utilizado para PCR é uma sequência de ácido nucleico humano que inclui as UTRs 5' e 3'. O DNA pode, alternativamente, ser uma sequência de DNA artificial que normalmente não é expressa em um organismo natural. Uma sequência de DNA artificial exemplificativa é uma que contém porções de genes que são ligadas em conjunto para formar um quadro de leitura aberto que codifica uma proteína de fusão. As porções de DNA que são ligadas em conjunto podem ser de um único organismo ou de mais de um organismo.

[00246] O PCR é usado para gerar um molde para a transcrição *in vitro* de mRNA que é usado para transfecção. Os métodos para realizar PCR são bem conhecidos na técnica. Os primers para utilização em PCR são concebidos para ter regiões que sejam substancialmente complementares às regiões do DNA a serem utilizadas como um modelo para PCR. "Substancialmente complementar", tal como utilizado neste documento, refere-se a sequências de nucleotídeos em que uma

maioria ou todas as bases na sequência de primer são complementares, ou uma ou mais bases não são complementares ou são incompatíveis. Sequências substancialmente complementares são capazes de anelar ou hibridizar com o DNA alvo desejado sob condições de anelamento usadas para PCR. Os primers podem ser projetados para serem substancialmente complementares a qualquer porção do modelo de DNA. Por exemplo, os primers podem ser projetados para amplificar a porção de um ácido nucleico que normalmente é transcrita em células (o quadro de leitura aberta), incluindo UTRs 5' e 3'. Os primers também podem ser projetados para amplificar uma porção de um ácido nucleico que codifica um domínio particular de interesse. Em uma modalidade, os primers são projetados para amplificar a região de codificação de um cDNA humano, incluindo todas ou porções das UTRs 5' e 3'. Os primers úteis para PCR podem ser gerados por métodos sintéticos que são bem conhecidos na técnica. "Primers diretos" são primers que contêm uma região de nucleotídeos que são substancialmente complementares aos nucleotídeos no modelo de DNA que estão a montante da sequência de DNA que deve ser amplificada. "À montante" é usado neste documento para se referir a uma localização 5', à sequência de DNA a ser amplificada em relação ao filamento de codificação. Os "primers reversos" são primers que contêm uma região de nucleotídeos que são substancialmente complementares a um modelo de DNA de cadeia dupla que estão à jusante da sequência de DNA que deve ser amplificada. "A jusante" é utilizado neste documento para se referir a uma localização 3' na sequência de DNA a ser amplificada em relação ao filamento de codificação.

[00247] Qualquer DNA polimerase de DNA útil para o PCR pode ser utilizada nos métodos divulgados neste documento. Os reagentes e a polimerase estão comercialmente disponíveis por inúmeras fontes.

[00248] Estruturas químicas com a capacidade de promover a estabilidade e/ou a eficiência de tradução também podem ser usadas. O RNA preferencialmente tem UTRs 5' e 3'. Em uma modalidade, a UTR 5' tem entre um e 3.000 nucleotídeos de comprimento. O comprimento das sequências UTR 5' e 3' a ser adicionado à região de codificação pode ser alterado por diferentes métodos, incluindo, mas não limitado a, projetar primers para PCR que anelam em diferentes regiões das UTRs. Usando esta abordagem, uma pessoa de conhecimento comum à técnica pode modificar os comprimentos de UTR 5' e 3' necessários para atingir uma eficiência

de tradução ideal após a transfecção do RNA transcrito.

[00249] As UTRs 5' e 3' podem ser as UTRs 5' e 3' endógenas de ocorrência natural para o ácido nucleico de interesse. Alternativamente, as sequências UTR que não são endógenas ao gene de interesse podem ser adicionadas incorporando-se as sequências UTR nos primers forward e reverso ou por quaisquer outras modificações do modelo. O uso de sequências UTR que não são endógenas ao gene de interesse pode ser útil para modificar a estabilidade e/ou a eficiência de tradução do RNA. Por exemplo, sabe-se que os elementos ricos em AU em sequências 3'UTR podem diminuir a estabilidade do mRNA. Portanto, UTRs 3' podem ser selecionadas ou projetadas para aumentar a estabilidade do RNA transcrito com base em propriedades de UTRs que são bem conhecidas na técnica.

[00250] Em uma modalidade, a UTR 5' pode conter a sequência Kozak do ácido nucleico endógeno. Alternativamente, quando uma UTR 5' que não é endógena ao ácido nucleico de interesse está sendo adicionada por PCR, como descrito acima, uma sequência de consenso Kozak pode ser redesenhada pela adição da sequência UTR 5'. As sequências Kozak podem aumentar a eficiência da tradução de alguns transcritos de RNA, mas não parece ser necessária para que todos os RNAs possibilitem tradução eficiente. Em outras modalidades, a UTR 5' pode ser UTR 5' de um vírus RNA cujo genoma de RNA é estável nas células. Em outras modalidades, vários análogos de nucleotídeo podem ser utilizados na UTR 3' ou 5' para impedir a degradação da exonuclease do mRNA.

[00251] Para possibilitar a síntese de RNA a partir de um modelo de DNA sem a necessidade de clonagem de genes, um promotor de transcrição deve ser anexado ao modelo de DNA a montante da sequência a ser transcrita. Quando uma sequência que funciona como um promotor para uma RNA polimerase é adicionada à extremidade 5' do primer forward, o promotor da RNA polimerase fica incorporado no produto de PCR a montante do quadro de leitura aberta que deve ser transcrito. Em uma modalidade preferencial, o promotor é um promotor T7 polimerase, conforme descrito em outro parte neste documento. Outros promotores úteis incluem, mas não estão limitados a, promotores da T3 e SP6 RNA polimerase. As sequências de nucleotídeos de consenso dos promotores T7, T3 e SP6 são conhecidas na técnica.

[00252] Em uma modalidade preferencial, o mRNA tem uma cap tanto na

extremidade 5' quanto uma cauda 3' poli(A) que determina a ligação de ribossomo, a iniciação de tradução e estabilidade de mRNA na célula. Em um modelo de DNA circular, por exemplo, DNA plasmídico, a RNA polimerase RNA produz um produto concatamérico longo, o qual não é adequado para a expressão em células eucarióticas. A transcrição de DNA plasmídico linearizado na extremidade da UTR 3' resulta em mRNA de tamanho normal que não é eficaz na transfecção eucariótica, mesmo que seja poliadenilado após a transcrição.

[00253] Em um modelo de DNA linear, a RNA polimerase do fago T7 pode estender a extremidade 3' do transcrito além da última base do modelo (Schenborn e Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva e Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003).

[00254] O método convencional de integração de expansões de poli A/T no interior de um modelo de DNA é clonagem molecular. Entretanto, a sequência poliA/T integrada no DNA plasmídico pode causar instabilidade plasmídica, razão pela qual os modelos de DNA plasmídico obtidos a partir de células bacterianas são muitas vezes altamente contaminados com exclusões e outras aberrações. Isso torna os procedimentos de clonagem não só laboriosos e demorados, mas muitas vezes não confiáveis. É por isso que um método que permita a construção de modelos de DNA com expansão poliA/T 3' sem clonagem seja altamente desejável.

[00255] O segmento poliA/T do modelo de DNA transcricional pode ser produzido durante a PCR usando um primer reverso contendo uma cauda polyT, tal como uma cauda 100 T (o tamanho pode ser 50-5000 Ts), ou após PCR por qualquer outro método, incluindo, mas não limitado a ligação de DNA ou recombinação *in vitro*. As caudas de poli(A) também fornecem estabilidade aos RNAs e reduzem sua degradação. Em geral, o comprimento de uma cauda de poli(A) se correlaciona positivamente com a estabilidade do RNA transcrito. Em uma modalidade, a cauda de poli(A) tem entre 100 e 5000 adenosinas.

[00256] As caudas de poli(A) de RNAs podem ser adicionalmente ampliadas após transcrição *in vitro* com a utilização de uma poli(A) polimerase, tal como E. coli de poliA polimerase (E-PAP). Em uma modalidade, aumentar o comprimento de uma cauda de poli(A) de 100 nucleotídeos entre 300 e 400 nucleotídeos resulta em cerca de um aumento de duas vezes na eficiência de tradução do RNA. Além

disso, a ligação de diferentes grupos químicos à extremidade 3' pode aumentar a estabilidade de mRNA. Essa ligação pode conter nucleotídeos, aptâmeros modificados/artificiais e outros compostos. Por exemplo, os análogos de ATP podem ser incorporados na cauda de poli(A) usando poli(A) polimerase. Os análogos de ATP podem aumentar adicionalmente mais a estabilidade do RNA.

[00257] Caps 5' também proveem estabilidade às moléculas de RNA. Em uma modalidade preferencial, os RNAs produzidos pelos métodos descritos neste documento incluem uma cap 5'. A cap 5' é provida utilizando técnicas conhecidas na técnica e descritas neste documento (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

[00258] Os RNAs produzidos pelos métodos divulgados neste documento também podem conter uma sequência de sítio interno de entrada de ribossomo (IRES). A sequência de IRES pode ser qualquer sequência viral, cromossômica ou artificialmente projetada que inicia a ligação de ribossomo independente da cap a mRNA e facilita o início da tradução. Quaisquer solutos adequados para a eletroporação celular, que podem conter fatores que facilitam a permeabilidade e a viabilidade celular, tais como açúcares, peptídeos, lipídios, proteínas, antioxidantes e surfactantes podem ser incluídos.

[00259] O RNA pode ser introduzido em células alvo usando qualquer um de uma série de métodos diferentes, por exemplo, métodos disponíveis comercialmente que incluem, mas não estão limitados a, eletroporação (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Colônia, Alemanha)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) Ou o Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colorado), Multiporator (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), transfecção mediada por lipossoma catiônico usando lipofecção, encapsulação de polímero, transfecção mediada por peptídeo ou sistemas de distribuição de partículas biolísticas, tais como "armas de gene" (ver, por exemplo, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12 (8): 861-70 (2001)).

Construtos de Ácido Nucleico Codificando uma TFP

[00260] A presente divulgação também fornece moléculas de ácido nucleico que codificam um ou mais construtos de TFP descritos neste documento. Em um aspecto, a molécula de ácido nucleico é provida como um transcrito de RNA

mensageiro. Em um aspecto, a molécula de ácido nucleico é fornecida como um construto de DNA.

[00261] As sequências de ácido nucleico que codificam as moléculas desejadas podem ser obtidas utilizando métodos recombinantes conhecidos na técnica, tais como, por exemplo, ao se testar bibliotecas a partir de células que expressam o gene, ao se derivar o gene de um vetor conhecido por incluí-las, ou ao se isolar diretamente de células e tecidos contendo estas, usando técnicas padrão. Alternativamente, o gene de interesse pode ser produzido sinteticamente, em vez de clonado.

[00262] São divulgados neste documento, em algumas modalidades, em que os vetores compreendem o ácido nucleico recombinante divulgado neste documento. Em alguns casos, o vetor é selecionado a partir do grupo que consiste em um DNA, um RNA, um plasmídeo, um vetor de lentivírus, vetor adenoviral, um vetor viral adeno-associado (AAV), um vetor viral de sarcoma de Rous (RSV) ou um vetor de retrovírus. Em alguns casos, o vetor é um vetor AAV6. Em alguns casos, o vetor compreende adicionalmente um promotor. Em alguns casos, o vetor é um vetor transcrito *in vitro*. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor de RNA circular (por exemplo, conforme divulgado no pedido de patente provisória copendente nº 62/836,977).

[00263] A presente divulgação também fornece vetores nos quais um DNA da presente invenção é inserido. Os vetores derivados de retrovírus, tais como o lentivírus, são ferramentas adequadas para atingir a transferência de gene a longo prazo, uma vez que permitem a integração estável a longo prazo de um transgene e sua propagação em células-filhas. Os vetores lentivirais têm a vantagem adicional sobre os vetores derivados de onco-retrovírus, tais como vírus de leucemia murina pelo fato de que podem transduzir células não proliferantes, tais como hepatócitos. Eles também têm a vantagem adicional de baixa imunogenicidade. São divulgados neste documento, em algumas modalidades, são vetores compreendem o ácido nucleico recombinante divulgado neste documento.

[00264] Em outra modalidade, o vetor que compreende o ácido nucleico que codifica o TFP desejado da presente divulgação é um vetor adenoviral (A5/35). Em outra modalidade, a expressão de ácidos nucleicos que codificam TFPs pode ser realizada usando transposons, como a bela adormecida, crisper, CAS9 e nucleases

de dedo de zinco (Ver, June et al. 2009 Nature Reviews Immunol. 9.10: 704-716, incorporado neste documento por referência).

[00265] Os construtos de expressão da presente divulgação também podem ser usados para imunização de ácido nucleico e terapia gênica, usando protocolos de entrega de genes padrão. Os métodos para entrega de genes são conhecidos na técnica (ver, *por exemplo*, as patentes US 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466, incorporadas neste documento por referência na sua totalidade). Em outra modalidade, a presente divulgação fornece um vetor de terapia gênica.

[00266] O ácido nucleico pode ser clonado em vários tipos de vetores. Por exemplo, o ácido nucleico pode ser clonado no interior de um vetor incluindo, mas não limitado a, um plasmídeo, um fagemídeo, um derivado de fago, um vírus animal e um cosmídeo. Os vetores de interesse particular incluem vetores de expressão, vetores de replicação, vetores de geração de sonda e vetores de sequenciamento.

[00267] Além disso, o vetor de expressão pode ser fornecido a uma célula na forma de um vetor viral. A tecnologia de vetor viral é bem conhecida na técnica e é descrita, *por exemplo*, in Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY) e em outros manuais de virologia e de biologia molecular. Os vírus, que são úteis como vetores, incluem, mas não estão limitados a, retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados, vírus da herpes e lentivírus. Em geral, um vetor adequado contém uma origem de replicação funcional em pelo menos um organismo, uma sequência promotora, sítios de endonuclease de restrição convenientes e um ou mais marcadores selecionáveis (*por exemplo*, WO 01/96584; WO 01/29058; e Patente US 6.326.193).

[00268] Vários sistemas baseados em vírus foram desenvolvidos para transferência gênica em células de mamíferos. Por exemplo, os retrovírus fornecem uma plataforma conveniente para sistemas de entrega de genes. Um gene selecionado pode ser inserido no interior de um vetor e empacotado em partículas retrovirais usando técnicas conhecidas na técnica. O vírus recombinante pode, então, ser isolado e entregue às células do sujeito *in vivo* ou *ex vivo*. Uma série de sistemas retrovirais são conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, são utilizados vetores de adenovírus. Vários vetores de adenovírus são conhecidos na técnica. Em uma modalidade, são usados vetores de lentivírus.

[00269] Elementos promotores adicionais, *por exemplo*, potencializadores, regulam a frequência do início de transcrição. Normalmente, estes estão localizados na região 30-110 pb a montante do sítio inicial, embora se mostrou que vários promotores contêm elementos funcionais a jusante do sítio inicial também. O espaçamento entre os elementos promotores com frequência é flexível, de modo que a função promotora é preservada quando os elementos são invertidos ou movidos entre si. No promotor da timidina quinase (tk), o espaçamento entre os elementos promotores pode ser aumentado para 50 pb antes da atividade começar a diminuir. Dependendo do promotor, parece que os elementos individuais podem funcionar de forma cooperativa ou independente para ativar a transcrição.

[00270] Um exemplo de um promotor que é capaz de expressar um transgene de TFP em uma célula T de mamífero é o promotor EF1a. O promotor EF1a nativo aciona a expressão da subunidade alfa do complexo do fator 1 de alongamento, que é responsável pela entrega enzimática de aminoacil tRNAs para o ribossomo. O promotor EF1a foi amplamente utilizado em plasmídeos de expressão de mamíferos e demonstrou ser eficaz na ativação da expressão TFP a partir de transgenes clonados em um vetor lentiviral (ver, *por exemplo*, Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)). Outro exemplo de um promotor é a sequência promotora precoce imediata de citomegalovírus (CMV). Esta sequência promotora é uma sequência promotora constitutiva forte capaz de ativar altos níveis de expressão de qualquer sequência de polinucleotídeo ligada operativamente à mesma. Entretanto, outras sequências promotoras constitutivas também podem ser utilizadas, incluindo, mas não se limitando ao promotor precoce do vírus de símio 40 (SV40), vírus do tumor mamário do camundongo (MMTV), promotor da repetição terminal longa (LTR) do vírus da imunodeficiência humana (HIV), promotor MoMuLV, um promotor do vírus da leucemia aviária, um promotor precoce imediato do vírus Epstein-Barr, um promotor do vírus do sarcoma de Rous, bem como promotores de genes humanos, tais como, mas não limitados ao promotor de actina, o promotor de miosina, o promotor do fator de alongamento 1a, o promotor da hemoglobina e o promotor da creatina quinase. Além disso, a presente divulgação não deve ser limitada ao uso de promotores constitutivos. Os promotores induzíveis também são contemplados como parte da invenção. A utilização de um promotor induzível fornece um interruptor molecular capaz de ligar

a expressão da sequência de polinucleotídeo que está operativamente ligada, quando tal expressão é desejada, ou desligar a expressão quando a expressão não é desejada. Exemplos de promotores induzíveis incluem, mas não estão limitados a, um promotor de metalotionina, um promotor de glucocorticoide, um promotor de progesterona e um promotor regulado por tetraciclina.

[00271] A fim de avaliar a expressão de um polipeptídeo de TFP ou porções deste, o vetor de expressão a ser introduzido em uma célula também pode conter um gene marcador selecionável ou um gene repórter, ou ambos, para facilitar a identificação e seleção de células de expressão da população de células que se buscou transfectar ou infectar através de vetores virais. Em outros aspectos, o marcador selecionável pode ser realizado em um pedaço separado de DNA e usado em um procedimento de co-transfecção. Tanto os marcadores selecionáveis quanto os genes repórteres podem ser flanqueados com sequências reguladoras apropriadas para possibilitar a expressão nas células hospedeiras. Os marcadores selecionáveis úteis incluem, por exemplo, genes de resistência a antibióticos, tais como neo e semelhantes.

[00272] Os genes repórteres são usados para identificar células potencialmente transfectadas e para avaliar a funcionalidade de sequências reguladoras. Em geral, um gene repórter é um gene que não está presente ou expresso pelo organismo ou tecido receptor e que codifica um polipeptídeo cuja expressão é manifestada por algumas propriedades facilmente detectáveis, *por exemplo*, atividade enzimática. A expressão do gene repórter é ensaiada em um momento adequado após o DNA ter sido introduzido nas células receptoras. Os genes repórteres adequados podem incluir genes que codificam luciferase, beta-galactosidase, cloranfenicol acetil transferase, fosfatase alcalina secretada ou o gene da proteína fluorescente verde (*por exemplo*, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Os sistemas de expressão adequados são bem conhecidos e podem ser preparados utilizando técnicas conhecidas ou obtidos comercialmente. Em geral, o construto com a região flanqueadora 5' mínima mostrando o maior nível de expressão do gene repórter é identificado como o promotor. Tais regiões promotoras podem estar ligadas a um gene repórter e utilizadas para avaliar agentes para a capacidade de modular a transcrição ativada por promotor.

[00273] Os métodos de introdução e expressão de genes em uma célula são

conhecidos na técnica. No contexto de um vetor de expressão, o vetor pode ser facilmente introduzido em uma célula hospedeira, *por exemplo*, célula de mamífero, bactéria, levedura ou inseto por qualquer método na técnica. Por exemplo, o vetor de expressão pode ser transferido para uma célula hospedeira por meios físicos, químicos ou biológicos.

[00274] Os métodos físicos para introduzir um polinucleotídeo no interior de uma célula hospedeira incluem precipitação de fosfato de cálcio, lipofecção, bombardeamento de partículas, microinjeção, eletroporação e semelhantes. Métodos para a produção de células compreendendo vetores e/ou ácidos nucleicos exógenos são bem conhecidos na técnica (*ver, por exemplo*, Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Um método preferencial para a introdução de um polinucleotídeo no interior de uma célula hospedeira é transfecção de fosfato de cálcio.

[00275] Os métodos biológicos para introduzir um polinucleotídeo de interesse em uma célula hospedeira incluem a utilização de vetores de DNA e RNA. Os vetores virais e, especialmente, os vetores retrovirais, tornaram-se o método mais amplamente utilizado para inserir genes em mamíferos, *por exemplo*, células humanas. Outros vetores virais podem ser derivados de lentivírus, poxvírus, vírus herpes simples tipo I, adenovírus e adenovírus associados e semelhantes (*ver, por exemplo*, Patentes US 5.350.674 e 5.585.362).

[00276] Os meios químicos para introduzir um polinucleotídeo em uma célula hospedeira incluem sistemas de dispersão coloidal, tais como complexos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, grânulos e sistemas à base de lípidos, incluindo emulsões óleo em água, micelas, micelas mistas e lipossomas. Um sistema coloidal exemplificativo para uso como veículo de aplicação *in vitro* e *in vivo* é um lipossoma (*por exemplo*, uma vesícula de membrana artificial). Outros métodos de entrega direcionada de última geração de ácidos nucleicos estão disponíveis, tais como a entrega de polinucleotídeos com nanopartículas direcionadas ou outro sistema de entrega de tamanho submícron adequado.

[00277] No caso em que é utilizado um sistema de entrega não viral, um veículo de entrega exemplificativo é um lipossoma. O uso de formulações lipídicas é contemplado para a introdução dos ácidos nucleicos em uma célula hospedeira (*in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*). Em outro aspecto, o ácido nucleico pode estar

associado a um lipídio. O ácido nucleico associado a um lipídio pode ser encapsulado no interior aquoso de um lipossoma, intercalado no interior da bicamada lipídica de um lipossoma, ligado a um lipossoma por meio de uma molécula de ligação que está associada tanto com o lipossoma quanto com o oligonucleotídeo, aprisionados em um lipossoma, complexado com um lipossoma, disperso em uma solução contendo um lipídio, misturado com um lipídio, combinado com um lipídio, contido como uma suspensão em um lipídio, contido ou complexado com uma micela ou, de outra forma, associado a um lipídio. As composições associadas ao lipídeo, lipídeo/DNA ou lipídeo/vetor de expressão não estão limitadas a qualquer estrutura particular em solução. Por exemplo, elas podem estar presentes em uma estrutura bicamada, como micelas ou com uma estrutura "colapsada". Elas também podem simplesmente ser intercaladas em uma solução, possivelmente formando agregados que não são uniformes em tamanho ou formato. Os lipídios são substâncias gordurosas que podem ser lipídios de ocorrência natural ou sintéticos. Por exemplo, os lipídios incluem as gotículas gordurosas de ocorrência natural no citoplasma, bem como a classe de compostos que contêm hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa e seus derivados, tais como ácidos graxos, álcoois, aminas, amino álcoois e aldeídos.

[00278] Os lipídios adequados para uso podem ser obtidos a partir de fontes comerciais. Por exemplo, dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") pode ser obtida em Sigma, St. Louis, Mo.; o fosfato de dicetil ("DCP") pode ser obtido na K & K Laboratories (Plainview, N.Y.); colesterol ("Choi") pode ser obtido em Calbiochem-Behring; dimiristil fosfatidilglicerol ("DMPG") e outros lipídeos podem ser obtidos na Avanti Polar Lipids, Inc, (Birmingham, Ala.). As soluções de estoque de lipídios em clorofórmio ou clorofórmio/metanol podem ser armazenadas a cerca de -20°C. O clorofórmio é usado como o único solvente, visto que é mais facilmente evaporado do que o metanol. O "lipossoma" é um termo genérico que engloba uma variedade de veículos lipídicos simples e multilamelares, formados pela geração de bicamadas ou agregados de lipídios envoltos. Os lipossomas podem ser caracterizados como tendo estruturas vesiculares com uma membrana de bicamadas de fosfolipídios e um meio aquoso interno. Os lipossomas multilamelares têm múltiplas camadas lipídicas separadas por meio aquoso. Eles se formam espontaneamente quando os fosfolipídios são suspensos em um

excesso de solução aquosa. Os componentes lipídicos sofrem auto-rearranjo antes da formação de estruturas fechadas e aprisionam água e solutos dissolvidos entre as bicamadas lipídicas (Ghosh et al., 1991 *Glycobiology* 5: 505-10). Todavia, composições que têm estruturas diferentes em solução do que a estrutura vesicular normal também são englobadas. Por exemplo, os lipídios podem assumir uma estrutura micelar ou simplesmente existir como agregados não uniformes de moléculas lipídicas. Também são contemplados os complexos de lipofectamina-ácido nucleico.

Independentemente do método utilizado para introduzir ácidos nucleicos exógenos no interior de uma célula hospedeira ou, de outra forma, expor uma célula ao inibidor da presente invenção, a fim de confirmar a presença da sequência de DNA recombinante na célula hospedeira, uma variedade de ensaios pode ser realizada. Tais ensaios incluem, por exemplo, ensaios de "biologia molecular" bem conhecidos àqueles versados na técnica, tais como Southern e Northern blotting, RT-PCR e PCR; ensaios "bioquímicos", tais como detecção da presença ou ausência de um peptídeo particular, *por exemplo, por* meios imunológicos (ELISA e Western blots) ou por ensaios descritos neste documento para identificar agentes que se enquadram no escopo da invenção.

Tecnologias de edição de genes

[00279] Em algumas modalidades, as células T modificadas divulgadas neste documento são projetadas usando uma técnica de edição de genes, como repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPR®, ver, por exemplo, Patente US 8.697.359), nucleases efetoras do tipo ativador transcricional (TALE) (TALENs, ver, por exemplo, Patente US 9.393.257), meganucleases (endodesoxirribonucleases com grandes sítios de reconhecimento compreendendo sequências de DNA de fita dupla de 12 a 40 pares de bases), nuclease de dedo de zinco (ZFN, ver, por exemplo, Urnov et al., *Nat. Rev. Genetics* (2010) v11, 636-646), ou métodos de megaTAL nucleases (uma proteína de fusão de uma meganuclease a repetições TAL). Desta forma, um construto quimérico pode ser manipulado para combinar características desejáveis de cada subunidade, tais como conformação ou capacidades de sinalização. Ver também Sander & Joung, *Nat. Biotech.* (2014) v32, 347-55; e June et al., 2009 *Nature Reviews Immunol.* 9.10: 704-716, cada um incorporado neste documento por

referência. Em algumas modalidades, um ou mais dentre o domínio extracelular, o domínio transmembrana ou o domínio citoplasmático de uma subunidade TFP são manipulados para ter aspectos de mais de um domínio de subunidade TCR natural (ou seja, são quiméricos).

[00280] Desenvolvimentos recentes de tecnologias para alterar permanentemente o genoma humano e para introduzir modificações de sítio específico do genoma em genes relevantes para doenças estabelecem a base para aplicações terapêuticas. Essas tecnologias agora são comumente conhecidas como “edição de genoma”.

[00281] Em algumas modalidades, as técnicas de edição de genes são empregadas para distribuir um gene TCR endógeno. Em algumas modalidades, o gene TCR endógeno mencionado codifica uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR ou uma cadeia alfa de TCR e uma cadeia beta de TCR. Em algumas modalidades, as técnicas de edição de gene pavimentam o caminho para a edição genômica multiplex, que permite a interrupção simultânea de múltiplos loci genômicos no gene TCR endógeno. Em algumas modalidades, técnicas de edição genômica multiplex são aplicadas para gerar células T com gene interrompido que são deficientes na expressão de TCR endógeno e/ou antígenos leucocitários humanos (HLAs) e/ou proteína de morte celular programada 1 (PD1), e/ou outros genes.

[00282] As tecnologias atuais de edição de genes compreendem meganucleases, nucleases de dedo de zinco (ZFN), nucleases efetoras de TAL (TALEN) e sistema de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPR)/associado às CRISPR (Cas). Essas quatro classes principais de técnicas de edição de genes compartilham um modo comum de ação na ligação de uma sequência de DNA definida pelo usuário e na mediação de uma quebra de DNA de fita dupla (DSB). O DSB pode então ser reparado por união de extremidade não homóloga (NHEJ) ou – quando o DNA doador está presente – recombinação homóloga (HR), um evento que introduz a sequência homóloga de um fragmento de DNA do doador. Além disso, as nucleases de nickase geram quebras de DNA de fita simples (SSB). Os DSBs podem ser reparados por incorporação de DNA de fita simples (ssDI) ou reparo de modelo de fita simples (ssTR), um evento que introduz a sequência homóloga de um DNA doador.

[00283] A modificação genética do DNA genômico pode ser realizada usando endonucleases de corte raras específicas do sítio, que são manipuladas para reconhecer sequências de DNA no locus de interesse. Os métodos para a produção de endonucleases manipuladas específicas do sítio são conhecidos na técnica. Por exemplo, as nucleases de dedo de zinco (ZFNs) podem ser manipuladas para reconhecer e cortar sítios predeterminados em um genoma. ZFNs são proteínas quiméricas compreendendo um domínio de ligação de DNA de dedo de zinco fundido ao domínio de nuclease da enzima de restrição FokI. O domínio dedo de zinco pode ser reprojetoado por meios racionais ou experimentais para produzir uma proteína que se liga a uma sequência de DNA pré-determinada de pares de base de -18 de comprimento. Ao fundir este domínio de proteína manipulada com a nuclease FokI, é possível direcionar quebras de DNA com especificidade em nível de genoma. As ZFNs foram amplamente utilizadas para direcionar a adição, remoção e substituição de genes em uma ampla faixa de organismos eucarióticos (revisado em Durai et al. (2005), *Nucleic Acids Res* 33, 5978). Da mesma forma, nucleases efetoras de TAL (TALENs) podem ser geradas para clivar sítios específicos no DNA genômico. Como um ZFN, um TALEN compreende um domínio de ligação de DNA específico de sítio fundido ao domínio de nuclease FokI (revisado em Mak et al. (2013), *Curr Opin Struct Biol.* 23:93-9). Neste caso, no entanto, o domínio de ligação ao DNA compreende um arranjo em tandem de domínios efetores de TAL, cada um dos quais reconhece especificamente um único par de base de DNA. TALENs compactos têm uma arquitetura de endonuclease alternativa que evita a necessidade de dimerização ((Beurdeley et al. (2013), *Nat Commun.* 4: 1762). Um TALEN compacto compreende um domínio manipulado de ligação de DNA efetor de TAL específico do sítio fundido ao domínio de nuclease da endonuclease I-TevI homing. Ao contrário de FokI, I-TevI não precisa dimerizar para produzir uma quebra de DNA de fita dupla, então um TALEN compacto é funcional como um monômero.

[00284] Endonucleases manipuladas com base no sistema CRISPR/Cas9 também são conhecidas na técnica (Ran et al. (2013), *Nat Protoc.* 8:2281-2308; Mali et al. (2013), *Nat Methods* 10:957-63). A tecnologia de edição de genes CRISPR é composta por uma proteína endonuclease cuja especificidade de direcionamento ao DNA e atividade de corte podem ser programadas por um RNA

guia curto ou um crRNA/TracrRNA duplex. Uma endonuclease de CRISPR compreende dois componentes: (1) uma nuclease efetora de caspase, tipicamente Cas9 microbiana; e (2) um "RNA guia" curto ou um duplex de RNA compreendendo uma sequência de direcionamento de 18 a 20 nucleotídeos que direciona a nuclease para um local de interesse no genoma. Ao expressar vários RNAs guia na mesma célula, cada um com uma sequência de direcionamento diferente, é possível direcionar quebras de DNA simultaneamente para vários sítios no genoma (edição genômica multiplex).

Existem duas classes de sistemas CRISPR conhecidas na técnica (Adli (2018) Nat. Commun. 9: 1911), cada uma contendo vários tipos de CRISPR. A Classe I contém sistemas CRISPR tipo I e tipo III que são comumente encontrados em Archaea. E a Classe II contém sistemas CRISPR tipo II, IV, V e VI. Embora o sistema CRISPR/Cas mais amplamente utilizado seja o sistema CRISPR-Cas9 do tipo II, os sistemas CRISPR/Cas foram reaproveitados por pesquisadores para edição de genoma. Mais de 10 proteínas CRISPR/Cas diferentes foram remodeladas nos últimos anos (Adli (2018) Nat. Commun. 9:1911). Entre elas, como as proteínas Cas12a (Cpf1) de *Acidaminococcus* sp (AsCpf1) e a bactéria *Lachnospiraceae* (LbCpf1), são particularmente interessantes.

[00285] As endonucleases de homing são um grupo de nucleases de ocorrência natural que reconhecem os sítios de clivagem de 15-40 pares de bases comumente encontrados nos genomas de plantas e fungos. Eles são frequentemente associados a elementos de DNA parasitas, como introns e inteínas de auto-união do grupo 1. Eles promovem a recombinação homóloga ou a inserção de genes em sítios específicos no genoma do hospedeiro, produzindo uma quebra de fita dupla no cromossomo, que recruta a maquinaria de reparo do DNA celular (Stoddard (2006), Q. Rev. Biophys. 38: 49-95). Subestações de aminoácidos específicas podem reprogramar a especificidade de clivagem de DNA de homing nucleases (Niyonzima (2017), Protein Eng Des Sel. 30(7): 503–522). Meganucleases (MN) são proteínas monoméricas com atividade de nuclease inata que são derivadas de homing endonucleases bacterianas e manipuladas para um único sítio de destino (Gersbach (2016), Molecular Therapy. 24: 430-446). Em algumas modalidades, a meganuclease é I-Crel homing endonuclease manipulada. Em outras modalidades, a meganuclease é endonuclease de homing I-Scel

manipulada.

[00286] Além das quatro tecnologias principais de edição de genes mencionadas, proteínas quiméricas compreendendo fusões de meganucleases, ZFNs e TALENs foram manipuladas para gerar novas enzimas monoméricas que tiram vantagem da afinidade de ligação de ZFNs e TALENs e da especificidade de clivagem de meganucleases (Gersbach (2016), *Molecular Therapy*. 24: 430–446). Por exemplo, A megaTAL é uma única proteína quimérica, que é a combinação dos domínios de ligação de DNA fáceis de adaptar de TALENs com a alta eficiência de clivagem das meganucleases.

[00287] Para realizar a técnica de edição de genes, as nucleases e, no caso do sistema CRISPR/Cas9, um gRNA, devem ser entregues de forma eficiente às células de interesse. Métodos de entrega, como métodos físicos, químicos e virais, também são conhecidos na arte (Mali (2013). *Indian J. Hum. Genet.* 19: 3-8.). Em alguns casos, os métodos de entrega física podem ser selecionados a partir dos métodos, mas não se limitam a, eletroporação, microinjeção ou uso de partículas balísticas. Por outro lado, os métodos de entrega de produtos químicos requerem o uso de moléculas complexas, como fosfato de cálcio, lipídio ou proteína. Em algumas modalidades, os métodos de entrega viral são aplicados para técnicas de edição de genes usando vírus, tais como, mas não se limitando a adenovírus, lentivírus e retrovírus.

[00288] A presente invenção fornece adicionalmente um vetor compreendendo uma TFP que codifica molécula de ácido nucleico. Em um aspecto, um vetor TFP pode ser transduzido diretamente em uma célula, *por exemplo*, uma célula T. Em um aspecto, o vetor é um vetor de clonagem ou expressão, *por exemplo*, um vetor incluindo, mas não limitado a, um ou mais plasmídeos (*por exemplo*, plasmídeos de expressão, vetores de clonagem, minicírculos, minivetores, cromossomos de minuto duplo), construtos de vetor retroviral e lentiviral. Em um aspecto, o vetor é capaz de expressar o construto de TFP em células T de mamífero. Em um aspecto, a célula T de mamífero é uma célula T humana.

Fontes de células T

[00289] Antes da expansão e modificação genética, uma fonte de células T é obtida a partir de um sujeito. O termo "sujeito" destina-se a incluir organismos

vivos em que uma resposta imunológica pode ser induzida (*por exemplo*, mamíferos). Exemplos de sujeitos incluem seres humanos, cães, gatos, camundongos, ratos e espécies transgênicas dos mesmos. As células T podem ser obtidas a partir de várias fontes, incluindo células mononucleares de sangue periférico, medula óssea, tecido linfonodal, sangue do cordão umbilical, tecido timo, tecido de um sítio de infecção, ascite, derrame pleural, tecido do baço e tumores. Em certos aspectos da presente invenção, qualquer número de linhagens de células T disponíveis na técnica pode ser utilizado. Em certos aspectos da presente invenção, as células T podem ser obtidas a partir de uma unidade de sangue coletada a partir de um sujeito utilizando qualquer número de técnicas conhecidas pelos versados na técnica, tais como separação Ficoll™. Em um aspecto preferencial, as células do sangue circulante de um indivíduo são obtidas por aférese. O produto de aférese normalmente contém linfócitos, incluindo células T, monócitos, granulócitos, células B, outros glóbulos brancos nucleados, glóbulos vermelhos e plaquetas. Em um aspecto, as células coletadas por aférese podem ser lavadas para remover a fração de plasma e colocar as células em um tampão ou meios apropriados para etapas de processamento subsequentes. Em um aspecto da invenção, as células são lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em um aspecto alternativo, a solução de lavagem carece de cálcio e pode carecer de magnésio ou pode carecer de muitos, se não todos, cátions divalentes. As etapas de ativação inicial na ausência de cálcio podem levar à ativação ampliada. Como aqueles de conhecimento comum na técnica prontamente apreciariam, uma etapa de lavagem pode ser realizada por métodos conhecidos pelos versados na arte, tais como ao se usar uma centrífuga semi-automática "fluída" (por exemplo, o processador de células Cobe 2991, o Baxter CytoMate ou o Haemonetics Cell Saver 5), de acordo com as instruções do fabricante. Após a lavagem, as células podem ser ressuspensas em uma variedade de tampões biocompatíveis, tais como, por exemplo, Ca-livre, PBS livre de Mg, PlasmaLyte A ou outra solução salina com ou sem tampão. Alternativamente, os componentes indesejáveis da amostra de aférese podem ser removidos e as células são ressuspensas diretamente em meios de cultura.

[00290] Em um aspecto, as células T são isoladas a partir de linfócitos de sangue periférico por lise dos glóbulos vermelhos e esvaziando os monócitos, por

exemplo, por centrifugação através de um gradiente PERCOLL™ ou por elutriação centrífuga de contra-fluxo. Uma subpopulação específica de células T, como células CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ e CD45RO+, pode ser adicionalmente isolada por técnicas de seleção positiva ou negativa. Por exemplo, em um aspecto, as células T são isoladas por incubação com grânulos conjugados com anti-CD3/anti-CD28 (*por exemplo, 3x28*), tais como DYNABEADS™ M-450 CD3/CD28 T, durante um período de tempo suficiente para a seleção positiva das células T desejadas. Em um aspecto, o período de tempo é de cerca de 30 minutos. Em um aspecto adicional, o período de tempo varia de 30 minutos a 36 horas ou mais e todos os valores inteiros entre eles. Em um aspecto adicional, o período de tempo é pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 horas. Ainda em outro aspecto preferencial, o período de tempo é de 10 a 24 horas. Em um aspecto, o período de tempo de incubação é de 24 horas. Tempos de incubação mais longos podem ser usados para isolar células T em qualquer situação em que haja poucas células T em comparação com outros tipos de células, como no isolamento de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) do tecido tumoral ou de indivíduos imunocomprometidos. Além disso, o uso de tempos de incubação mais longos pode aumentar a eficiência da captura de células T CD8+. Assim, ao simplesmente reduzir ou prolongar o tempo em que se permite que as células T se liguem aos grânulos CD3/CD28 e/ou ao se aumentar ou diminuir a razão de grânulos para células T (como adicionalmente descrito neste documento), as subpopulações de células T podem ser preferencialmente selecionadas para ou contra na iniciação da cultura ou em outros momentos durante o processo. Adicionalmente, ao se aumentar ou diminuir a razão de anticorpos anti-CD3 e/ou anti-CD28 nos grânulos ou outra superfície, subpopulações de células T podem ser preferencialmente selecionadas a favor ou contra na iniciação da cultura ou em outros momentos desejados. O versado na técnica reconheceria que várias sessões de seleção também podem ser usadas no contexto desta invenção. Em certos aspectos, pode ser desejável executar o procedimento de seleção e usar as células "não selecionadas" no processo de ativação e expansão. As células "não selecionadas" também podem ser submetidas a sessões de seleção adicionais.

[00291] O enriquecimento de uma população de células T por seleção negativa pode ser realizado com uma combinação de anticorpos direcionados para

marcadores de superfície únicos para as células selecionadas negativamente. Um método é a classificação e/ou seleção de células por meio de imunoadesância magnética negativa ou citometria de fluxo que usa um coquetel de anticorpos monoclonais direcionados para marcadores de superfície celular presentes nas células negativamente selecionadas. Por exemplo, para enriquecer células CD4+ por seleção negativa, um coquetel de anticorpo monoclonal normalmente inclui anticorpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR e CD8. Em certos aspectos, pode ser desejável enriquecer ou selecionar positivamente para células T reguladoras que tipicamente expressam CD4+, CD25 +, CD62Lhi, GITR + e FoxP3 +. Alternativamente, em certos aspectos, as células T reguladoras são esgotadas por grânulos conjugados anti-CD25 ou outro método de seleção similar.

[00292] Em uma modalidade, uma população de células T pode ser selecionada que expressa um ou mais dentre IFN- γ , TNF-alfa, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL -13, granzima B e perforina, ou outras moléculas apropriadas, *por exemplo*, outras citocinas. Os métodos para o triagem da expressão celular podem ser determinados, *por exemplo*, pelos métodos descritos na Publicação PCT WO 2013/126712.

[00293] Para o isolamento de uma população de células desejada por seleção positiva ou negativa, a concentração de células e de superfície (*por exemplo*, partículas como grânulos) pode ser variada. Em certos aspectos, pode ser desejável diminuir significativamente o volume em que os grânulos e as células são misturados entre si (*por exemplo*, aumentar a concentração de células), para assegurar o contato máximo de células e grânulos. Por exemplo, em um aspecto, uma concentração de 2 bilhões de células/ml é usada. Em um aspecto, uma concentração de 1 bilhão de células/ml é utilizada. Em um aspecto adicional, mais de 100 milhões de células/mL são usadas. Em um aspecto adicional, uma concentração de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 milhões de células/ml é utilizada. Ainda em um aspecto, uma concentração de células de 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 milhões de células/ml é utilizada. Em aspectos adicionais, concentrações de 125 ou 150 milhões de células/ml podem ser utilizadas. O uso de altas concentrações pode resultar em rendimento celular aumentado, ativação celular e expansão celular. Adicionalmente, o uso de altas concentrações celulares possibilita uma captura mais eficiente de células que podem expressar de forma

debilitada antígenos-alvo de interesse, tais como células T CD28 negativas, ou a partir de amostras onde existem muitas células tumorais presentes (*por exemplo*, sangue leucêmico, tecido tumoral, etc.). Tais populações de células podem ter valor terapêutico e seriam desejáveis para obter. Por exemplo, usar alta concentração de células permite seleção mais eficiente de células T CD8+ que normalmente têm expressão CD28 mais debilitada.

[00294] Em um aspecto relacionado, pode ser desejável usar menores concentrações de células. Ao diluir significativamente a mistura de células T e superfície (*por exemplo*, partículas como grânulos), as interações entre as partículas e as células são minimizadas. Isto seleciona células que expressam grandes quantidades de antígenos desejados a serem ligados às partículas. Por exemplo, as células T CD4+ expressam níveis mais elevados de CD28 e são capturadas com mais eficiência do que as células T CD8+ em concentrações diluídas. Em um aspecto, a concentração de células usadas é de 5×10^6 /mL. Em outros aspectos, a concentração utilizada pode ser de cerca de 1×10^5 /ml para 1×10^6 /ml, e qualquer valor inteiro no meio. Em outros aspectos, as células podem ser incubadas em um rotor para períodos de tempo variáveis em velocidades variáveis a 2-10°C ou em temperatura ambiente.

[00295] As células T para estimulação também podem ser congeladas após uma etapa de lavagem. Desejando não estar vinculado pela teoria, o congelamento e a etapa de descongelamento subsequente fornecem um produto mais uniforme ao se remover granulócitos e, até certo ponto, monócitos na população de células. Após a etapa de lavagem que remove plasma e plaquetas, as células podem ser suspensas em uma solução congelante. Enquanto muitas soluções e parâmetros de congelamento são conhecidos na técnica e serão úteis neste contexto, um método envolve utilizar PBS contendo DMSO a 20% e albumina de soro humano a 8%, ou meio de cultura contendo dextrano 40 a 10% e dextrose a 5%, albumina de soro humano a 20% e DMSO a 7,5%, ou Plasmalyte-A a 31,25%, dextrose 5% a 31,25%, NaCl a 0,45%, dextrano 40 a 10% e dextrose a 5%, albumina de soro humano a 20% e DMSO a 7,5% ou outros meios de congelamento de células adequados contendo, por exemplo, Hespan e PlasmaLyte A, as células são então congeladas a -80°C a uma taxa de 1 por minuto e armazenadas na fase de vapor de um tanque de armazenamento de nitrogênio líquido. Outros métodos de

congelamento controlado podem ser utilizados, bem como congelamento descontrolado imediatamente a -20°C ou em nitrogênio líquido. Em certos aspectos, as células criopreservadas são descongeladas e lavadas conforme descrito neste documento e deixadas repousar por uma hora em temperatura ambiente antes da ativação usando os métodos da presente invenção.

[00296] Também é contemplado no contexto da invenção a coleta de amostras de sangue ou produto de aférese a partir de um sujeito em um período de tempo anterior ao momento quando as células expandidas, como descritas neste documento, podem ser necessárias. Como tal, a fonte das células a serem expandidas pode ser coletada em qualquer momento necessário, e as células desejadas, tais como as células T, isoladas e congeladas para uso posterior na terapia com células T para qualquer número de doenças ou condições se beneficiaria da terapia com células T, tais como aquelas descritas neste documento. Em um aspecto, uma amostra de sangue ou uma aférese é retirada de um sujeito geralmente saudável. Em certos aspectos, uma amostra de sangue ou uma aférese é retirada de um sujeito geralmente saudável que corre o risco de desenvolver uma doença, mas que ainda não desenvolveu uma doença, e as células de interesse são isoladas e congeladas para utilização posterior. Em certos aspectos, as células T podem ser expandidas, congeladas e usadas em um momento posterior. Em certos aspectos, as amostras são coletadas de um paciente logo após o diagnóstico de uma determinada doença, como descrito neste documento, mas antes de quaisquer tratamentos. Em um aspecto adicional, as células são isoladas de uma amostra de sangue ou uma aférese de um sujeito antes de qualquer número de modalidades de tratamento relevantes, incluindo, mas não limitado a, tratamento com agentes como natalizumabe, efalizumabe, agentes antivirais, quimioterapia, radiação, agentes imunossupressores, tais como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato e FK506, anticorpos ou outros agentes imunológicos, tais como alemtuzumab, anticorpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteróides, FR901228 e irradiação.

[00297] Em um aspecto adicional da presente invenção, as células T são obtidas a partir de um paciente imediatamente após o tratamento que deixa o sujeito com células T funcionais. A este respeito, observou-se que, após certos

tratamentos contra o câncer, em particular tratamentos com drogas que danificam o sistema imunológico, logo após o tratamento durante o período em que os pacientes normalmente se recuperariam do tratamento, a qualidade das células T obtidas pode ser ideal ou melhorada por sua capacidade de expansão *ex vivo*. Da mesma forma, após a manipulação *ex vivo* usando os métodos descritos neste documento, estas células podem estar em um estado preferencial para enxertia e expansão *in vivo* intensificadas. Assim, é contemplado no contexto da presente invenção coletar células sanguíneas, incluindo células T, células dendríticas ou outras células da linhagem hematopoiética, durante esta fase de recuperação. Além disso, em certos aspectos, a mobilização (por exemplo, a mobilização com GM-CSF) e os regimes de condicionamento podem ser usados para criar uma condição em um sujeito em que o repovoamento, a recirculação, a regeneração e/ou expansão de tipos de células particulares são favorecidos, especialmente durante uma janela de tempo definida após a terapia. Os tipos de células ilustrativos incluem células T, células B, células dendríticas e outras células do sistema imunológico.

Ativação e Expansão de Células T

[00298] As células T podem ser ativadas e expandidas geralmente usando métodos como descrito, por exemplo, na Patentes 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041 e 7.572.631.

[00299] Em geral, as células T da invenção podem ser expandidas pelo contato com uma superfície que se liga nelas, um agente que estimula um sinal associado ao complexo CD3/TCR e um ligante que estimula uma molécula co-estimuladora na superfície das células T. Em particular, as populações de células T podem ser estimuladas como descrito neste documento, tal como por contato com um anticorpo anti-CD3, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, ou um anticorpo anti-CD2 imobilizado em uma superfície, ou por contato com um ativador de proteína quinase C (*por exemplo*, briostatina) em conjunto com um ionóforo de cálcio. Para a co-estimulação de uma molécula acessória na superfície das células T, um ligante que liga a molécula acessória é utilizado. Por exemplo, uma população de células T podem estar em contato com um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28, sob condições apropriadas para estimular a proliferação

das células T. Para estimular a proliferação de células T CD4+ ou células T CD8+, um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28. Exemplos de um anticorpo anti-CD28 incluem 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besancon, França) pode ser usado como podem outros métodos comumente conhecidos na técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol. Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

[00300] As células T que foram expostas a tempos de estimulação variados podem exibir características diferentes. Por exemplo, sangue típico ou produtos de células mononucleares de sangue periférico aférrico têm uma população de células T helper (TH, CD4+) que é maior do que a população de células T citotóxicas ou supressoras (TC, CD8+). A expansão *ex vivo* das células T estimulando os receptores CD3 e CD28 produz uma população de células T que antes dos dias 8-9 consiste predominantemente em células TH, enquanto após cerca dos dias 8-9, a população de células T compreende uma população cada vez maior de células TC. Por conseguinte, dependendo da finalidade do tratamento, a infusão de um sujeito com uma população de células T compreendendo predominantemente células TH pode ser vantajosa. Da mesma forma, se um subconjunto específico de antígeno de células TC for isolado, pode ser benéfico expandir este subconjunto em grau superior.

[00301] Além disso, além de marcadores para CD4 e CD8, outros marcadores fenotípicos variam significativamente, mas, em grande parte, reproduzíveis durante o processo de expansão celular. Assim, tal reprodutibilidade possibilita a capacidade de adaptar um produto de célula T ativado para fins específicos.

[00302] Uma vez que um anti-TAA TFP é construído, vários ensaios podem ser usados para avaliar a atividade da molécula, tais como, mas não se limitando a, a capacidade de expandir células T após estimulação de antígeno, sustentar a expansão de células T na ausência de re-estimulação e atividades anticâncer em modelos *in vitro* e animais apropriados. Os ensaios para avaliar os efeitos de anti-TAA TFP são descritos em mais detalhes abaixo.

[00303] A análise por Western blot da expressão de TFP em células T primárias pode ser utilizada para detectar a presença de monômeros e dímeros (ver, *por exemplo*, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). Muito

brevemente, as células T (mistura de 1:1 de células T de CD4⁺ e CD8⁺) expressando as TFPs são expandidas *in vitro* por mais de 10 dias seguido de lise e SDS-PAGE sob condições redutoras. As TFPs são detectadas por Western Blot usando um anticorpo para uma cadeia de TCR. Os mesmos subconjuntos de células T são usados para análise de SDS-PAGE sob condições não redutoras para permitir a avaliação da formação de dímero covalente.

[00304] A expansão *in vitro* de células T TFP⁺ após a estimulação do antígeno pode ser medida por citometria de fluxo. Por exemplo, uma mistura de células CD4⁺ e CD8⁺ T são estimuladas com alphaCD3/alphaCD28 e APCs, seguido por transdução com vetores lentivirais que expressam GFP sob o controle dos promotores a serem analisados. Os promotores exemplares incluem o gene CMV IE, EF-1alfa, ubiquitina C ou promotores de fosfoglicerinase (PGK). A fluorescência de GFP é avaliada no dia 6 de cultura nos subconjuntos de células T CD4⁺ e/ou CD8⁺ por citometria de fluxo (ver, *por exemplo*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Alternativamente, uma mistura de células T CD4⁺ e CD8⁺ são estimuladas com esferas magnéticas revestidas com alphaCD3/alphaCD28 no dia 0 e transduzidas com TFP no dia 1 usando um vetor lentiviral bicistrônico expressando TFP juntamente com eGFP, usando uma sequência de salto ribossômico 2A. As culturas são re-estimuladas com células TAA⁺ (por exemplo, células K562), células K562 de tipo selvagem (K562 tipo selvagem) ou células K562 que expressam hCD32 e 4-1BBL na presença de anticorpos antiCD3 e anti-CD28 (K562-BBL-3/28) após a lavagem. A IL-2 exógena é adicionada às culturas em dias alternados a 100 UI/ml. As células T GFP⁺ são enumeradas por citometria de fluxo usando contagem baseada em grânulos (ver, *por exemplo*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)).

[00305] A expansão sustentada das células TFP+T na ausência de re-estimulação também pode ser medida (ver, *por exemplo*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Resumidamente, o volume médio de células T (fl) é medido no dia 8 de cultura usando um contador de partículas Coulter Multisizer III após estimulação com esferas magnéticas revestidas com alphaCD3/alphaCD28 no dia 0 e transdução com o TFP indicado no dia 1.

[00306] Modelos animais também podem ser usados para medir uma atividade de TFP-T. Por exemplo, o modelo de xenoenxerto usando células T TAA

específico TFP+ humanas para tratar um câncer em camundongos imunodeficientes (ver, *por exemplo*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Muito brevemente, após o estabelecimento do câncer, os camundongos são randomizados quanto aos grupos de tratamento. Números diferentes de células T modificadas são co-injetados em uma razão de 1:1 em camundongos NOD/SCID/ γ -/- com câncer. O número de cópias de cada vetor no DNA do baço de camundongos é avaliado em vários momentos após a injeção de células T. Os animais são avaliados para câncer em intervalos semanais. As contagens de células cancerosas TAA+ no sangue periférico são medidas em camundongos que são injetados com células T alfa-TAA-zeta TFP+ ou células T com transdução simulada. As curvas de sobrevivência para os grupos são comparadas usando o teste log-rank. Além disso, as contagens absolutas de células T CD4+ e CD8+ no sangue periférico 4 semanas após a injeção de células T em camundongos NOD/SCID/ γ -/- também podem ser analisadas. Os camundongos são injetados com células cancerosas e 3 semanas mais tarde são injetados com células T manipuladas para expressar TFP por um vetor lentiviral bicistrônico que codifica a TFP ligada a eGFP. As células T são normalizadas para células T GFP+ de entrada de 45-50%, misturando-se com células de transdução simulada antes da injeção e confirmadas por citometria de fluxo. Os animais são avaliados para câncer em intervalos de 1 semana. As curvas de sobrevivência para os grupos de células T TFP+ são comparadas usando o teste log-rank.

[00307] A resposta ao tratamento TFP dependente da dose pode ser avaliada (ver, *por exemplo*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Por exemplo, o sangue periférico é obtido 35-70 dias após o estabelecimento do câncer em camundongos injetados no dia 21 com células T TFP, um número equivalente de células T transduzidas falsamente ou nenhuma célula T. Os camundongos de cada grupo são sangrados aleatoriamente para a determinação das contagens de células cancerosas TAA+ no sangue periférico e, em seguida, mortos nos dias 35 e 49. Os animais restantes são avaliados nos dias 57 e 70.

[00308] A avaliação da proliferação celular e da produção de citocinas foi previamente descrita, *por exemplo*, em Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Resumidamente, a avaliação da proliferação mediada por TFP

é realizada em placas de microtitulação misturando células T lavadas com células que expressam TAA ou CD32 e CD137 (KT32-BBL) para uma célula:célula T final que expressa a razão TAA de 2:1. As células que expressam TAA são irradiadas com radiação gama antes do uso. Anticorpos monoclonais anti-CD3 (clone OKT3) e anti-CD28 (clone 9.3) são adicionados a culturas com células KT32-BBL para servir como um controle positivo para estimular a proliferação de células T, uma vez que esses sinais suportam a expansão de células T CD8+ de longo prazo *ex vivo*. As células T são enumeradas em culturas usando esferas fluorescentes CountBright™ (Invitrogen) e citometria de fluxo conforme descrito pelo fabricante. As células T TFP+ são identificadas pela expressão de GFP usando células T que são manipuladas com vetores lentivirais que expressam TFP ligados a eGFP-2A. Para células T TFP+ que não expressam GFP, as células T TFP+ são detectadas com a proteína TAA recombinante biotinizada e um conjugado avidina-PE secundário. A expressão de CD4+ e CD8+ em células T também é detectada simultaneamente com anticorpos monoclonais específicos (BD Biosciences). As medições de citocina são executadas em sobrenadantes coletados 24 horas após a re-estimulação usando o kit de matrizes de grânulo citométrico de citocina TH1/TH2 humana (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. A fluorescência é avaliada usando um citômetro de fluxo FACScalibur e os dados são analisados de acordo com as instruções do fabricante.

[00309] A citotoxicidade pode ser avaliada por uma matrix de liberação de ⁵¹Cr padrão (*ver*, por exemplo, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Resumidamente, as células alvo são carregadas com ⁵¹Cr (como NaCrO₄, New England Nuclear) a 37° C durante 2 horas com agitação frequente, lavadas duas vezes em meio RPMI completo e semeadas em placas de microtitulação. As células T efectoras são misturadas com as células alvo nos poços em RPMI completo em razões variáveis de célula efectora:célula alvo (E:T). Poços adicionais contendo apenas meios (liberação espontânea, SR) ou uma solução a 1% de detergente triton-X 100 (liberação total, TR) também são preparados. Após 4 horas de incubação a 37°C, o sobrenadante de cada poço é coletado. O ⁵¹Cr liberado é então medido usando um contador de partículas gama (Packard Instrument Co., Waltham, Mass.). Cada condição é realizada em pelo menos triplicado, e a porcentagem de lise é calculada usando a fórmula: % Lise = (ER-SR)/(TR-SR), em

que ER representa a média de ^{51}Cr liberada para cada condição experimental.

[00310] As tecnologias de imageamento podem ser usadas para avaliar tráfego específico e proliferação de TFPs em modelos animais portadores de tumores. Tais ensaios foram descritos, *por exemplo*, em Barrett et al., Human Gene Therapy 22:1575-1586 (2011). Resumidamente, camundongos NOD/SCID/ $\gamma\text{c}/-$ (NSG) são injetados IV com células cancerosas seguidas 7 dias depois com células T 4 horas após a eletroporação com os construtos de TFP. As células T são transfectadas de forma estável com um construto lentiviral para expressar a luciferase do pirilampo, e os camundongos são submetidos a imageamento para a bioluminescência. Alternativamente, a eficácia terapêutica e a especificidade de uma única injeção de células T TFP + em um modelo de xenoenxerto de câncer podem ser medidas como segue: camundongos NSG são injetados com células cancerosas transduzidas para expressar estávelmente luciferase de pirilampo, seguido por uma injeção de células T na veia da cauda única eletroporado com TAA TFP 7 dias depois. Os animais são fotografados em vários momentos após a injeção. Por exemplo, mapas de calor de densidade de fótons de câncer de luciferase de pirilampo positivo em camundongos representativos no dia 5 (2 dias antes do tratamento) e no dia 8 (24 horas após TFP + PBLs) podem ser gerados.

[00311] Outros ensaios, incluindo aqueles descritos na seção Exemplo neste documento, bem como aqueles que são conhecidos na técnica, também podem ser usados para avaliar os construtos de TFP anti-TAA da presente divulgação.

Aplicações Terapêuticas

Doenças e/ou distúrbios associados a MUC16, IL13R α 2 e MSLN

[00312] Em um aspecto, a presente divulgação fornece métodos para o tratamento de uma doença associada à expressão de MUC16, IL13R α 2 ou MSLN. Em um aspecto, a presente divulgação fornece métodos para o tratamento de uma doença em que parte do tumor é negativa para MUC16, IL13R α 2 ou MSLN e parte do tumor é positiva para MUC16, IL13R α 2 ou MSLN. Por exemplo, o TFP da presente divulgação é útil para o tratamento de sujeitos que foram submetidos a tratamento para uma doença associada à expressão elevada de MUC16, IL13R α 2 ou MSLN, em que o sujeito que foi submetido a tratamento para níveis elevados de MUC16, IL13R α 2 ou MSLN exibe uma doença associada a níveis elevados de

MUC16, IL13R α 2 ou MSLN.

[00313] Em um aspecto, a presente divulgação se refere a um vetor que compreende anti-TAA TFP operacionalmente ligado ao promotor para expressão em células T de mamífero. Em um aspecto, a presente divulgação fornece uma célula T recombinante que expressa o MUC16, IL13R α 2 ou MSLN TFP para uso no tratamento de tumores que expressam MUC16, IL13R α 2 ou MSLN, respectivamente, em que a célula T recombinante que expressa o MUC16, IL13R α 2 ou MSLN TFP é denominado MUC16, IL13R α 2 ou MSLN TFP-T. Em um aspecto, o MUC16, IL13R α 2, ou MSLN TFP-T da presente divulgação é capaz de contatar uma célula tumoral com pelo menos um MUC16, IL13R α 2 ou MSLN TFP da invenção expresso em sua superfície de modo que o TFP-T almeje a célula tumoral e o crescimento do tumor são inibidos.

[00314] Em um aspecto, a presente divulgação se refere a um método para inibir o crescimento de uma célula tumoral que expressa MUC16, IL13R α 2 ou MSLN, compreendendo o contato da célula tumoral com uma célula T anti-MUC16, anti-IL13R α 2 ou anti-MSLN TFP da presente divulgação, de modo que o TFP-T seja ativado em resposta ao antígeno (por exemplo, o antígeno MUC16, IL13R α 2 ou MSLN presente na superfície da célula cancerígena) e tenha como alvo a célula cancerígena, em que o crescimento tumoral é inibido.

[00315] Em um aspecto, a presente divulgação refere-se a um método de tratamento de câncer em um sujeito. O método compreende a administração ao sujeito de uma célula T anti-TAATFP da presente divulgação, de modo que o câncer seja tratado no sujeito. Um exemplo de um câncer que é tratável pela célula T anti-TAA TFP da invenção é um câncer associado à expressão do TAA correspondente. Em um aspecto, o câncer é um mesotelioma. Em um aspecto, o câncer é um câncer pancreático. Em um aspecto, o câncer é um câncer do ovário. Em um aspecto, o câncer é um câncer estomacal. Em um aspecto, o câncer é um câncer do pulmão. Em um aspecto, o câncer é um câncer do endométrio. Em algumas modalidades, a terapia anti-TAA TFP pode ser usada em combinação com uma ou mais terapias adicionais.

[00316] A invenção inclui um tipo de terapia celular em que as células T são geneticamente modificadas para expressar uma TFP e as células T que expressam TFP são infundidas em um receptor que delas necessite. A célula infundida é capaz

de matar células tumorais no receptor. Ao contrário das terapias com anticorpos, as células T que expressam TFP são capazes de se replicar *in vivo*, resultando em persistência de longo prazo que pode levar ao controle sustentado do tumor. Em vários aspectos, as células T administradas ao paciente, ou sua progênie, persistem no paciente por pelo menos um mês, dois meses, três meses, quatro meses, cinco meses, seis meses, sete meses, oito meses, nove meses, dez meses, onze meses, doze meses, treze meses, quatorze meses, quinze meses, dezesseis meses, dezessete meses, dezoito meses, dezenove meses, vinte meses, vinte e um meses, vinte e dois meses, vinte e três meses, dois anos, três anos, quatro anos ou cinco anos após a administração da célula T ao paciente.

[00317] A presente invenção também inclui um tipo de terapia celular em que as células T são modificadas, *por exemplo*, por RNA transcrito *in vitro*, para expressar transitoriamente uma TFP e a células T que expressa TFP são infundidas em um receptor que necessite das mesmas. A célula infundida é capaz de matar células tumorais no receptor. Assim, em vários aspectos, as células T administradas ao paciente, estão presentes por menos de um mês, *por exemplo*, três semanas, duas semanas ou uma semana, após a administração das células T ao paciente.

[00318] Sem querer estar vinculado por qualquer teoria particular, a resposta de imunidade antitumoral induzida pelas células T que expressam TFP pode ser uma resposta imune ativa ou passiva ou, alternativamente, pode ser devido a uma resposta imune direta versus indireta. Em um aspecto, as células T transduzidas por TFP exibem secreção de citocina pró-inflamatória específica e atividade citolítica potente em resposta a células cancerosas humanas que expressam o antígeno associado ao tumor (TAA) (por exemplo, MUC16, IL13R α 2 ou MSLN), resistem à inibição de TAA solúvel, medeiam espectador matar e/ou mediar a regressão de um tumor humano estabelecido. Por exemplo, células tumorais sem antígeno dentro de um campo heterogêneo de tumor que expressa TAA podem ser suscetíveis à destruição indireta por células T redirecionadas por TAA que reagiram previamente contra células cancerosas positivas para antígeno adjacentes.

[00319] Em um aspecto, as células T modificadas com TFP humana da presente divulgação podem ser um tipo de vacina para imunização *ex vivo* e/ou terapia *in vivo* em um mamífero. Em um aspecto, o mamífero é um humano.

[00320] Em relação à imunização *ex vivo*, pelo menos um dentre os seguintes ocorre *in vitro* antes da administração da célula a um mamífero: i) expansão das células, ii) introdução de um ácido nucleico que codifica uma TFP nas células ou iii) criopreservação das células.

[00321] Os procedimentos *ex vivo* são bem conhecidos na técnica e são discutidos mais detalhadamente abaixo. Resumidamente, as células são isoladas de um mamífero (*por exemplo*, um humano) e geneticamente modificadas (ou seja, transduzidas ou transfectadas *in vitro*) com um vetor que expressa uma TFP divulgada neste documento. A célula modificada com TFP pode ser administrada a um receptor de mamífero para fornecer um benefício terapêutico. O receptor de mamífero pode ser um humano e a célula modificada por TFP pode ser autóloga em relação ao receptor. Alternativamente, as células podem ser alogênicas, singênicas ou xenogênicas em relação ao receptor.

[00322] O procedimento para expansão *ex vivo* de células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras é descrito na Patente 5.199.942, incorporada neste documento por referência, pode ser aplicada às células da presente invenção. Outros métodos adequados são conhecidos na técnica, portanto, a presente invenção não está limitada a nenhum método particular de expansão *ex vivo* das células. Resumidamente, cultura *ex vivo* e a expansão das células T compreendem: (1) coletar células progenitoras e tronco CD34+ hematopoiéticas de um mamífero de coleta de sangue periférico ou explantes de medula óssea; e (2) expandir tais células *ex vivo*. Além dos fatores de crescimento celular descritos na Patente 5.199.942, outros fatores tais como flt3-L, IL-1, IL-3 e ligante c-kit, podem ser usados para cultura e expansão das células.

[00323] Além de usar uma vacina baseada em células em termos de imunização *ex vivo*, a presente invenção também fornece composições e métodos para imunização *in vivo* para induzir uma resposta imunológica dirigida contra um antígeno em um paciente.

[00324] Em geral, as células ativadas e expandidas conforme descrito neste documento podem ser utilizadas no tratamento e prevenção de doenças que surgem em indivíduos que são imunocomprometidos. Em particular, as células T modificadas por TFP da invenção são usadas no tratamento de doenças, distúrbios e condições associadas à expressão de MUC16, IL13R α 2 ou MSLN. Em certos

aspectos, as células da invenção são utilizadas no tratamento de pacientes em risco de desenvolver doenças, transtornos e condições associadas à expressão de MUC16, IL13R α 2 ou MSLN. Assim, a presente invenção fornece métodos para o tratamento ou a prevenção de doenças, transtornos e condições associadas à expressão de MUC16, IL13R α 2 ou MSLN compreendendo a administração a um sujeito que necessite dos mesmos, uma quantidade terapeuticamente eficaz das células T modificadas com TFP da invenção.

[00325] Em um aspecto, as células TFP-T da presente divulgação podem ser usadas para tratar uma doença proliferativa, como um câncer ou malignidade ou uma condição pré-cancerosa. Em um aspecto, o câncer é um mesotelioma. Em um aspecto, o câncer é um câncer pancreático. Em um aspecto, o câncer é um câncer do ovário. Em um aspecto, o câncer é um câncer estomacal. Em um aspecto, o câncer é um câncer do pulmão. Em um aspecto, o câncer é câncer mama. Em um aspecto, o câncer é um câncer do endométrio. Além disso, uma doença associada à expressão de MUC16, IL13R α 2 ou MSLN inclui, mas não está limitada a, por exemplo, cânceres atípicos e/ou não clássicos, doenças malignas, condições pré-cancerosas ou doenças proliferativas que expressam MUC16, IL13R α 2 ou MSLN. As indicações não relacionadas ao câncer associadas à expressão de MUC16, IL13R α 2 ou MSLN incluem, mas não estão limitadas a, por exemplo, doença autoimune, (por exemplo, lúpus), distúrbios inflamatórios (alergia e asma), doença inflamatória intestinal, cirrose hepática, cardíaca falha, infecção peritoneal e cirurgia abdominal e transplante.

[00326] As células T modificadas com TFP da presente invenção podem ser administradas sozinhas ou como uma composição farmacêutica em combinação com diluentes e/ou com outros componentes, tais como IL-2 ou outras citocinas ou populações de células.

[00327] A presente invenção também fornece métodos para inibir a proliferação ou reduzir uma população de células que expressam TAA, sendo que os métodos compreendem o contato de uma população de células compreendendo uma célula que expressa TAA com uma célula TFP-T anti-TAA da presente divulgação que se liga à célula que expressa TAA. Em alguns aspectos, a presente divulgação fornece métodos para inibir a proliferação ou reduzir a população de células cancerosas que expressam TAA, sendo que os métodos compreendem o

contato da população de células cancerígenas que expressam TAA com uma célula TFP-T anti-TAA da presente divulgação que se liga à célula que expressa TAA. Em um aspecto, a presente divulgação fornece métodos para inibir a proliferação ou reduzir a população de células cancerosas que expressam o antígeno associado ao tumor, sendo que os métodos compreendem o contato da população de células cancerígenas que expressam TAA com uma célula anti-TAA TFP-T da presente divulgação que se liga à célula que expressa TAA. Em certos aspectos, a célula anti-TAA TFP-T da presente divulgação reduz a quantidade, número, montante ou porcentagem de células e/ou células cancerosas em pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 65%, pelo menos 75%, pelo menos 85%, pelo menos 95% ou pelo menos 99% em um sujeito com ou modelo animal de um câncer associado a células que expressam TAA em relação a um controle negativo. Em um aspecto, o sujeito é um ser humano.

[00328] A presente divulgação também fornece métodos para prevenir, tratar e/ou administrar uma doença associada a células que expressam TAA (*por exemplo*, um câncer que expressa TAA), sendo que os métodos compreendem a administração a um sujeito em necessidade de uma célula anti-TAA TFP-T da presente divulgação que se liga à célula que expressa TAA. Em um aspecto, o sujeito é um ser humano. Exemplos não limitativos de distúrbios associados a células que expressam TAA incluem distúrbios autoimunes (como lúpus), distúrbios inflamatórios (como alergias e asma) e cânceres (como câncer de pâncreas, câncer de ovário, câncer de estômago, câncer de pulmão ou câncer endometrial ou cânceres atípicos que expressam TAA).

[00329] A presente divulgação também fornece métodos para prevenir, tratar e/ou administrar uma doença associada a células que expressam TAA, sendo que os métodos compreendem a administração a um sujeito em necessidade de uma célula anti-TAA TFP-T da presente divulgação que se liga à célula que expressa TAA. Em um aspecto, o sujeito é um ser humano.

[00330] A presente divulgação fornece métodos para prevenir a recidiva do câncer associado a células que expressam TAA, sendo que os métodos compreendem a administração a um sujeito em necessidade de uma célula anti-TAA TFP-T da presente divulgação que se liga à célula que expressa TAA. Em um aspecto, os métodos compreendem administrar ao sujeito que necessite dos

mesmos uma quantidade eficaz de uma célula anti-TAA TFP-T descrita neste documento que se liga à célula que expressa TAA em combinação com uma quantidade eficaz de outra terapia.

Terapias de Combinação

[00331] Uma célula que expressa TFP descrita neste documento pode ser utilizada em combinação com outros agentes e terapias conhecidas. Administrado "em combinação", tal como utilizado neste documento, significa que dois (ou mais) tratamentos diferentes são administrados ao sujeito durante o curso da aflição do sujeito com o distúrbio, *por exemplo*, os dois ou mais tratamentos são administrados após o sujeito ter sido diagnosticado com a doença e antes que a doença tenha sido curada ou eliminada ou o tratamento tenha cessado por outras razões. Em certas outras modalidades, a distribuição de um tratamento ainda está ocorrendo quando a distribuição do segundo começa, de modo que há sobreposição em termos de administração. Isto é, por vezes, referido neste documento como aplicação "simultânea" ou "concomitante". Em outras modalidades, a aplicação de um tratamento termina antes do início da aplicação de outro tratamento. Em algumas modalidades de ambos os casos, o tratamento é mais eficaz por causa de administração combinada. Por exemplo, o segundo tratamento é mais eficaz, *por exemplo*, um efeito equivalente é visto com menos do segundo tratamento, ou o segundo tratamento reduz os sintomas em maior medida do que seria visto se o segundo tratamento fosse administrado na ausência do primeiro tratamento, ou a situação análoga é vista com o primeiro tratamento. Em algumas modalidades, a aplicação é tal que a redução de um sintoma, ou outro parâmetro relacionado com o distúrbio é maior do que aquele que seria observado com um tratamento aplicado na ausência do outro. O efeito dos dois tratamentos pode ser parcialmente aditivo, totalmente aditivo ou maior do que aditivo. A administração pode ser tal que o efeito do primeiro tratamento aplicado é ainda detectável quando o segundo é aplicado.

[00332] Em algumas modalidades, o "pelo menos um agente terapêutico adicional" inclui uma célula que expressa TFP. Também são fornecidas células T que expressam várias TFPs, as quais se ligam aos antígenos alvos iguais ou diferentes, ou epítomos iguais ou diferentes no mesmo antígeno alvo. Também são fornecidas populações de células T, em que um primeiro subconjunto de células T

expressa uma primeira TFP e um segundo subconjunto de células T expressa uma segunda TFP.

[00333] Uma célula que expressa TFP descrita neste documento e pelo menos um agente terapêutico adicional podem ser administrados simultaneamente, na mesma composição ou em composições separadas, ou sequencialmente. Para administração sequencial, a célula que expressa TFP descrita neste documento pode ser administrada primeiro, e o agente adicional pode ser administrado segundo, ou a ordem de administração pode ser invertida.

[00334] Em outros aspectos, uma célula que expressa TFP descrita neste documento pode ser usada em um regime de tratamento em combinação com cirurgia, quimioterapia, radiação, agentes imunossuppressores, tais como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato e FK506, anticorpos ou outros agentes imunoablativos, tais como as alemtuzumab, anticorpos anti-CD3 ou outras terapias de anticorpos, citocina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiação. Uma célula que expressa TFP descrita neste documento também pode ser usada em combinação com uma vacina de peptídeo, tal como a descrita em Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971. Em um aspecto adicional, uma célula que expressa TFP descrita neste documento também pode ser usada em combinação com um promotor de diferenciação de células mieloides (por exemplo, ácido todo-trans retinoico), um inibidor da expansão de células supressoras derivadas de mielóide (MDSC) (por exemplo, inibidores do receptor c-kit ou um inibidor de VEGF), uma inibição da função de MDSC (por exemplo, inibidores de COX2 ou inibidores de fosfodiesterase-5) ou eliminação terapêutica de MDSCs (por exemplo, com um regime quimioterápico, como tratamento com doxorrubicina e ciclofosfamida). Outros agentes terapêuticos que podem prevenir a expansão de MDSCs incluem aminobifosfonato, bifosfonato, sildenafil e tadalafil, nitroaspirina, vitamina D3 e gencitabina. (Ver, por exemplo, Gibrilovich e Nagaraj, *Nat. Rev. Immunol.*, (2009) v9 (3):162-174).

[00335] Em uma modalidade, o sujeito pode ser administrado com um agente que reduz ou melhora um efeito colateral associado à administração de uma célula que expressa TFP. Os efeitos colaterais associados à administração de uma célula que expressa TFP incluem, mas não estão limitados a, síndrome de liberação

de citocina (CRS), e linfocitose hemofagocítica (HLH), também denominada síndrome de ativação de macrófagos (MAS). Os sintomas de CRS incluem febres altas, náuseas, hipotensão transitória, hipoxia e similares. Por conseguinte, os métodos descritos neste documento podem compreender administrar uma célula que expressa TFP, descrita neste documento, a um sujeito e adicionalmente administrar um agente para gerir níveis elevados de um fator solúvel resultante do tratamento com uma célula que expressa TFP. Em uma modalidade, o fator solúvel elevado no sujeito é um ou mais dentre IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-6 e IL8. Portanto, um agente administrado para tratar esse efeito colateral pode ser um agente que neutraliza um ou mais desses fatores solúveis. Tais agentes incluem, mas não estão limitados a, um esteroide, um inibidor do TNF α e um inibidor de IL-6. Um exemplo de um inibidor de TNF α é entanercept. Um exemplo de um inibidor de IL-6 é tocilizumabe (toc).

[00336] Em uma modalidade, o indivíduo pode ser administrado com um agente que intensifica a atividade de uma célula que expressa TFP. Por exemplo, em uma modalidade, o agente pode ser um agente que inibe uma molécula inibitória. Moléculas inibitórias, *por exemplo*, Morte Programada 1 (PD1), podem, em algumas modalidades, diminuir a capacidade de uma célula que expressa TFP para montar uma resposta efetora imunológica. Exemplos de moléculas inibitórias incluem PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 e TGFR beta. Inibição de uma molécula inibitória, *por exemplo*, por inibição no nível de DNA, RNA ou proteína, pode otimizar um desempenho de células que expressam TFP. Em modalidades, um ácido nucleico inibitório, *por exemplo*, um ácido nucleico inibitório, *por exemplo*, um dsRNA, *por exemplo*, um siRNA ou shRNA, pode ser usado para inibir a expressão de uma molécula inibitória na célula que expressa TFP. Em uma modalidade o inibidor é um shRNA. Em uma modalidade, a molécula inibitória é inibida no interior de uma célula que expressa TFP. Nessas modalidades, uma molécula de dsRNA que inibe a expressão da molécula inibidora está ligada ao ácido nucleico que codifica um componente, *por exemplo*, todos os componentes da TFP. Em uma modalidade, o inibidor de um sinal inibitório pode ser, *por exemplo*, um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a uma molécula inibitória. Por exemplo, o agente pode ser um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a PD1, PD-L1, PD-L2 ou CTLA4 (*por exemplo*,

ipilimumab (também referido como MDX-010 e MDX-101, e comercializado como Yervoy™; Bristol- Myers Squibb; tremelimumab (anticorpo monoclonal IgG2 disponível na Pfizer, anteriormente conhecido como ticilimumab, CP-675,206)). Em uma modalidade, o agente é um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a TIM3. Em uma modalidade, o agente é um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a LAG3.

[00337] Em algumas modalidades, as células T podem ser alteradas (por exemplo, por transferência de gene) *in vivo* por meio de um lentivírus, por exemplo, um lentivírus visando especificamente uma célula T CD4+ ou CD8+. (Ver, por exemplo, Zhou et al., J. Immunol. (2015) 195:2493-2501).

[00338] Em algumas modalidades, o agente que intensifica a atividade de uma célula que expressa TFP pode ser, *por exemplo*, uma proteína de fusão compreendendo um primeiro domínio e um segundo domínio, em que o primeiro domínio é uma molécula inibitória, ou fragmento desta, e o segundo domínio é um polipeptídeo que está associado a um sinal positivo, *por exemplo*, um polipeptídeo compreendendo um domínio de sinalização intracelular conforme descrito neste documento. Em algumas modalidades, o polipeptídeo que está associado a um sinal positivo pode incluir um domínio co-estimulador de CD28, CD27, ICOS, *por exemplo*, um domínio de sinalização intracelular de CD28, CD27 e/ou ICOS e/ou um domínio de sinalização primário, *por exemplo*, de CD3 zeta, *por exemplo*, descrito neste documento. Em uma modalidade, a proteína de fusão é expressa pela mesma célula que expressou a TFP. Em outra modalidade, a proteína de fusão é expressa por uma célula, *por exemplo*, uma célula T que não expressa um anti-TAA TFP.

Composições Farmacêuticas

[00339] As composições farmacêuticas da presente divulgação podem compreender uma célula que expressa TFP, *por exemplo*, uma pluralidade de células que expressam TFP, conforme descrito neste documento, em combinação com um ou mais veículos, diluentes ou excipientes farmacêuticamente ou fisiologicamente aceitáveis. Tais composições podem compreender tampões, tais como solução salina tamponada neutra, solução salina tamponada com fosfato e similares; carboidratos, tais como glicose, manose, sacarose ou dextranos, manitol; proteínas; polipeptídeos ou aminoácidos, tais como glicina; antioxidantes; agentes

quelantes, tais como EDTA ou glutathione; adjuvantes (*por exemplo*, hidróxido de alumínio); e conservantes. As composições da presente divulgação são em um aspecto formuladas para administração intravenosa.

[00340] As composições farmacêuticas da presente divulgação podem ser administradas de uma maneira apropriada para a doença a ser tratada (ou prevenida). A quantidade e a frequência de administração serão determinadas por tais fatores como a condição do paciente e o tipo e a gravidade da doença do paciente, embora as dosagens apropriadas possam ser determinadas por triagens clínicas.

[00341] Em uma modalidade, a composição farmacêutica é substancialmente livre, *por exemplo*, não há níveis detectáveis de um contaminante, *por exemplo*, selecionado do grupo que consiste em endotoxina, micoplasma, lentivírus componente de replicação (RCL), p24, ácido nucleico VSV-G, HIV gag, grânulos revestidos com anti-CD3/anti-CD28 residual, anticorpos de camundongo, soro humano em conjunto, albumina de soro bovino, soro bovino, componentes de meios de cultura, células de empacotamento de vetor ou componentes plasmídicos, uma bactéria e um fungo. Em uma modalidade, a bactéria é pelo menos uma selecionada do grupo que consiste em *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* grupo A.

[00342] Quando "uma quantidade imunologicamente eficaz", "uma quantidade eficaz antitumoral", "uma quantidade eficaz inibidora de tumor" ou "quantidade terapêutica" é indicada, a quantidade precisa das composições da presente invenção a ser administrada pode ser determinada por um médico em consideração das diferenças individuais em idade, peso, tamanho de tumor, extensão da infecção ou metástase e condição do paciente (sujeito). Pode geralmente ser afirmado que uma composição farmacêutica compreendendo as células T descritas neste documento pode ser administrada em uma dosagem de 10^4 a 10^9 células/kg peso corporal, em alguns casos 10^5 a 10^6 células/kg peso corporal, incluindo todos os valores inteiros dentro dessas faixas. As composições de célula T também podem ser administradas múltiplas vezes nestas dosagens. As células podem ser administradas usando técnicas de infusão que são comumente

conhecidas em imunoterapia (ver, *por exemplo*, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

[00343] Em certos aspectos, pode ser desejado administrar células T ativadas a um sujeito e, em seguida, redesenhar o sangue (ou realizar uma aférese), ativar as células T a partir das mesmas, de acordo com a presente divulgação e infundir novamente o paciente com essas células T ativadas e expandidas. Este processo pode ser realizado várias vezes a cada poucas semanas. Em certos aspectos, as células T podem ser ativadas a partir de coletas de sangue de 10 cc a 400 cc. Em certos aspectos, as células T são ativadas a partir de extrações de sangue de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc ou 100 cc.

[00344] A administração das composições em questão pode ser realizada de qualquer maneira conveniente, incluindo por inalação de aerossol, injeção, ingestão, transfusão, implante ou transplante. As composições descritas neste documento podem ser administradas a um paciente por via transarterial, subcutânea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, por injeção intravenosa (i.v.) ou por via intraperitoneal. Em um aspecto, as composições de células T da presente divulgação são administradas a um paciente por injeção intradérmica ou subcutânea. Em um aspecto, as composições de células T da presente divulgação são administradas por injeção i.v. As composições de células T podem ser injetadas diretamente em um tumor, linfonóculo ou sítio de infecção.

[00345] Em um aspecto exemplar particular, os sujeitos podem sofrer leucaférese, em que os leucócitos são coletados, enriquecidos ou esgotados *ex vivo* para selecionar e/ou isolar as células de interesse, *por exemplo*, células T. Estes isolados de células T podem ser expandidos por métodos conhecidos na técnica e tratados de modo que um ou mais construtos de TFP da presente divulgação possam ser introduzidos, criando assim uma célula T que expressa TFP da presente divulgação. Os sujeitos que delas necessitam podem subsequentemente ser submetidos a um tratamento padrão com quimioterapia de alta dose seguido de transplante de células tronco de sangue periférico. Em certos aspectos, após ou simultaneamente com o transplante, os sujeitos recebem uma infusão das células T TFP expandidas da presente divulgação. Em um aspecto adicional, as células expandidas são administradas antes ou após a cirurgia.

[00346] A dosagem dos tratamentos acima a ser administrada a um paciente variará com a natureza precisa da condição a ser tratada e o receptor do tratamento. A escala de dosagens para administração humana pode ser realizada de acordo com práticas aceitas na técnica. A dose de alemtuzumab, por exemplo, estará geralmente na faixa de 1 a cerca de 100 mg para um paciente adulto, geralmente administrada diariamente por um período entre 1 e 30 dias. A dose diária preferida é de 1 a 10 mg por dia, embora em alguns casos possam ser usadas doses maiores de até 40 mg por dia (descrito na Patente US 6.120.766).

[00347] Em uma modalidade, o TFP é introduzido em células T, *por exemplo*, usando a transcrição *in vitro*, e o sujeito (*por exemplo*, humano) recebe uma administração inicial de células T TFP da presente divulgação e uma ou mais administrações subsequentes de TFP células da presente divulgação, em que uma ou mais administrações subsequentes são administradas em menos de 15 dias, *por exemplo*, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ou 2 dias após da administração anterior. Em uma modalidade, mais de uma administração das células T TFP da presente divulgação são administradas ao sujeito (*por exemplo*, humano) por semana, *por exemplo*, 2, 3 ou 4 administrações das células TFP da presente divulgação são administradas por semana. Em uma modalidade, o sujeito (*por exemplo*, sujeito humano) recebe mais de uma administração de células T TFP por semana (*por exemplo*, 2, 3 ou 4 administrações por semana) (também referido neste documento como um ciclo), seguido por uma semana de nenhuma administração de células T TFP, e então uma ou mais administrações adicionais de células T TFP (*por exemplo*, mais de uma administração de células T TFP por semana) é administrada ao sujeito. Em outra modalidade, o sujeito (*por exemplo*, sujeito humano) recebe mais de um ciclo de células T TFP e o tempo entre cada ciclo é inferior a 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 ou 3 dias. Em uma modalidade, as células T da TFP são administradas em dias alternados durante 3 administrações por semana. Em uma modalidade, as células T TFP da presente divulgação são administradas por pelo menos duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito ou mais semanas.

[00348] Em um aspecto, as células T TAA TFP são geradas usando vetores virais lentivirais, como lentivírus. As células TFP-T geradas dessa forma terão expressão estável de TFP.

[00349] Em um aspecto, as células T TFP expressam transitoriamente

vetores TFP para 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 dias após a transdução. A expressão transitória de TFPs pode ser efetuada pela entrega do vetor RNA TFP. Em um aspecto, o RNA de TFP é transduzido no interior da célula T por eletroporação.

[00350] Uma questão potencial que pode surgir em pacientes em tratamento com células T TFP de expressão transitória (particularmente com células T TFP portadoras de scFv murino) é a anafilaxia após vários tratamentos.

[00351] Sem ser vinculado por esta teoria, acredita-se que tal resposta anafilática possa ser causada por um paciente que desenvolve uma resposta anti-TFP humoral, ou seja, anticorpos anti-TFP com um isotipo anti-IgE. Pensa-se que as células produtoras de anticorpos de um paciente passam por uma mudança de classe do isotipo IgG (que não causa anafilaxia) para o isotipo IgE quando há uma interrupção de dez a quatorze dias na exposição ao antígeno.

[00352] Se um paciente estiver em alto risco de gerar uma resposta de anticorpo anti-TFP durante o curso da terapia TFP (tal como aquelas geradas por transições de RNA), as quebras de infusão de células T TFP não devem durar mais de dez a catorze dias.

Liberação de citocinas

[00353] A síndrome de liberação de citocinas é uma forma de síndrome da resposta inflamatória sistêmica que surge como complicação de algumas doenças ou infecções e também é um efeito adverso de alguns medicamentos com anticorpos monoclonais, bem como de terapias com células T adotivas. As células T TFP podem exibir melhor atividade de morte do que as células CAR-T. As células T TFP administradas em um sujeito podem exibir melhor atividade de morte do que as células CAR-T administradas em um sujeito. Esta pode ser uma das vantagens das células T TFP em relação às células CAR-T. As células T TFP podem exibir menos células CAR-T de liberação de citocinas. Um sujeito administrado com células T TFP pode exibir menos liberação de citocinas do que um sujeito administrado com células CAR-T. Esta pode ser uma das vantagens das terapias com células T TFP em relação às terapias com células CAR-T. As células T TFP podem exibir atividade de morte semelhante ou melhor do que as células CAR-T e as células T TFP podem exibir menos liberação de citocinas do que as células CAR-T. As células T TFP administradas a um sujeito podem exibir atividade de morte

semelhante ou melhor do que as células CAR-T administradas a um sujeito e o sujeito pode exibir menos liberação de citocina do que células CAR-T administradas a um sujeito. Esta pode ser uma das vantagens das terapias com células T TFP em relação às terapias com células CAR-T.

[00354] Em alguns casos, a liberação de citocinas de um tratamento com células T TFP é menor do que a liberação de citocinas de um tratamento com células CAR-T. Em algumas modalidades, a liberação de citocina de um tratamento com células T TFP é de pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, ou pelo menos 90% menos do que a liberação de citocinas de um tratamento com células CAR-T. Várias citocinas podem ser liberadas menos no tratamento de células T com células T TFP do que células CAR-T. Em algumas modalidades, a citocina é IL-2, IFN- γ , IL-4, TNF- α , IL-6, IL-13, IL-5, IL-10, sCD137, GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β ou uma combinação dos mesmos. Em alguns casos, o tratamento com células T TFP libera menos perforina, granzima A, granzima B ou uma combinação das mesmas do que o tratamento com células CAR-T. Em algumas modalidades, a perforina, granzima A ou granzima B liberada em um tratamento com células T da TFP é pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50% ou pelo menos 60% menos do que um tratamento com células CAR-T.

[00355] Em algumas modalidades, para uma determinada citocina, pelo menos 10% menos da quantidade da determinada citocina é liberada após o tratamento em comparação com uma quantidade da determinada citocina de um mamífero tratado com uma célula CAR-T, que compreende o mesmo domínio de anticorpo humano ou humanizado. Em algumas modalidades, a determinada citocina compreende uma ou mais citocinas selecionadas do grupo consistindo em IL-2, IFN- γ , IL-4, TNF- α , IL-6, IL-13, IL-5, IL-10, sCD137, GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β e qualquer combinação das mesmas.

[00356] As células T TFP podem exibir atividade semelhante ou melhorada na morte de células tumorais do que nas células CAR-T. Em algumas modalidades, o crescimento de um tumor no mamífero é inibido, de modo que um tamanho do tumor seja no máximo 10%, no máximo 20%, no máximo 30%, no máximo 40%, no máximo 50% ou no máximo 60% de um tamanho de um tumor em um mamífero

tratado com células T que não expressam a TFP, após pelo menos 8 dias de tratamento, em que o mamífero tratado com células T que expressam TFP e o mamífero tratado com células T que não expressam a TFP têm o mesmo tamanho do tumor antes do tratamento. Em algumas modalidades, o crescimento do tumor no mamífero é completamente inibido. Em algumas modalidades, o crescimento tumoral no mamífero é completamente inibido por pelo menos 20 dias, pelo menos 30 dias, pelo menos 40 dias, pelo menos 50 dias, pelo menos 60 dias, pelo menos 70 dias, pelo menos 80 dias, pelo menos 90 dias, pelo menos 100 dias ou mais. Em algumas modalidades, a população de células T transduzidas com TFP mata uma quantidade semelhante de células tumorais em comparação com as células CAR-T, compreendendo o mesmo domínio de anticorpo humano ou humanizado.

[00357] As células T TFP podem exibir perfis de expressão gênica diferente das células que não expressam TFP. Em alguns casos, as células T TFP podem apresentar perfis de expressão gênica semelhantes aos das células CAR-T. Em alguns outros casos, as células T TFP podem exibir perfis de expressão gênica diferentes das células CAR-T. Em algumas modalidades, a população de células T transduzidas com TFP tem um perfil de expressão de gene diferente das células CAR-T, compreendendo o mesmo domínio de anticorpo humano ou humanizado. Em algumas modalidades, um nível de expressão gênico é diferente nas células T transduzidas com o TFP do que um nível de expressão do gene nas células CAR-T compreendendo o mesmo domínio de anticorpo humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o gene tem uma função na apresentação do antígeno, sinalização de TCR, homeostase, metabolismo, sinalização de quimiocina, sinalização de citocina, sinalização do receptor tipo toll, sinalização de MMP e sinalização de molécula de adesão ou sinalização relacionada ao TNFR.

EXEMPLOS

[00358] A presente divulgação é adicionalmente descrita em detalhes por referência aos seguintes exemplos experimentais. Esses exemplos são fornecidos para fins de ilustração apenas, e não se destinam a serem limitantes, salvo indicação em contrário. Assim, a presente divulgação não deve de forma alguma ser interpretada como estando limitada aos seguintes exemplos, mas, em vez disso, deve ser interpretada de forma a abranger quaisquer e todas as variações que se tornam evidentes, como resultado dos ensinamentos fornecidos neste

documento. Sem mais descrição, crê-se que alguém de conhecimento comum a técnica pode utilizar a descrição precedente e os exemplos ilustrativos seguintes, produzir e utilizar os compostos da presente invenção e praticar os métodos reivindicados. Os seguintes exemplos de trabalho apontam especificamente vários aspectos da presente divulgação e não devem ser interpretados como limitando de qualquer forma o restante da divulgação.

Exemplo 1: Construtos de TFP

[00359] Os construtos anti-TAA TFP podem ser manipulados clonando um fragmento de DNA de domínio anti-TAA V_{HH} (ou domínio SD) ligado a um fragmento de DNA CD3 ou TCR por uma sequência de DNA que codifica um ligante peptídico curto (SL): AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO: 2) ou um ligante peptídico longo (LL): AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:3) no vetor p510 ((System Biosciences (SBI)) nos sítios XbaI e EcoR1. Outros vetores também podem ser usados, por exemplo, o vetor pLRPO.

[00360] Exemplos dos construtos anti-TAA TFP gerados incluem p510_anti-TAA_LL_TCR α (anti-TAA V_{HH} - ligante peptídico longo - cadeia α do receptor de células T humanas de comprimento total), p510_TAA_LL_TCR α C (anti-TAA V_{HH} - ligante peptídico longo - cadeia do domínio constante do receptor de células T humanas), p510_anti-TAA_LL_TCR β (anti-TAA V_{HH} - ligante peptídico longo - cadeia β do receptor de célula T de comprimento total humano), p510_anti-TAA_LL_TCR β C (anti-TAA V_{HH} - ligante peptídico longo - cadeia de domínio constante β do receptor de célula T humana), p510_anti-TAA_LL_CD3 γ (anti-TAA V_{HH} - ligante peptídico longo - cadeia CD3 γ humana), p510_anti-TAA_LL_CD3 δ (anti-TAA V_{HH} - ligante peptídico longo - cadeia CD3 δ humana), p510_anti-TAA_LL_CD3 ϵ (anti-TAA V_{HH} - ligante peptídico longo - cadeia CD3 ϵ humano), p510_anti-TAA_SL_TCR β (anti-TAA V_{HH} - ligante peptídico curto - cadeia β do receptor de células T humanas de comprimento total), p510_anti-TAA_SL_CD3 γ (anti-TAA V_{HH} - ligante peptídico curto - cadeia CD3 γ humana), p510_anti-TAA_SL_CD3 δ (anti-TAA V_{HH} - ligante peptídico curto - cadeia CD3 δ humana), p510_anti-TAA_SL_CD3 ϵ (anti-TAA V_{HH} - ligante peptídico curto - cadeia CD3 ϵ humana).

[00361] O anti-MUC16 usado neste documento pode ser um scFv específico de MUC16 humano, por exemplo, 4H11.

[00362] Exemplo do construto anti-MUC16, anti-IL13Ra2 ou anti-MSLN A

CAR correspondente, p510_ anti-TAA_28ζ pode ser gerado por clonagem de DNA sintetizado que codifica o anti-TAA, domínio extracelular parcial de CD28, domínio transmembrana CD28, domínio intracelular de CD28 e CD3 zeta no interior do vetor p510 nos sítios XbaI e EcoR1.

[00363] Vários outros vetores podem ser usados para gerar construtos de proteína de fusão.

Exemplo 2: Sequências de Anticorpos

Geração de Sequências de Anticorpos

Geração de scFvs

[00364] anti-TAA IgGs humanos ou humanizados podem ser usados para gerar sequências scFv para construtos de TFP. Sequências de DNA que codificam para domínios V_L e V_H humanos ou humanizados podem ser obtidas, e os códons para os construtos podem ser, opcionalmente, otimizados para expressão em células de Homo sapiens. A ordem que os domínios V_L e V_H aparecem no scFv é variada (ou seja, V_L-V_H ou orientação V_H-V_L), e três cópias da subunidade “G4S” ou “G4S” (G4S)₃ conectam os domínios variáveis para criar o domínio scFv. Os construtos de plasmídeos anti-TAA scFv podem ter Flag, His ou outras tags de afinidade opcionais, e são eletroporados no interior de HEK293 ou outras linhagens celulares humana ou de mamífero adequadas e purificadas. Os ensaios de validação incluem análise de ligação por FACS, análise cinética usando Proteon e coloração de células que expressam MUC16-, IL13Rα2- ou MSLN.

[00365] Exemplos de domínios de ligação anti-MUC16, anti-IL13Rα2 ou anti-MSLN, incluindo domínio V_L, domínio V_H e CDRs, que podem ser usados com as composições e métodos descritos neste documento podem estar em algumas publicações e/ou fontes comerciais. Por exemplo, certos anticorpos anti-MUC16, incluindo 3A5 e 11D10, foram divulgados em WO 2007/001851, cujos conteúdos são incorporados por referência. O anticorpo monoclonal 3A5 liga múltiplos sítios do polipeptídeo MUC16 com afinidade 433 pM por análise de OVCAR-3 Scatchard. Exemplos de domínios V_L e V_H, CDRs e as sequências de nucleotídeos que os codificam, respectivamente, podem ser aqueles dos seguintes anticorpos monoclonais: GTX10029, GTX21107, MA5-124525, MA5-11579, 25450002, ABIN1584127, ABIN93655, 112889, 120204, LS-C356195, LS-B6756, TA801241, TA801279, V3494, V3648, 666902, 666904, HPA065600, AMAb91056.

[00366] A sequência canônica de polipeptídeo IL13R α 2 humana é o número de acesso UniProt Q14627. São fornecidos polipeptídeos de anticorpo que são capazes de se ligar especificamente ao polipeptídeo MUC16, IL13R α 2 ou MSLN humano e fragmentos ou domínios dos mesmos. Os anticorpos anti-TAA podem ser gerados usando diversas tecnologias (ver, *por exemplo*, Nicholson et al, 1997). Onde os anticorpos anti-TAA murinos são utilizados como uma matéria prima, a humanização de anticorpos anti-TAA murinos é desejada para a configuração clínica, em que os resíduos específicos de camundongo podem induzir uma resposta a antígeno anti-camundongo humano (HAMA) em sujeitos que recebem tratamento com proteína de fusão (TFP) de receptor de células T (TCR), ou seja, tratamento com células T transduzidas com o construto TFP.TAA. A humanização é alcançada enxertando regiões CDR do anticorpo anti-TAA murino em frameworks aceitadores de linha germinativa humana adequados, opcionalmente incluindo outras modificações nas regiões CDR e/ou framework. Conforme fornecido neste documento, a numeração de anticorpo e de resíduo de fragmento de anticorpo segue Kabat (Kabat E. A. et al, 1991; Chothia et al, 1987).

Ligantes de domínio único

[00367] Camelídeo e outros anticorpos de domínio único também podem ser usados para gerar anti-MUC16, IL13R α 2, MSLN ou outros construtos de TFP de antígeno antitumoral. O domínio V_{HH} pode ser usado para ser fundido com várias subunidades de TCR. Em algumas modalidades, ligantes de domínio único (por exemplo, V_{HH}) são usados, tais como aqueles estabelecidos na Tabela 4 (ver, por exemplo, exemplos não limitativos de SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:97 ou SEQ ID NO:98). A preparação de anticorpos de domínio único anti-TAA é adicionalmente descrita nos Exemplos 3 e 5.

Fonte das Subunidades de TCR

[00368] Todas as subunidades do complexo receptor de células T humanas (TCR) contêm um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular. Um complexo de TCR humano contém o polipeptídeo CD3-épsilon, o polipeptídeo CD3-gama, o polipeptídeo CD3-delta, o polipeptídeo CD3-zeta, o

polipeptídeo da cadeia alfa de TCR e o polipeptídeo da cadeia beta de TCR. A sequência canônica do polipeptídeo CD3-epsilon humano é o nº de Acesso Uniprot P07766. A sequência canônica do polipeptídeo CD3-gama humano é o nº de Acesso Uniprot P09693. A sequência canônica do polipeptídeo CD3-delta humano é o nº de Acesso Uniprot P043234. A sequência canônica de polipeptídeo CD3-zeta humano é o nº de Acesso Uniprot P20963. A sequência canônica da cadeia alfa do TCR humano é o nº de Acesso Uniprot Q6ISU1. A sequência canônica da região C da cadeia beta do TCR humano é o nº de Acesso Uniprot P01850, uma sequência da região V da cadeia beta do TCR humano é P04435.

[00369] A sequência canônica do polipeptídeo CD3-epsilon humano é: MQSGTHWRV LGLCLLSVGVWGQD GNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYP GSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPED ANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGLLLLLVYYWSKNRKAKAKPVT RGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPYRKGQRDLYSGLNQRRRI (SEQ ID NO:4).

[00370] A sequência canônica do polipeptídeo CD3-gama humano é: MEQGGKGLAVLILAILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITW FKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCI ELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVQRASDKQTLLPNDQLYQPLK DREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO: 5).

[00371] A sequência canônica do polipeptídeo CD3-delta humano é: MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFNCSITWVEGTVGTLLSDITR LDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVI ATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN WARNKS (SEQ ID NO: 6).

[00372] A sequência canônica do polipeptídeo CD3-zeta humano é: MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRS ADAPAYQQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R (SEQ ID NO:7).

[00373] A sequência canônica de cadeia alfa do TCR humano é: MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGGTPFPSLAPPIMLLVDGKQQMVVVCLVLDVAP PGLDSPWFSAGNGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPLVCH

TGPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLRGTPGGALWLGVLRLLLFKLLL
FDLLLTCSCLCDPAGPLPSPATTTLRALGSHRLHPATETGGREATSSPRPQPR
DRRWGDTPPGRKPGSPVWGEESYLSYPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLGAFF
AGDLPPPLQAGAA (SEQ ID NO: 8).

[00374] A sequência canônica da região C da cadeia alfa de TCR humano é:

PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMR
SMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT
NLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:9).

[00375] A sequência canônica de CTL-L17 da região V de cadeia alfa de TCR humano é:

MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQVKQNSPSSVQEGRISILNCDYTNS
MFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKSAKHLSLHIVPSQPGD
SAVYFCAAKGAGTASKLTFGTGTRLQVTL (SEQ ID NO:10).

[00376] A sequência canônica da região C da cadeia beta de TCR humano: EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGKEVHS
GVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSEND
EWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL
VSALVLMAMVKRKDF (SEQ ID NO:11).

[00377] A sequência canônica CTL-L17 da região V da cadeia beta de TCR humano é:

MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNPRHNITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYW
YRQTLGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGFSSTLEIQRTEQGDSA
MYLCASSLAGLNQPQHFGDGTRLSIL (SEQ ID NO:12).

[00378] A sequência canônica YT35 da região V da cadeia beta de TCR humano é:

MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNSLFWY
RQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVY
FCASSFSTCSANYGYTFGSGTRLTVV (SEQ ID NO:13).

Geração de TFPs de Domínios TCR e scFvs

[00379] Os scFvs MUC16, IL13R α 2 ou MSLN podem ser ligados de forma recombinante a CD3-epsilon ou outras subunidades de TCR usando uma sequência de ligante peptídico, como G₄S, (G₄S)₂ (G₄S)₃ ou (G₄S)₄. Vários ligantes

peptídicos e configurações de scFv podem ser utilizados. As cadeias TCR alfa e TCR beta podem ser usadas para geração de TFPs como polipeptídeos de comprimento total ou apenas seus domínios constantes. Qualquer sequência variável de cadeias TCR alfa e TCR beta pode ser permitida para produzir TFPs.

Vetores de Expressão de TFP

[00380] São fornecidos vetores de expressão que incluem: um promotor (potencializador-promotor de citomegalovírus (CMV)), uma sequência de sinal para possibilitar a secreção, um sinal de poliadenilação e um terminador de transcrição (gene de hormônio de crescimento bovino (BGH)), um elemento que permite a replicação episomal e a replicação em procariontes (*por exemplo*, origem de SV40 e ColE1 ou outros conhecidos na técnica) e elementos para permitir a seleção (gene de resistência à ampicilina e marcador de zeocina).

[00381] O construto de ácido nucleico que codifica TFP pode ser clonado em um vetor de expressão lentiviral e a expressão validada com base na quantidade e qualidade da resposta de células T efectoras de células T transduzidas por TFP.TAA (“TAA.TFP” ou “células T TAA.TFP” ou “TFP.TAA” ou “células T TFP.TAA”) em resposta a células alvo TAA+, em que 'TAA' é, por exemplo, MUC16, IL13Ra2 ou MSLN. As respostas das células T efectoras incluem, mas não estão limitadas a, expansão celular, proliferação, duplicação, produção de citocinas e lise de células alvo ou atividade citolítica (ou seja, desgranulação).

[00382] Os vetores de transferência lentiviral anti-TAA TFP podem ser usados para produzir o material genômico empacotado nas partículas lentivirais pseudotipadas VSV-G. O DNA do vetor de transferência lentiviral é misturado com os três componentes de empacotamento de VSV-G, gag/pol e rev em combinação com o reagente Lipofectamine® para transfectá-los juntos em células HEK-293 (rim embrionário, ATCC® CRL-1573™). Após 24 e 48 horas, a mídia é coletada, filtrada e concentrada por ultracentrifugação. A preparação viral resultante é armazenada a -80°C. O número de unidades de transdução pode ser determinado por titulação em células Sup-T1 (linfoma linfoblástico de células T, ATCC® CRL-1942™). As células T TFP redirecionadas são produzidas pela ativação de células T naïve frescas com, por exemplo, esferas anti-CD3 anti-CD28 durante 24 horas e, em seguida, adicionar o número apropriado de unidades de transdução para obter a porcentagem desejada de células T transduzidas. Essas células T modificadas

podem se expandir até que fiquem em repouso e diminuem de tamanho, momento no qual são criopreservadas para análise posterior. Os números e tamanhos de células são medidos usando um Coulter Multisizer™ III. Antes da criopreservação, a porcentagem de células transduzidas (expressando o TFP na superfície celular) e a intensidade de fluorescência relativa dessa expressão serão determinadas por análise de citometria de fluxo. A partir dos gráficos de histograma, os níveis de expressão relativa dos TFPs podem ser examinados comparando a porcentagem transduzida com sua intensidade fluorescente relativa.

[00383] Em algumas modalidades, várias TFPs são introduzidas por transdução de células T com múltiplos vetores virais.

Avaliação da atividade citolítica, capacidades de proliferação e secreção de citocinas de células T redirecionadas por TFP humanizado

[00384] As habilidades funcionais das células T TFP para produzir TFPs expressos na superfície celular e para matar células tumorais alvo, proliferar e segregar citocinas podem ser determinadas usando ensaios conhecidos na técnica.

[00385] Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs, *por exemplo*, sangue de um doador com aférese normal cujas células T naïve serão obtidas por seleção negativa para células T, linfócitos CD4+ e CD8+) serão tratadas com interleucina-2 humana (IL-2) e, em seguida, ativadas com esferas anti-CD3x anti-CD28, *por exemplo*, em 10% RPMI a 37°C, CO₂ a 5% antes da transdução com os vetores lentivirais que codificam TFP. Os ensaios de citometria de fluxo serão usados para confirmar a presença na superfície celular de um TFP, como por um anticorpo anti-FLAG ou um anticorpo de domínio variável anti-murino. A produção de citocinas (*por exemplo*, IFN- γ) será medida usando ELISA ou outros ensaios.

Exemplo 3: Produção de nanocorpos anti-IL13R α 2

Construção de biblioteca

Imunização

[00386] Uma lama foi injetada por via subcutânea nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35, cada vez com cerca de 150 μ g de IL13R α 2 humano recombinante fundido a um domínio Fc de IgG1 humano (hIL13R α 2-Fc) (R&D Systems). O adjuvante utilizado foi o adjuvante P GERBU (GERBU Biotechnik GmbH). No dia 40, cerca de 100 ml de sangue anticoagulado foram coletados da lama para preparação de linfócitos.

Construção de uma biblioteca V_{HH}

[00387] Uma biblioteca V_{HH} foi construída a partir dos linfócitos de lama para triar a presença de nanocorpos específicos para o antígeno. Para este fim, o RNA total de linfócitos de sangue periférico foi usado como molde para a síntese da primeira fita de cDNA com um primer oligo(dT). Usando este cDNA, as sequências de codificação de V_{HH} foram amplificadas por PCR, digeridas com PstI e NotI e clonadas no interior dos sítios PstI e NotI do vetor fagemídeo pMECS. A biblioteca V_{HH} assim obtida foi chamada de Core 94. A biblioteca consiste em cerca de 7×10^8 transformantes independentes, com 100% dos transformantes abrigando o vetor com o tamanho de inserção correto.

Isolamento de nanocorpos específicos de IL13R α 2 humano

[00388] A biblioteca Core 94 foi pesquisada por 3 rodadas em fase sólida revestida (100 μ g/ml em 100 mM NaHCO₃ pH 8,2) antígeno hIL13R α 2: antígeno hIL13R α 2-Fc submetido à remoção de Fc pelo Fator Xa. A ligação de fagos a qualquer Fc de IgG1 humano remanescente no antígeno revestido no poço e qualquer Fc de IgG1 humano recombinaante competiu com Fc de IgG1 humana recombinaante (R&D Systems, Cat. No. 110-HG) e Fator Xa, cada um em uma concentração final de 1 μ M. O enriquecimento para fagos específicos do antígeno foi avaliado após cada rodada de seleção comparando o número de partículas de fagemídeo eluídas de poços revestidos com antígeno com o número de partículas de fagemídeo eluídas de poços de controle negativo (bloqueado não revestido). Estas experiências sugeriram que a população de fagos foi enriquecida para fagos específicos do antígeno cerca de 7 vezes, 200 vezes e 1000 vezes após a 1^a, 2^a e 3^a rodadas, respectivamente. No total, 190 colônias (95 da rodada 2 e 95 da rodada 3) foram selecionadas aleatoriamente e analisadas por ELISA quanto à presença de nanocorpos específicos do antígeno em seus extratos periplasmáticos (ELISA usando extratos periplasmáticos brutos, incluindo nanocorpos solúveis). O antígeno usado para a triagem de ELISA foi o mesmo usado para a seleção, usando poços bloqueados não revestidos e poços revestidos com uma mistura de Fc de IgG1 humano recombinaante e Fator Xa como controles negativos. O anticorpo secundário (anticorpo anti-camundongo) deu um leve sinal de fundo nos poços revestidos com Fc/Xa de IgG1 humana recombinaante (cerca de 0,3 OD a 405 nm) que marca 5 clones como reativos cruzados com Fc. Destas 190 colônias, 141

colônias tiveram pontuação positiva para hIL13R α 2, mas não para a mistura de hIgG1 Fc/fator Xa neste ensaio. Com base nos dados de sequência das 141 colônias positivas em hIL13R α 2, mas não na mistura de hIgG1 Fc/fator Xa, 54 nanocorpos de comprimento total diferentes foram distinguidos, pertencentes a 16 grupos CDR3 diferentes (linhagens de células B). Os nanocorpos pertencentes ao mesmo grupo CDR3 (mesma linhagem de células B) são muito semelhantes e suas sequências de aminoácidos sugerem que eles são de células B relacionadas clonalmente resultantes de hipermutação somática ou da mesma célula B, mas diversificadas devido a RT e/ou erro de PCR durante a construção da biblioteca. Os nanocorpos pertencentes ao mesmo grupo CDR3 reconhecem o mesmo epítipo, mas suas outras características (por exemplo, afinidade, potência, estabilidade, rendimento de expressão, etc.) podem ser diferentes. Também testada, por ELISA, foi a ligação dos nanocorpos específicos de IL13R α 2 humano a IL13R α 1 humano marcado com His (Acro Biosystems, Cat No. IL1-H5224). Estas experiências de ELISA revelaram que nenhum dos nanocorpos específicos de IL13R α 2 se ligam a IL13R α 1 humano. Os clones dessas panorâmicas apresentam o seguinte código em seus nomes: TIG.

Análise de citometria de fluxo de nanocorpos específicos de hIL13R α 2

Nanocorpos e células

[00389] Extratos periplasmáticos foram gerados para cada anti-hIL13R α 2 Nb da mesma maneira que foi feito para a triagem inicial de ELISA descrita acima. As células de cada linha celular (U251_Luc_Mch e A431_Luc) foram descongeladas, lavadas e contadas. O extrato periplasmático de cada clone Nb foi incubado com cerca de 2×10^5 células. Após a lavagem, as células foram incubadas com uma mistura de anticorpo de tag anti-HA de camundongo e PE anti-camundongo. Após outra lavagem, Topro foi adicionado a cada amostra como corante vivo/morto e as células foram analisadas em um citômetro de fluxo. Como um Mab de controle positivo, foi utilizado o clone 47 anti-IL13R α 2 acoplado a PE (+Topro). Como controles negativos, usamos para cada linhagem celular: uma amostra com um Nb irrelevante (BCII10 – específico para β lactamase bacteriana), uma amostra com todos os Mabs de detecção, uma amostra com o Mab PE anti-camundongo secundário sozinho e uma amostra com células sozinho (com e sem Topro).

Humanização de anticorpos

[00390] Dois clones foram escolhidos para humanização. A Figura 1 mostra alinhamentos de sequência do clone 1 e clone 2, compreendendo a sequência parental (não humanizada) para cada uma e dez variantes humanizadas. Cada nanocorpo humanizado foi analisado por Octet a 500 nM em um sensor Ni-NTA, com diluições de três vezes de antígeno (IL13R α 2-Fc) a 125nM, 41,66 nM e 13,86 nM. Um desenho do procedimento experimental é mostrado na Figura 2. Um resumo das medições octadas para cada uma das variantes humanizadas representadas na Figura 1 é mostrado na Tabela 1 (clone 1) e Tabela 2 (clone 2).

Tabela 1: Análise parental e variante humanizada do clone 1

Construto	# de Mutações	% Humana	Citometria de fluxo MFI	Octeto KD nM	Diferença de dobra KD
parental	0	84,62	2265,3	0,63	1
1-h1	5	90,11	Não Testado	0,42	0,67
1-h2	6	91,21	Não Testado	1,01	1,6
1-h3	7	92,31	1988,9	1,76	2,8
1-h4	8	93,41	1570,7	1,77	2,8
1-h5	9	94,51	1729,3	1,94	3,1
1-h6	10	96,70	1503,6	1,44	2,3
1-h7	11	96,70	1227,9	1,50	2,4
1-h8	12	97,80	1240,2	1,94	3,1
1-h9	13	98,90	842,1	1,91	3,0
1-h10	14	100	639,2	1,46	2,3
<i>2o Ab</i>			90,4		
<i>Controle de Isotipo</i>			21,4		

Tabela 2: Análise parental e variante humanizada do clone 1

Construto	# de Mutações	% Humana	Citometria de Fluxo	Octeto KD nM	Diferença de dobra KD
------------------	----------------------	-----------------	----------------------------	---------------------	------------------------------

			MFI		
2- parental	0	81,32	3647,4	0,81	1
2-h1	8	90,11	Não Testado	0,93	1,1
2-h2	9	91,21	Não Testado	3,30	4,1
2-h3	10	92,31	3065,3	0,91	1,1
2-h4	11	93,41	3058,4	0,96	1,2
2-h5	12	94,51	1453,2	0,87	1,1
2-h6	13	95,60	2868,7	1,13	1,4
2-h7	14	96,70	1903,5	0,95	1,2
2-h8	15	97,80	2024,2	0,95	1,2
2-h9	16	98,90	1637,3	0,87	1,1
2-h10	17	100	1122,3	3,31	4,1

[00391] Duas sequências humanizadas para cada clone foram escolhidas para estudo adicional e correspondem a SEQ ID NOS: 19-28 e 35-43, respectivamente.

Exemplo 4: Atividade *in vitro* de nanocorpos anti-IL13R α 2

[00392] Os sdAbs humanizados descritos no Exemplo 3 foram expressos em um backbone pLRPO e incorporados em um CD3 ϵ TFP. A atividade das células T IL13R α 2-TFP correspondentes foi testada em uma linhagem celular que expressa IL-13 (U87) e uma linhagem celular negativa para IL13R α 2 (A431). As células T TFP do clone 1 e do clone 2 induziram a lise de células tumorais nas células U87, mas não nas células A431 (Figura 3A).

[00393] As mesmas células T TFP foram testadas quanto à sua capacidade de induzir a produção de IFN γ e IL-2. Conforme mostrado na Figura 3B, as células T TFP não induziram IFN γ ou IL-2 a partir de células negativas para IL13R α 2 (A431), mas as células T do clone 1 e clone 2 TFP desencadearam uma resposta de IFN γ maior do que 3000 pg/ml e baixa produção de IL-2 de cerca de 100 pg/ml. Resultados semelhantes foram observados quando repetidos em células de glioblastoma U251.

Exemplo 5: Geração e identificação de nanocorpos específicos para o

peptídeo **MUC16** **humano:**
NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGN
SDLP

Materiais e Métodos

Transformação, reclonagem e expressão de V_{HHS}

Transformação de cepa não supressora (por exemplo, WK6) com pMECS

GG recombinante

[00394] O gene nanocorpo clonado no vetor pMECS GG contém a sequência de sinal PelB no N-terminal e tag HA e tag His₆ no C-terminal (nanocorpo líder PelB-HA-His₆). A sequência líder PelB direciona o nanocorpo para o espaço periplasmático de *E. coli* e as tags HA e His₆ podem ser usadas para a purificação e detecção de nanocorpo (por exemplo, em ELISA, Western Blot, etc.).

[00395] No vetor pMECS GG, a tag His₆ é seguido por um códon de terminação âmbar (TAG) e este códon de terminação âmbar é seguido pelo gene III do fago M13. Em cepas supressoras de *E. coli* (por exemplo, TG1), o códon de terminação âmbar é lido como glutamina e, portanto, o nanocorpo é expresso como proteína de fusão com a proteína III do fago que permite a exibição de nanocorpo no revestimento do fago para panorâmica. Em cepas não supressoras de *E. coli* (por exemplo, WK6), o códon de terminação âmbar é lido como códon de terminação e, portanto, o nanocorpo resultante não é fundido à proteína III.

[00396] A fim de expressar e purificar nanocorpos clonados no vetor pMECS GG, basta preparar pMECS GG contendo o gene do nanocorpo de interesse e transformar uma cepa não supressora (por exemplo, WK6) com este plasmídeo. Sequenciar o nanocorpo do clone resultante usando o primer MP057 (5'-TTATGCTTCCGGCTCGTATG-3') para verificar a identidade do clone. Testar novamente a capacidade de ligação ao antígeno por ELISA ou qualquer outro ensaio apropriado. Agora, a cepa não supressora (por exemplo, WK6) contendo o vetor pMECS GG recombinante com o gene do nanocorpo pode ser usada para a expressão e purificação do nanocorpo.

Reclonar os genes de nanocorpo do vetor pMECS GG para o vetor pHEN6c

Sequências de primer:

[00397] - Primer A6E (5' GAT GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGR GGA GG 3').

[00398] - Primer PMCF (5' CTA GTG CGG CCG CTG AGG AGA CGG TGA CCT GGG T 3').

[00399] - Primer reverso universal (5' TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C 3').

[00400] - Primer forward universal (5 CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3').

[00401] O gene do nanocorpo é amplificado por PCR usando *E. coli* contendo pMECS GG recombinante abrigando o gene do nanocorpo como molde e primers A6E e PMCF (cerca de 30 ciclos de PCR, cada ciclo consistindo em 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 45 segundos a 72 °C, seguidos pela extensão de 10 minutos a 72 °C no final da PCR). Um fragmento de cerca de 400 bp é amplificado. O produto de PCR é então purificado (por exemplo, pelo QiaQuick PCR purification kit da Qiagen) e digerido durante a noite com PstI.

[00402] O produto de PCR é purificado e digerido com BstEII durante a noite (ou com Eco91I da Fermentas). O produto de PCR é purificado como acima e o vetor pHEN6c é digerido com PstI por 3 horas; o vetor digerido é purificado como acima e então digerido com BstEII por 2 a 3 horas. O vetor digerido é executado em um gel de agarose a 1%, a banda do vetor cortada do gel e purificada (por exemplo, pelo QiaQuick gel extraction kit da Qiagen). O produto de PCR e o vetor são ligados. As células WK6 eletrocompetentes são transformadas com a reação de ligação. Os transformantes são selecionados usando placas de LB/ágar/ampicilina (100 µg/ml)/glicose (1-2%).

Expressão e purificação de nanocorpos:

[00403] Uma colônia WK6 recentemente transformada é usada para inocular 10-20 ml de LB + ampicilina (100 µg/ml) + glicose (1%) e incubada a 37 °C durante a noite com agitação a 200-250 rpm. 1 ml desta pré-cultura é adicionado a 330 ml de meio TB suplementado com 100 µg/ml de Ampicilina, MgCl₂ 2mM e 0,1% de glicose e cresce a 37 °C com agitação (200-250 rpm) até que um OD₆₀₀ de 0,6-0,9 seja atingido. A expressão de nanocorpos é induzida pela adição de IPTG à concentração final de 1 mM e a cultura é incubada a 28 °C com agitação durante a noite (cerca de 16-18 horas; o OD₆₀₀ após a indução durante a noite deve idealmente estar entre 25 e 30).

A cultura é centrifugada por 8 minutos a 8000 rpm e o sedimento

ressuspenso de 1 litro cultivado em 12 ml de TES e agitado por 1 hora em gelo. Por cada 12 ml de TES usado, 18 ml de TES/4 são adicionados e posteriormente incubados em gelo por uma hora adicional (com agitação) e então centrifugados por 30 min a 8000 rpm a 4 °C. O sobrenadante contém proteínas extraídas do espaço periplasmático.

Purificação por IMAC:

[00404] His-select é equilibrado com PBS: por extrato periplasmático derivado de 1 litro de cultura, 1 ml de resina é adicionado (cerca de 2 ml de solução His-select) a um tubo falcon de 50 ml, PBS é adicionado a um volume final de 50 ml e misturado e depois centrifugado a 2000 rpm por 2 min, e o sobrenadante descartado. A resina é lavada duas vezes com PBS e, em seguida, o extrato periplasmático é adicionado e incubado por 30 minutos a 1 hora em temperatura ambiente com agitação suave (tempos de incubação mais longos podem resultar em ligação não específica).

A amostra é carregada em uma coluna PD-10 com um filtro na parte inferior (GE Healthcare, cat. No. 17-0435-01) e lavada com 50 a 100 ml de PBS (50-100 ml de PBS por 1 ml de resina usada). A eluição é realizada 3 vezes, cada vez com 1 ml de PBS/imidazol 0,5 M por 1 ml de resina usada, e dialisada durante a noite a 4 °C contra PBS (corte de 3500 daltons) para remover o imidazol.

[00405] A quantidade de proteína pode ser estimada neste ponto por medição de OD₂₈₀ da amostra eluída. O coeficiente de extinção de cada clone pode ser determinado pela ferramenta protParam sob a análise da estrutura primária no servidor de proteômica Expasy. A purificação adicional de nanocorpos pode ser alcançada por diferentes métodos. Por exemplo, a amostra pode ser concentrada (corte de Vivaspin 5000 MW, Vivascience) por centrifugação a 2000 rpm a 4 °C até que um volume apropriado para carregamento em um Superdex 75 16/60 seja obtido (máx. 4 ml). A amostra concentrada é então carregada em uma coluna Superdex 75 16/60 equilibrada com PBS. As frações de pico são agrupadas e a amostra é medida em OD₂₈₀ para quantificação. As alíquotas são armazenadas a -20 °C a uma concentração de cerca de 1 mg/ml.

Imunização

[00406] A lhama foi injetada subcutaneamente nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35, com peptídeo MUC16 humano (hMUC16) conjugado com KLH

(NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGN SDLP-C-KLH) e/ou peptídeo MUC16 humano biotilado na no C-terminal (NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGN SDLP-C-Biotina) e/ou peptídeo MUC16 humano biotilado no N-terminal (Biotina-NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGN SDLP). Os peptídeos biotilados foram misturados com avidina neutra antes das injeções. O adjuvante usado foi o adjuvante GERBU P (GERBU Biotechnik GmbH. No dia 40, cerca de 100 ml de sangue anticoagulado foram coletados da lhama para preparação de linfócitos.

Construção de uma biblioteca VHH

[00407] Uma biblioteca VHH foi construída a partir dos linfócitos de lhama para rastrear a presença de nanocorpos específicos ao antígeno. Para este fim, o RNA total de linfócitos de sangue periférico foi usado como molde para a síntese da primeira fita de cDNA com um primer oligo(dT). Usando este cDNA, as sequências de codificação de VHH foram amplificadas por PCR, digeridas com SAPI e clonadas nos sítios SAPI do vetor fagemídeo pMECS-GG. A biblioteca VHH assim obtida foi denominada Core 93GG. A biblioteca consistia em cerca de 10^8 transformantes independentes, com cerca de 87% dos transformantes abrigando o vetor com o tamanho de inserção correto.

Isolamento de Nanocorpos Específicos do Peptídeo MUC16 Humano

[00408] A biblioteca Core 93GG foi filtrada no peptídeo hMUC16 NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGN SDLP biotilado no C- ou N-terminal (bio-hMUC16) por 4 rodadas. Foi permitido ao peptídeo bio-hMUC16 interagir com placas revestidas com estreptavidina após o que os fagos da biblioteca foram adicionados à placa. O enriquecimento para fagos específicos ao antígeno foi avaliado após cada rodada de panorâmica comparando o número de partículas de fagemídeo eluídas de poços revestidos com antígeno com o número de partículas de fagemídeo eluídas de poços de controle negativo (revestidos com estreptavidina e bloqueados, mas não contendo peptídeo). Estas experiências sugeriram que a população de fagos foi enriquecida para fagos específicos ao antígeno cerca de 2 vezes após a 2ª rodada. Nenhum enriquecimento foi observado após a 1ª, 3ª e 4ª rodadas. No total, 380 colônias (190 da rodada 3, 190 da rodada 4) foram selecionadas aleatoriamente e

analisadas por ELISA quanto à presença de nanocorpos específicos ao antígeno em seus extratos periplasmáticos (ELISA usando extratos periplasmáticos brutos, incluindo nanocorpos solúveis). Os peptídeos usados para triagem ELISA foram os mesmos usados para a panorâmica, usando poços revestidos com estreptavidina bloqueada sem peptídeo como controle negativo. Destas 380 colônias, 34 colônias tiveram resultados positivos neste ensaio. Com base nos dados de sequência das colônias positivas, 6 nanocorpos de comprimento total diferentes foram distinguidos, pertencentes a 2 grupos CDR3 diferentes (linhagens de células B) (consulte o arquivo Excel). Os nanocorpos pertencentes ao mesmo grupo CDR3 (mesma linhagem de células B) são muito semelhantes e suas sequências de aminoácidos sugerem que eles são de células B relacionadas clonalmente resultantes de hipermutação somática ou da mesma célula B, mas diversificadas devido a RT e/ou erro de PCR durante a construção da biblioteca. Os nanocorpos pertencentes ao mesmo grupo CDR3 reconhecem o mesmo epítopo, mas suas outras características (por exemplo, afinidade, potência, estabilidade, rendimento de expressão, etc.) podem ser diferentes. Os clones dessas panorâmicas apresentam o seguinte código em seus nomes: MU.

Análise de citometria de fluxo de nanocorpos específicos de peptídeo hMUC16

Nanocorpos e células

[00409] Os extratos periplasmáticos foram gerados para cada anti-hMUC16-peptídeo Nb da mesma maneira que foi feito para a triagem ELISA inicial descrita acima. As células de cada linhagem celular (SKOV3 Muc16 Luc, OVCAR 3 Muc16 Luc, Expi-293 e Jurkat) foram descongeladas, lavadas e contadas. O extrato periplasmático de cada clone Nb foi incubado com cerca de 2×10^5 células. Após a lavagem, as células foram incubadas com uma mistura de anticorpo de tag anti-HA de camundongo e PE anti-camundongo. Após outra lavagem, Topro foi adicionado a cada amostra como corante vivo/morto e as células foram analisadas em um citômetro de fluxo. Como um Mab de controle positivo, anti-Muc16-4h11 humano (+ IgG-PE anti-humano + Topro), foi usado nas células SKOV3 Muc16 Luc e OVCAR 3 Muc16 Luc. Como controles negativos, usamos para cada linhagem celular: uma amostra com um Nb irrelevante (BCII10 – específico para β lactamase bacteriana), uma amostra com todos os Mabs de detecção, uma amostra com o

Mab PE anti-camundongo secundário sozinho e uma amostra com células sozinho (com e sem Topro).

Exemplo 6: Triagem de sdAbs anti-MUC16 para o alvo hMUC16

[00410] Os ligantes V_{HH} produzidos no Exemplo 5 são selecionados usando um biossensor NTA (coluna de níquel, consulte a Figura 5A para um desenho que descreve o método). Os sdAbs MUC16 marcados com His (3,25 µg/ml) são ligados à coluna e, em seguida, o peptídeo MUC16 é passado através da coluna em concentrações de 200, 100, 50, 25, 6,25, 1,56 e 0 nM. Tampão: 1X Corning® Cellgro® PBS pH 7,4 (cat. 21-040-CM) contendo 0,02% de Tween® 20 a 30 °C. Sensores: Pall Forte Bio Dip & Read (cat. 18-5102).

[00411] A ligação de saturação de dois clones, lhama R3Mu4 (Figura 1C) e R3Mu29 (Figura 1D) e sdAbs humanizados ao alvo MUC16 demonstra que as variantes parentais e humanizadas de sdAb α Muc16 exibem ligação de alta afinidade ao peptídeo ectodomínio MUC16 ("MUC16^{ecto}"), associado aos valores de K_D variando de 6-94 nM. Há alguma perda de afinidade demonstrada por variantes humanizadas em comparação com seus respectivos clones de lhama parentais. Um resumo é fornecido na Tabela 3.

Tabela 3. Determinação de K_D a partir do modelo de ajuste global 1:1 de ligação de titulação

α Mu16 sdAb*	K_D (nM)
R3Mu4 parental	10,2 ± 1,7
R3Mu4 h11#2	10,9 ± 1,6
R3Mu4 h12#2	94,6 ± 1,5
R3Mu4 h13#9	36,2 ± 15,4
R3Mu29 parental	6,3 ± 0,1
R3Mu29_h13#11	8,3 ± 0,1
R3Mu29_h14#13	36,4 ± 0,8
R3Mu29_h15#16	22,9 ± 0,4

Exemplo 7: Ligação de Epítopo de Ligantes Anti-MUC16 em comparação com Ligante de Ferramenta 4H11

[00412] Para determinar se o MUC16 R3Mu4 parental e R3Mu29 sdAbs parental têm o mesmo ou diferentes epítomos em comparação com o ligante de ferramenta 4H11 scFv-Fc (do hibridoma 4H11), um ensaio em sanduíche foi usado (Consulte a Figura 6A).

[00413] Conforme mostrado na Figura 6B, o MUC 16 sdAbs - R3Mu4 parental (lhama) e R3Mu29 parental (lhama) mostram ligação após a exposição do ligante de ferramenta 4H11, demonstrando que os sdAbs parentais reconhecem e se ligam a um epítopo diferente do peptídeo MUC16 em comparação com o ligante de ferramenta 4H11 scFv -Fc. O controle negativo sem antígeno (peptídeo MUC16) não mostra ligação, descartando qualquer chance de ligação não específica. Um diagrama que mostra o epítopo de ligação dos anticorpos de lhama parentais R3Mu4 e R3Mu29 é mostrado na Figura 6C.

Exemplo 8: Estudos pré-clínicos com Células T que Expressam MUC16-TFP

[00414] As células T que expressam MUC16-TFPs foram avaliadas em estudos pré-clínicos *in vitro* (Figura 7). As células T que expressam MUC16-TFPs mataram especificamente as células de câncer de ovário SKOV3-MUC16Cterm que foram transduzidas para superexpressar a forma de MUC16 associada a uma célula C-terminal de uma forma dependente da dose, enquanto as células de origem SKOV3 negativas para MUC16 foram poupadas da morte mediada por células T que expressam MUC16-TFPs. Da mesma forma, as células T que expressam MUC16-TFPs eliminaram as células OVCAR3-MUC16-Cterm que superexpressaram a forma associada à célula de MUC16. As células OVCAR3 de origem que expressam níveis baixos de MUC16 foram mortas apenas na proporção mais alta de células TFP-T para células-alvo, o que ressalta a lise dependente da dose de células tumorais. Da mesma forma, as células TFP-T apenas liberaram citocinas quando MUC16 estava presente nas células alvo. A Figura 8 representa dados experimentais de exemplo que mostram a potência de MUC16-TFP em ensaios celulares usando linhagens de células ovarianas que expressam níveis altos e baixos de MUC16. Nestes estudos, observou-se que MUC16-TFP tem habilidades de morte preferenciais, dependendo do nível de MUC16 na superfície

da célula tumoral. Mais precisamente, foi observado que MUC16-TFP mata células tumorais que expressam MUC16 alto de um modo dependente da dose, enquanto a morte de MUC16-TFP de células que expressam MUC16 baixo não foi observada nos níveis de dose usados nesses ensaios.

Exemplo 9. Quantificação do número de cópias MUC16^{ecto} baseada em citometria de fluxo

[00415] A forma de MUC16 associada a células C-terminais (MUC16^{ecto}), o anticorpo específico 4H11 foi produzido de acordo com a Patente US No. 9.169.328 e depois conjugado com PE. O número médio de moléculas de PE por anticorpo foi estimado em cerca de 1. As linhagens celulares de carcinoma de ovário OVCAR3 e SKOV3, ou os derivados com superexpressão estável de MUC16^{ecto} (células OVCAR3-MUC16^{ecto} e SKOV3-MUC16^{ecto}), foram coradas com o 4H11-PE Ab em 2 μ g por amostra. O número de cópias de MUC16^{ecto} da superfície celular foi estimado pelo Quantibrite Beads PE Fluorescence Quantitation kit (BD Bioscience) por instrução do fabricante. As células tumorais coradas com anticorpo 4H11-PE foram executadas em Fortessa® X-20 juntamente com os grânulos Quantibrite. A intensidade fluorescente média geométrica (gMFI) foi calculada para as células, bem como para os grânulos. O estoque de grânulos contém 4 populações fabricadas para ter um número diferente de moléculas de PE por grânulo (alto, moderado, baixo, negativo). Uma curva padrão foi gerada com base nas cópias fornecidas de moléculas de PE por grânulo versus o MFI medido para cada conjunto de grânulos. O número de cópias de MUC16^{ecto} em células tumorais foi então estimado com base na curva padrão gerada por grânulos. As cópias de MUC16^{ecto} nas células OVCAR3, OVCAR3-MUC16^{ecto}, SKOV3 e SKOV3-MUC16^{ecto} foram determinadas como 726, 3616, 39 e 2351, respectivamente (Figura 9B).

Exemplo 10. Lise de células tumorais específicas de MUC16^{ecto} por células T MUC16-TFP

[00416] A lise de células tumorais específicas de MUC16^{ecto} por células T MUC16-TFP foram avaliadas por ensaio de citotoxicidade *in vitro*. As linhagens de células tumorais com ou sem expressão de MUC16^{ecto} foram transduzidas de forma estável para expressar a luciferase do pirilampo como o repórter. Após vinte e quatro horas de co-cultura, a atividade de luciferase das células co-cultivadas foi

determinada, com Sistema de Ensaio de Luciferase Bright-Glo™ (Promega, Cat # E2610), como surgimento de células tumorais vivas residuais. A porcentagem de morte de células tumorais foi então calculada com a seguinte fórmula: % de Lise de Células Tumorais = $100\% \times [1 - \text{RLU (Células tumorais + células T)} / \text{RLU (Células tumorais)}]$.

[00417] As células T que expressam MUC16-TFPs mataram especificamente células SKOV3-MUC16^{ecto} (Figura 10A), enquanto as células SKOV3 parentais foram poupadas de células T que expressam morte mediada por MUC16-TFPs (Figura 10B). Da mesma forma, as células T que expressam MUC16 TFPs eliminaram as células OVCAR3-MUC16^{ecto} que superexpressaram a forma associada a células de MUC16 (Figura 10C). As células OVCAR3 parentais que expressam níveis baixos de MUC16^{ecto} foram apenas parcialmente mortas (Figura 10D).

Exemplo 11. Produção de citocinas específicas de MUC16^{ecto} por células T MUC16-TFP

[00418] A produção de citocinas específicas de MUC16^{ecto} por células T MUC16-TFP foi determinada para o sobrenadante colhido da co-cultura de várias células tumorais, com ou sem expressão de MUC16^{ecto} e células T MUC16-TFP. Os níveis de IFN- γ humano e IL-2 no sobrenadante foram analisados usando a tecnologia MAGPIX Luminex® xMAP (EMD Millipore), com kits 2-plex (Millipore, Catálogo# HCYTOMAG-60K).

[00419] As células T que expressam MUC16-TFPs secretam citocinas pró-inflamatórias de uma maneira específica ao antígeno. As células T que expressam MUC16 TFPs secretaram IFN- γ e IL-2 quando co-cultivadas com células SKOV3-MUC16^{ecto} (Figura 11A e 11E, respectivamente) ou células OVCAR3-MUC16^{ecto} (Figura 11C e 11G, respectivamente), mas não com células SKOV3 (Figura 11B e 11F, respectivamente) ou células OVCAR3 (Figura 11D e 11H, respectivamente).

Exemplo 12. Proliferação específica de MUC16^{ecto} de células T que expressam MUC16-TFP.

[00420] A proliferação específica de MUC16^{ecto} de células T MUC16-TFP foi determinada monitorando a diluição do sinal de rastreamento de células T (diminuição na intensidade do sinal de CellTrace™) por análise de citometria de

fluxo. As células T que expressam MUC16-TFPs foram marcadas com CellTrace™ Far Red Proliferation Kit (Cat. nº C34564 ThermoFisher), depois co-cultivadas com células SKOV3 ou SKOV3-MUC16^{ecto} na proporção de 1 para 1 por 3 dias. As células T que expressam MUC16-TFPs marcadas com o kit CellTrace Far Red Proliferation também foram estimuladas com meio sozinho ou com 1 µg/mL de anticorpo anti-CD3 ligado à placa (clone OKT-3, Cat #14-0037-82, Invitrogen) por 3 dias. As células T que expressam MUC16-TFPs mostraram proliferação específica de MUC16^{ecto}, demonstrada pela diminuição do sinal CellTracer quando co-cultivadas com células SKOV3-MUC16^{ecto}, mas não células SKOV3 (Figura 12).

Exemplo 13. Atividade *in vivo* de células T MUC16-TFP

[00421] As células T que expressam MUC16-TFPs foram avaliadas em modelos de xenoinxerto de camundongo NSG de linhagens de células de carcinoma de ovário humano, células SKOV3-MUC16^{ecto} e células OVCAR3-MUC16^{ecto}. Camundongos NSG fêmeas de seis semanas de idade (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, The Jackson Laboratory, número de estoque 005557) foram inoculados intraperitonealmente com células SKOV3-MUC16^{ecto} (5 x 10⁵ células/camundongo) ou células OVCAR3-MUC16^{ecto} (5 x 10⁶ células/camundongo), ou subcutaneamente com células SKOV3-MUC16^{ecto} (5 x 10⁶ células/camundongo, mistura 1 para 1 com Matrigel®). A carga tumoral foi determinada por imagem de bioluminescência (BLI) para os modelos intraperitoneais com a injeção intraperitoneal de 0,2 ml de substrato de luciferina (VWR) diluído em PBS (150 mg/kg). A carga tumoral do modelo subcutâneo foi medida como o volume do tumor por Compasso. Uma vez que o modelo de tumor foi estabelecido (modelos intraperitoneais: sinal BLI > 10⁸; modelo subcutâneo: volume do tumor > 75 mm³), células T que expressam MUC16-TFPs (MUC16 TFP1 e MUC16 TFP2) ou células T não transduzidas (NT), ou veículo (PBS) foram injetados por via intravenosa na dose de 10⁷ células T por camundongo.

[00422] A eficácia *in vivo* de células T que expressam MUC16 TFPs foi observada em modelos intraperitoneais e subcutâneos de células SKOV3-MUC16^{ecto} e células OVCAR3-MUC16^{ecto}. No modelo intraperitoneal de células SKOV3-MUC16^{ecto}, MUC16 TFP 1 mostrou diminuição significativa da carga tumoral em comparação com o nível da linha de base no dia 0 (dia da injeção de células T) (Figura 13A). De forma consistente, MUC16 TFP1 atrasou

significativamente o crescimento do tumor em modelos subcutâneos de células SKOV3-MUC16^{ecto}, quando comparado com células T NT (Figura 13B). No modelo intraperitoneal de células OVCAR3-MUC16^{ecto}, MUC16 TFP1 e MUC16 TFP2 completaram o tumor eliminado dos camundongos (Figura 13C).

Exemplo 14: Coloração imunohistoquímica de tecidos humanos normais usando proteína de fusão Fc de anticorpo de domínio único anti-MUC16

[00423] O objetivo dos estudos foi obter informações sobre a expressão de MUC16 em tecidos humanos normais.

[00424] Os materiais de controle e as seções FFPE foram coradas com um anticorpo de domínio único anti-MUC16 que foi geneticamente fundido a uma região Fc de camundongo para detecção usando anticorpo secundário Fc anti-camundongo conjugado com HRP. O controle positivo consistia em seções FFPE de tumores ovarianos humanos de duas doadoras. O controle negativo foi uma seção FFPE de um coração humano. O painel de tecidos testados incluiu o seguinte: células sanguíneas, cerebelo ou córtex cerebral, trato gastrointestinal (esôfago, intestino delgado, estômago, cólon - conforme disponível), baço, rim (glomérulo, túbulo), fígado, linfonodo, pele, placenta, testículo e amígdala de cada doador.

[00425] Resultados: Dois tecidos de carcinoma de ovário humano de diferentes doadores foram usados como controle positivo e mostraram coloração em diferentes intensidades, variando de 1-3+ (ocasional a frequente) e 1-4+ (ocasional a frequente) para membranas celulares neoplásicas e citoplasma. Dos tecidos normais, todos mostraram coloração negativa para MUC16, mas dois: 1) epitélio do estômago humano, parietal (citoplasma, grânulos citoplasmáticos) - 1-2+ (ocasional a frequente), e 2) superfície do epitélio da tonsila humana, cripta (membrana, citoplasma e outros elementos) - 1-3+ raro a ocasional.

[00426] Estes dados demonstram que MUC16 tem expressão limitada em tecidos humanos normais e expressão elevada em certos tumores. Isso o torna um alvo atraente para a terapia contra o câncer de malignidades positivas para MUC16. O anticorpo de domínio único específico de MUC16 foi capaz de se ligar e corar tecidos positivos para o antígeno.

Exemplo 15: Estudos Clínicos

[00427] Pacientes com câncer de ovário irressecável com doença recidivante ou refratária serão inscritos para estudos clínicos de células T que expressam MUC16 TFPs. O estudo inicial irá explorar o perfil de segurança das células T que expressam MUC16 TFPs e irá explorar a cinética celular e os resultados farmacodinâmicos. Esses resultados irão informar a seleção das dosagens para estudos posteriores, que então serão administrados a uma coorte maior de pacientes com câncer de ovário irressecável para definir o perfil de eficácia das células T que expressam MUC16 TFPs.

Exemplo 16: Células T TFP Anti-MSLN Matam Preferencialmente as Células Tumorais com Alta Expressão de MSLN.

[00428] A capacidade diferencial de morte de células T MSLN-TFP contra tumores MSLN alto (MSTO-MSLN^{alto}, 11006 cópias de MSLN de superfície) e MSLN baixo (MSTO-MSLN^{baixo}, 198 cópias de MSLN de superfície) foi abordada em camundongos NSG portando MSTO-MSLN^{alto} ou MSTO-MSLN^{baixo}.

[00429] As células MSTO-MSLN^{alto} e MSTO-MSLN^{baixo} foram ressuspensas em PBS estéril (pH 7,4) a uma concentração de 1×10^6 células/100 μ L. A suspensão de células PBS foi então misturada 1:1 com Matrigel® gelado para um volume final de injeção de 200 μ L por camundongo. Para todos os animais, 200 μ L de suspensão de células tumorais em PBS/Matrigel® estéril foram injetados por administração subcutânea no flanco posterior dorsal. O crescimento do tumor foi monitorado pelo volume do tumor, medido duas vezes por semana por compasso. Uma vez que o modelo de tumor é estabelecido (14 dias após a injeção do tumor), com o volume médio do tumor atinge $\sim 300 \text{mm}^3$, os camundongos com tumor foram injetados por via intravenosa com células T não transduzidas (NT, 1×10^7 de células T totais) ou células T MSLN-TFP (1×10^7 de células T totais).

[00430] As células T MSLN-TFP controlaram dramaticamente o crescimento de tumores elevados MSLN, em comparação com camundongos tratados com células T NT (Figura 14A). Por outro lado, a resposta antitumoral limitada foi observada em camundongos tratados com células T MSLN-TFP com tumores MSLN baixos (Figura 14B). Enquanto a regressão do tumor foi observada em um animal, os outros 9 camundongos tratados com células T MSLN-TFP mostraram uma taxa de progressão tumoral mais lenta (n=2) ou semelhante (n=6) aos animais que receberam células T NT (Figura 14B).

Notas Finais

[00431] Embora as modalidades preferíveis da presente invenção tenham sido mostradas e descritas neste documento, será óbvio para aqueles versados na técnica que tais modalidades são fornecidas somente a título de exemplo. Diversas variações, alterações e substituições ocorrerão agora àqueles versados na técnica, sem que haja afastamento da invenção. Deve-se entender que diversas alternativas às modalidades da invenção descritas neste documento podem ser empregadas na prática da invenção. Pretende-se que as seguintes reivindicações definam o escopo da invenção e que os métodos e estruturas dentro do escopo destas reivindicações e seus equivalentes sejam abrangidos.

Tabela 4 - SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO:	Nome	Sequência
1	Ligante Peptídico Curto 1	GGGGSGGGGSGGGGSLE
2	Ligante Peptídico Curto 2	AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE
3	Ligante Peptídico Longo	AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGGSGGGGSLE
4	CD3-ε humano	MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYK VSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGEDDDKNIGS DEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRA RVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGLLLLVYYWSKNRK AKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDIYPIRKG QRDLYSGLNQRRI
5	CD3-γ humano	MEQGKGLAVLILAILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDG SVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAK DPRGM YQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAVLLTC DAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGM YQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIV SIFRVLAVLAQ
6	CD3-δ humano	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSI TWVEGTVGTLTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKD

		KESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLLALG VFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQ YSHLGGNWARNKS
7	CD3- ζ humano	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFI YGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDRRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR
8	cadeia α de TCR humano	MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGGTPFPPLAPPIMLLVDG KQQMVVVCLVLDVAPPGLDPIWFSAGNGSALDAFTYG PSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPGEAG HSRSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLRGTPGGALWLVL RLLLFKLLFDLLLTCSCLCDPAGPLPSPATTTRLRALGS HRLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRWGDTPPGRKPG SPVWGEYSYPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLGAFF AGDLPPPLQAGA
9	região C de cadeia α de TCR humano	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSK DSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANA FNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL VIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWS
10	CTL-L17 de região V de cadeia α de TCR humano	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDQVQKQNSPSL SVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISIS SIKDKNEDGRFTVFLNKSALHLSLHIVPSQPGDSAVYFCA AKGAGTASKLTFGTGTG
11	região C de cadeia β de TCR humano	EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDH VELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSS RLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGK ATLYAVLVSALVLMAMVKKRDF
12	CTL-L17 de região V de cadeia β de TCR humano	MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSNPRHNITKRGQNV TFRCDPISEHNRLYWRQTLGQGPEFLTYFQNEAQLEKS RLLSDRFSERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSLA GLNQPQHFGDGTRLSIL
13	YT35 região V de cadeia β de TCR	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEV LRCKPISGHNSLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSG

	humano	MPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSFST CSANYGYTFGSGTTVV
14	Sequência de ácido nucleico que codifica o ligante peptídico 1 anti-MUC16 de domínio único (SD1)	caggtgcagctgcaggagtctggggaggattggtgcaggctgggggactctct gagactctcctgtgcagcctctggacgcaccgtcagtagcttggcatgggctggt tccgccaagctccaggaaggagcgtgaactgtagcagccattagccggtat agtctatatacactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccgcag acaacgccaagaacgcggtatatctgcaaatgaacagcctgaaacctgagga cacggccggtttattactgtgcatcaaagtggatatacttctaatgactatgactcc tggggccaggggaccaggtcaccgtctctca
15	R3MU4 de ligante peptídico de anti-MUC16 de domínio único	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GRTVSSL FMGWF RQAPGKERELVAA ISRYS LYTYADSVKGRFTISADNAK NAVYLQMNSLKPEDTAVYYC ASKLEYTSNDYDS WGQG TQVTVSS
16	R3MU4CDR1	GRTVSSLF
17	R3MU4 CDR2	ISRYSLYT
18	R3MU4 CDR3	ASKLEYTSNDYDS
19	Sequência de ácido nucleico que codifica anti-MUC16 R3MU29 de domínio único	caggtgcagctgcaggagtctggggaggattggtgcaggctggggactctct gagactctcctgtgcagcctctggacgcgccgtcagtagcttggcatgggctggt tccgccgagctccaggaaggagcgtgaactgtagcagccattagccggtat agtctatatacactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccgcag acaacgccaagaacgcggtatatctgcaaatgaacagcctaaaacctgagga cacggccggtttattactgtgcatcaaagtggatatacttctaatgactatgactcc tggggccaggggaccaggtcaccgtctctca
20	Anti-MUC16 R3MU29 de domínio único	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAAS GRAVSSL FMGWF RRAPGKERELVAA ISRYS LYTYADSVKGRFTISADNAK NAVYLQMNSLKPEDTAVYYC ASKLEYTSNDYDS WGQG TQVTVSS
21	R3MU29 CDR1	GRAVSSLF
22	R3MU29 CDR2	ISRYSLYT
23	R3MU29 CDR3	ASKLEYTSNDYDS
24	Sequência de ácido nucleico que codifica anti-MUC16 R3MU63 de domínio único	caggtgcagctgcaggagtctggggaggattggtgcaggctggggactctct gagactctcctgtgcagcctctggacgcaccgtcagtagcttggcatgggctggt tccgccgagctccaggaaggagcgtgaactgtagcagccattagccggtat agtctatatacactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccgcag acaacgccaagaacgcggtatatctgcaaatgaacagcctgaaacctgagga

		cacggccggtttattactgtgcatcaaagtggaatatacttctaatactgactatgactcc tggggccaggggaccagggtcaccgtctcctca
25	Anti-MUC16 R3MU63 de domínio único	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAAS GRTVSSLF MGWF RRAPGKERELVAA ISRYSLY TYADSVKGRFTISADNAK NAVYLQMNSLKPEDTAVYYC ASKLEYTSNDYDS WGQG TQVTVSS
26	R3MU63 CDR1	GRTVSSLF
27	R3MU63 CDR2	ISRYSLY
28	R3MU63 CDR3	ASKLEYTSNDYDS
29	Sequência de ácido nucleico que codifica anti- MUC16 R3MU119 de domínio único	cagggtgcagctgcaggagtctgggggagggttggtgcagcctggggattctatg agactctctgtgcagccgaggggactcttggatgggtatgtagtaggttggtc cgccaggccccaggggaaggagcgcagggggtctcaagtattagtgccgatg gcagtatgcgatacgttctgactccgtgaaggggagattcaccatctcccag acaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgatcgacctgaaacctgagga cacaggcgtttattactgtgcagcagaccaccactgggactactgggggtca ggggaccagggtcaccgtctcctca
30	Anti-MUC16 R3MU119 de domínio único	QVQLQESGGGLVQPGDSMRLSCAAE GDSL DGYVVGWF RQAPGKERQGVSS ISGDGSMR YVADSVKGRFTISRDNA KNTVYLQMIDLPEDTGVYYC AADPPTWDY WGQGTQV TVSS
31	R3MU119 CDR1	GDSL DGYV
32	R3MU119 CDR2	ISGDGSMR
33	R3MU119 CDR3	AADPPTWDY
34	Sequência de ácido nucleico que codifica anti- MUC16 R3MU150 de domínio único	cagggtgcagctgcaggagtctgggggaggcttggtgcagcctgggggggtctct gagactctctgtgcagcctctggagcaccgtcagtagcttggcatgggctggt tccgccgagctccaggggaaggagcgtgaactgttagcagccattagccggtat agtctatatacatactatgcagactccgtgaaggggagattcaccatctcccag acaacgccaagaacgcggttatctgcaaatgaacagcctgaaacctgagga cacggccggtttattactgtgcatcaaagtggaatatacttctaatactgactatgactcc tggggccaggggaccagggtcaccgtctcctca

35	Anti-MUC16 R3MU150 de domínio único	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTVSSLFMGWF RRAPGKERELVAAISRYSLYTYADSVKGRFTISADNAK NAVYLQMNSLKPEDTAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQG TQVTVSS
36	R3MU150 CDR1	GRTVSSLF
37	R3MU150 CDR2	ISRYSLYT
38	R3MU150 CDR3	ASKLEYTSNDYDS
39	Sequência de ácido nucleico que codifica anti- MUC16 R3MU147 de domínio único	cagggtgcagctgcaggagctctggggaggattggtgcaggctggggagtctct gagactctctgtgcagcctctggacgcaccgtcagtagcttggcatgggctggt tccgccgagctccaggaaggagcgtgaactgtagcagccattagccggtat agtctatatacatactatgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccgcag acaacgccaagaacgcggtatatctgcaaatgaacagcctgaaacctgagga cacggccggtttattactgtgcatcaaagttggaatatacttctaatgactatgactcc tggggccaggggaccaggtcaccgtctctca
40	Anti-MUC16 R3MU147 de domínio único	QVQLQESGGGLVQAGESLRLSCAASGRTVSSLFMGWF RRAPGKERELVAAISRYSLYTYADSVKGRFTISADNAK NAVYLQMNSLKPEDTAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQG TQVTVSS
41	R3MU147 CDR1	GRTVSSLF
42	R3MU147 CDR2	ISRYSLYT
43	R3MU147 CDR3	ASKLEYTSNDYDS
44	R3MU29h15 (98,9% humano)	<u>E</u> VQL <u>V</u> ESGGGLVQ <u>P</u> GGSLRLSCAASGRAVSSLFMGW <u>V</u> RQAPGK <u>G</u> LEW <u>V</u> SAISRYSLYTYADSVKGRFTIS <u>R</u> DNAK N <u>T</u> L <u>Y</u> LQMNSL <u>R</u> PEDTAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQGT <u>L</u> VTVSS
45	R3MU29h14 (97,8% humano)	<u>E</u> VQL <u>V</u> ESGGGLVQ <u>P</u> GGSLRLSCAASGRAVSSLFMGWF RQAPGK <u>G</u> LEW <u>V</u> SAISRYSLYTYADSVKGRFTIS <u>R</u> DNAK N <u>T</u> L <u>Y</u> LQMNSL <u>R</u> PEDTAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQGT <u>L</u> VTVSS
46	R3MU29h13 (96,7% humano)	<u>E</u> VQL <u>V</u> ESGGGLVQ <u>P</u> GGSLRLSCAASGRAVSSLFMGWF RQAPGK <u>G</u> LELV <u>S</u> AISRYSLYTYADSVKGRFTIS <u>R</u> DNAK N <u>T</u> L <u>Y</u> LQMNSL <u>R</u> PEDTAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQGT <u>L</u> VTVSS
47	R3MU4h13 (98,9% humano)	<u>E</u> VQL <u>V</u> ESGGGLVQ <u>P</u> GGSLRLSCAASGRTVSSLFMGW <u>V</u> RQAPGK <u>G</u> LEW <u>V</u> SAISRYSLYTYADSVKGRFTIS <u>R</u> DNAK

		NT <u>L</u> YLQMNSLR <u>P</u> EDTAVYYC ASKLEYTSNDYDS WGQGT <u>L</u> VTVSS
48	R3MU4h12 (97,8% humano)	<u>E</u> VQL <u>V</u> ESGGGLVQ <u>P</u> GGSLRLS CAASGRTVSS LFMGWF RQAPGK <u>G</u> LE <u>W</u> V <u>S</u> A ISRYSLY TYADSVKGRFTIS <u>R</u> DNAK NT <u>L</u> YLQMNSLR <u>P</u> EDTAVYYC ASKLEYTSNDYDS WGQGT <u>L</u> VTVSS
49	R3MU4h11 (96,7% humano)	<u>E</u> VQL <u>V</u> ESGGGLVQ <u>P</u> GGSLRLS CAASGRTVSS LFMGWF RQAPGK <u>G</u> LE <u>L</u> V <u>S</u> A ISRYSLY TYADSVKGRFTIS <u>R</u> DNAK NT <u>L</u> YLQMNSLR <u>P</u> EDTAVYYC ASKLEYTSNDYDS WGQGT <u>L</u> VTVSS
50	Sequência de ácido nucleico que codifica o Clone 1 de anti-IL13Rα2 de domínio único de Lhama (LSD1)	GATGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTG CAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCACTTCGGATTATTATATCATAGGCTGGTTC CGCCAGGCCCCAGGGAAGGAGCGGAGGGGGTATCA TGTATTAGTAGTAAATATGCGAACACAACTATGCAGA CTCCGTGAAGGGCCGATTCACCCAGTCCAGAGGTGCT GCTAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACGCCCTGA AACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGCGCGGCAGA TACGAGGCGGTATACATGCCCGGATATAGCGACTATG CACAGGAACCTTGATTCTGGGGCCAGGGGACCCAG GTCACCGTCTCCTCA
51	Clone 1 de anti-IL13Rα2 de domínio único de Lhama (LSD1)	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTSDY YIIGWFR QAPGKEREGVSC ISSKYANT NYADSVKGRFTQSRGA KNTVYLQMNALKPEDTAVYYC AADTRRYTCPDIATMHRN FDS WGQGTQVTVSS
52	LSD1 CDR1	GFTSDYYI
53	LSD1 CDR2	ISSKYANT
54	LSD1 CDR3	AADTRRYTCPDIATMHRNFDS
55	Sequência de ácido nucleico que codifica o Clone 1 de anti-IL13Rα2 de domínio único de Lhama Humanizado (H1-	GA <u>a</u> GTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTG CAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCACTTCGGATTATTATATCAT <u>g</u> GGCTGGTTC CGCCAGGCCCCAGGGAAGG <u>gcCtg</u> GAGGGGGTATCAT GTATTAGTAGTAAATATGCGAACAC <u>at</u> TATGCAGACT CCGTGAAGGGCCGATTCAC <u>att</u> TCCAGAG <u>a</u> T <u>aac</u> GCTA AGAACACG <u>c</u> TGTATCTGCAAATGAAC <u>ag</u> CCTG <u>cg</u> TCTG

	LSD1)	AGGACACGGCCGTTTATTACTGCGCGGCAGATACGAG GCGGTATACATGCCCGGATATAGCGACTATGCACAGG AACTTTGATTCTGGGGCCAGGGGACCCtGGTCACCG TCTCCTCA
56	Clone 1-h8 de anti-IL13R α 2 de Domínio único de Lhama Humanizado (H1-LSD1)	<u>E</u> VLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTSDYYI <u>M</u> GWFR QAPGK <u>G</u> LE <u>V</u> SC ISSKYANT <u>Y</u> ADSVKGRFT <u>I</u> SRD <u>N</u> AKN T <u>L</u> YLQMNS <u>L</u> RPEDTAVYYCAAD TRRYTCPDIATMHRNF DSWGQGT <u>L</u> VTVSS
57	H1-LSD1 CDR1	GFTSDYYI
58	H1-LSD1 CDR2	ISSKYANT
59	H1-LSD1 CDR3	AADTRRYTCPDIATMHRNFDS
60	Sequência de ácido nucleico que codifica o Clone 1 de anti-IL13R α 2 de domínio único de Lhama Humanizado (H2-LSD1)	GA <u>a</u> GTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTG CAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCACTTCGGATTATTATATCAT <u>g</u> GGCTGG <u>gtg</u> C GCCAGGCCCCAGGGGAAG <u>gc</u> C <u>tg</u> GAGtGGGTATCATGT ATTAGTAGTAAATATGCGAACACAtatTATGCAGACTCC GTGAAGGGCCGATTACC <u>att</u> TCCAGAGa <u>a</u> aacGCTAAG AACACG <u>c</u> TGTATCTGCAAATGAAC <u>ag</u> CCTG <u>cgt</u> CCTGAG GACACGGCCGTTTATTACTGCGCGGCAGATACGAGGC GGTATACATGCCCGGATATAGCGACTATGCACAGGAA CTTTGATTCTGGGGCCAGGGGACCCtGGTCACCGTC TCCTCA
61	Clone 1-h10 de anti-IL13R α 2 de domínio único de Lhama Humanizado (H2-LSD1)	<u>E</u> VLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTSDYYI <u>M</u> GW <u>V</u> R QAPGK <u>G</u> LE <u>W</u> VSC ISSKYANT <u>Y</u> ADSVKGRFT <u>I</u> SRD <u>N</u> AKN T <u>L</u> YLQMNS <u>L</u> RPEDTAVYYCAAD TRRYTCPDIATMHRNF DSWGQGT <u>L</u> VTVSS
62	H2-LSD1 CDR1	GFTSDYYI
63	H2-LSD1 CDR2	ISSKYANT
64	H2-LSD1 CDR3	AADTRRYTCPDIATMHRNFDS
65	Sequência de ácido nucleico que	GATGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTG CAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGAAGCCT

	codifica o Clone 2 de anti-IL13R α 2 de domínio único de Lhama (LSD2)	CTGGATTCGCTTCGGATGATTATATCATAGGCTGGTTC CGCCAGGCCCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTTCA TGTATTAGTAGTAGGTATGCGAACACTGTCTATACAGA CTCCGTGAAGGGCCGATTCCGCATCTCCAGAGGCACT GCTAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAGCGCCCTGA AACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGATGGA TTCGAGGCGCGTTACATGCCCCGAGATATCGACTATG CACAGGAAC TTTGATTCTGGGGCCAGGGGACCCAG GTCACCGTCTCCTCA
66	Clone 2 de anti-IL13R α 2 de domínio único de Lhama (LSD2)	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEAS GFASDDYI IGWFR QAPGKEREGVSC ISSRYANT VYTDSVKGRFRISRGTAKN TVYLQMSALKPEDTAVYYC AMDSRRVTCPEISTMHRNF DSWGQGTQVTVSS
67	LSD2 CDR1	GFASDDYI
68	LSD2 CDR2	ISSRYANT
69	LSD2 CDR3	AMDSRRVTCPEISTMHRNFDS
70	Sequência de ácido nucleico que codifica o Clone 2 de anti-IL13R α 2 de domínio único de Lhama Humanizado (H1-LSD2)	GA <u>a</u> GTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTG CAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTG <u>cg</u> GCCT CTGGATTCGCTTCGGATGATTATATCAT <u>g</u> GGCTGGTTC CGCCAGGCCCCAGGGAAGG <u>gc</u> <u>ctg</u> GAGGGGGTTTCAT GTATTAGTAGTAGGTATGCGAACACT <u>tat</u> TAT <u>gCg</u> GACT CCGTGAAGGGCCGATT <u>ac</u> CATCTCCAGAG <u>atAac</u> GCT AAGAACACG <u>c</u> TGTATCTGCAAATGA <u>aCag</u> CCTG <u>cgt</u> CCT GAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGATGGATTCTGA GGCGCGTTACATGCCCCGAGATATCGACTATGCACAG GAACTTTGATTCTGGGGCCAGGGGACCC <u>t</u> GGTCACC GTCTCCTCA
71	Clone 2-h8 de anti-IL13R α 2 de Domínio único de Lhama Humanizado (H1-LSD2)	<u>E</u> VQLVESGGGLVQPGGSLRLS <u>C</u> AAS GFASDDYI <u>M</u> IGWFR QAPGK <u>G</u> LEGVSC ISSRYANT <u>Y</u> <u>A</u> DSVKGR <u>F</u> ISRD <u>N</u> AKN <u>T</u> <u>L</u> YLQM <u>N</u> SL <u>R</u> PEDTAVYYC AMDSRRVTCPEISTMHRNF DSWGQGT <u>L</u> VTVSS
72	H1-LSD2 CDR1	GFASDDYI
73	H1-LSD2 CDR2	ISSRYANT

74	H1-LSD2 CDR3	AMDSRRVTCPEISTMHRNFDS
75	Sequência de ácido nucleico que codifica o Clone 2 de anti-IL13Rα2 de domínio único de Lhama Humanizado (H2-LSD2)	GAaGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTG CAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGcgGCCT CTGGATTCGCTTCGGATGATTATATCATgGGCTGGgtg CGCCAGGCCCCAGGGAAGGgcCtgGAGtGGGTTTCAT GTATTAGTAGTAGGTATGCGAACACTtatTATgCgGACT CCGTGAAGGGCCGATTcacCATCTCCAGAGatAacGCT AAGAACACGcTGTATCTGCAAATGAaCagCCTGcgtCCT GAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGATGGATTCTGA GGCGGTTACATGCCCCGAGATATCGACTATGCACAG GAACTTTGATTCTGGGGCCAGGGGACCCtGGTCACC GTCTCCTCA
76	Clone 2-h10 de anti-IL13Rα2 de domínio único de Lhama Humanizado (H2-LSD2)	<u>E</u> VQLVESGGGLVQPGGSLRLSC <u>A</u> ASGFASDDYIMGWV RQAPGK <u>G</u> LE <u>W</u> VSC <u>I</u> SSRYANT <u>Y</u> Y <u>A</u> DSVKGRFT <u>I</u> SRD <u>N</u> AK NT <u>L</u> YLQM <u>N</u> SLR <u>P</u> EDTAVYYC AMDSRRVTCPEISTMHRN FDSWGQGT<u>L</u>VTVSS
77	H2-LSD2 CDR1	GFASDDYI
78	H2-LSD2 CDR2	ISSRYANT
79	H2-LSD2 CDR3	AMDSRRVTCPEISTMHRNFDS
80	2TIG14	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGLTFSTYS- MGWFRQAPGKEREFTALRWTGMDTWYADSVKGRFAI SRDNAKNTVYLLQMNSLNAEDTAVYYCA-TRHKSVLG-- AVANPTRYDYWGQGTQVTVSS
81	2TIG23	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYV- MGWFRQAPGKEREFTVARSTSTGY- INYADPVKGRFTISRDDAKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYC AATRY-----VNRNREYDYWGQGTQVTVSS
82	2TIG4	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT---YG- MGWFRQAPGKEREFTVAVGVWSSGNTYYADFARGRFTI SRDNAKNTVYLLQMDSLKPEDTAVYYCAAPRYSSY----- TTYHAAYDYWPGGTQVTVSS
83	2TIG52	QVQLQESGGGLAQTGGSLRLSCDASARTFNKYV- MGWFRQAPGKEREFTVAVVNWGDSTYYADDVKGRFTI

		SRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAWYGTT---- WSPKVRNSYDYSGHGTQVTVSS
84	2TIG21	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRFTFSNYN- LGWFRQAPGKEREFVAGVRWNYANTYYAESVKGRFKM SKDIAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCA----- MGPKPGYELGPDDYWGQGTQVTVSS
85	2TIG15	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAPSGRSFS- FRGMGWFRQAPGKEREFVAAASWIYATTDYSDSVKGRF TISKDNAKDTLNLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRGTSDT- VLPPRSYDYDVWGRGTQVTVSS
86	2TIG35	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGSTFSRYTNIGWF RQAPGKEREFVAAFWRWGFANTYYGDSVKGRSTISRDNA KKQVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASSEW----- TTEAVKYDYWGQGTQVTVSS
87	2TIG40	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG--LSSNA- MAWFRQGPQKDFEFVAAFHWRFANTYYADSVKGRFTIS RDNKNTVYLQMNSLKPEDTALYYCAARQGSVYGGSSP V----DYDYWGQGTQVTVSS
88	2TIG6	QVQLQESGGGLVQAGDSLKLSCVASGRFTFSTYA- MAWFRRAPGKEREFVASIWSGGSSYYANSVKGRFTISG DNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADNRPMGRS-TG-- ----YNYWGQGTQVTVSS
89	2TIG18	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVDSGRFTFGSYT- MAWFRQAPGKEREFVAAISGSGGWKYYADSVKGRFTIS RDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCA----- GGLLPVTAAREYTYWGQGTQVTVSS
90	2TIG54	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSSY- RMAWFRQAPGKESEFVAGIRWGGRTYYADSVKGRFAI SGDSAKNMVYLQMNSLKSEDTAVYYCAADENSS----- DQGYDYWGQGTQVTVSS
91	2TIG66	QVQLQESGGGLVQIGGSLRLSCAASGRFTFSSY- FMAWFRQAPGKEREFVAAIGWSGADTYEDSVKGRFTI SRDNANKMVYLQMNSLKPEDTAVYYCASGRGS----- TWSTSTYSIRGQGTQVTVSS
92	3TIG26	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRFTFSDY-

		YMAWFRQASGKEREVATISRGGFNSDYADSAKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNSLTPEDTAVYYCAADR----- GIGDSRSATAYDYWGQGTQVTVSS
93	3TIG35	QVQLQESGGGLVQAGESLRLSCTASGLTDSNYA- IGWFRQAPGKEREVFTESNWRGGNHYYLDSIKGRFTISR DNAKSTLYLQMNNLQPEDTAVYYCAARR----- TARYDYWGQGTQVTVSS
94	3TIG52	QVQLQESGGGLVQAGASLKLSCAASGRTFSMYG- LGWFRQAPGKEREVVASIRWSDNSTHYANSVKGRFTIS ADNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAG-----GRAGSP----- LEYWGQGTQVTVSS
95	3TIG53	QVQLQESGGGSVQAGDSLRLSCAVSARTFSSYT- MGWFRQAPGKEREVTAITWSAGWTYYADSVKGRFTIS RDNTQNTVYLQMDSLKVEDTAVYYCAA----- GPLPVTSPSSYDYWGQGTQVTVSS
96	Polipeptídeo MUC16 Humano	NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVL VDGYSPNRNEPLTGNSDLP
97	Anti-MSLN VHH1	QVQLVQSGGGLVHPGSLRLSCAASGIDLSLYRMRWYR QAPGKERDLVALITDDGTSYYEDSVKGRFTITRDNPSNK VFLQMNSLKPEDTAVYYCNAETPLSPVNYWGQGTQVT S
98	Anti-MSLN VHH2	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAPSGSIFGIRTMDWYR QAPGKERELVARITMDGRVHFADSVKGRFSGSRDGASN AVYLMNSLKPDDTAVYYCRYSGLTREDYWGPGTQVT VSS
99	Ligante peptídico curto 3	GGGGSGGGGS
100	Sequência de DNA do ligante peptídico curto 3	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
101	Primer MP057	TTATGCTTCCGGCTCGTATG
102	Primer A6E	GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG
103	Primer PMCF	CTAGTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTGGGT
104	Primer reverso universal	TCACACAGGAAACAGCTATGAC

105	Primer forward universal	CGCCAGGGTTTTTCAGTCACGAC
-----	-----------------------------	-------------------------

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de que compreende

(I) uma célula T de um sujeito humano, em que a célula T compreende uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP) compreendendo

(a) uma subunidade do TCR compreendendo

(i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR,

(ii) um domínio transmembrana de TCR, e

(iii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador proveniente de um domínio de sinalização intracelular de TCR; e

(b) um domínio de ligação ao antígeno compreendendo um domínio de ligação anti-MUC16; e

(II) um carreador farmacêuticamente aceitável;

em que a subunidade de TCR e o domínio de ligação anti-MUC16 são operacionalmente ligados;

em que a TFP interage funcionalmente com um TCR quando expressa na célula T.

2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a sequência que codifica o domínio de ligação anti-MUC16 está conectada à sequência que codifica o domínio extracelular de TCR por uma sequência que codifica um ligante peptídico.

3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que o ligante peptídico compreende $(G_4S)_n$, em que G é glicina, S é serina e n é um número inteiro de 1 a 4.

4. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação anti-MUC16 compreende

(i) uma sequência de CDR1 de cadeia pesada (HC) GRTVSSLF, GRAVSSLF ou GDSL DGYV,

(ii) uma sequência de CDR2 HC ISRYSLYT ou ISGDGSMR, e

(iii) uma sequência de CDR3 HC ASKLEYTSNDYDS ou AADPPTWDY.

5. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1-4, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação anti-MUC16 compreende uma sequência tendo pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou 100% de identidade de sequência da SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35 ou SEQ ID NO:40.

6. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, **caracterizada** pelo fato de que a composição farmacêutica é substancialmente livre de soro.

7. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno é um scFv.

8. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno é um anticorpo de domínio único.

9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que o anticorpo de domínio único é um domínio V_H.

10. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação anti-MUC16 codificado compreende um domínio de ligação anti-MUC16, e que as células T têm maior atividade citotóxica ou atividade citotóxica mais eficiente que as células T CD8⁺ ou CD4⁺ que compreendem um ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) compreendendo (a) o domínio de ligação anti-MUC16 operacionalmente ligado a (b) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de CD28, (c) um domínio transmembrana de CD28, (d) pelo menos uma porção de um domínio intracelular de CD28 e (e) um domínio intracelular zeta de CD3.

11. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de TFP codificada interage funcionalmente com um complexo de TCR endógeno, pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno, ou uma combinação destes quando expressa na célula T.

12. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizada** pelo fato de que a célula T é uma célula T

primária.

13. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, **caracterizada** pelo fato de que a célula T é uma célula T CD4+ humana.

14. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, **caracterizada** pelo fato de que a célula T é uma célula T CD8+ humana.

15. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-14, **caracterizada** pelo fato de que a célula T compreende ainda um ácido nucleico que codifica um primeiro polipeptídeo compreendendo pelo menos uma porção de uma molécula inibidora selecionada do grupo consistindo em PD-1 e BTLA, em que a pelo menos uma porção de uma molécula inibidora está associada a um segundo polipeptídeo compreendendo um sinal positivo a partir de um domínio de sinalização intracelular.

16. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizada** pelo fato de que o segundo polipeptídeo compreende um domínio coestimulador e um domínio de sinalização primária de uma proteína selecionada do grupo consistindo em CD28, CD27, ICOS, CD3ζ, 41-BB, OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160 e B7-H3.

17. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-16, **caracterizada** pelo fato de que a produção de IL-2 ou IFN γ pela célula T aumenta na presença de uma célula que expressa um antígeno que interage especificamente com o domínio de ligação anti-MUC16 em comparação a uma célula T que não contém a TFP.

18. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-17, **caracterizada** pelo fato de que a célula é uma população de células T CD8+ ou CD4+ humanas, em que uma célula T individual da população compreende pelo menos duas moléculas de TFP, ou pelo menos duas células T da população compreendem coletivamente pelo menos duas moléculas de TFP; que as pelo menos duas moléculas de TFP compreendem um domínio de ligação anti-MUC16, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular; e que pelo menos uma das pelo menos duas moléculas de

TFP interage funcionalmente com um complexo de TCR endógeno, pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno, ou uma combinação destes.

19. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-18, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR é derivada apenas do CD3 épsilon.

20. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-18, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR é derivada apenas do CD3 gama.

21. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-18, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR é derivada apenas do CD3 delta.

22. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-18, **caracterizada** pelo fato de que o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR da subunidade de TCR são derivados de uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta.

23. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-18, **caracterizada** pelo fato de que o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR da subunidade de TCR são derivados de uma subunidade única de um complexo de TCR, em que a subunidade única é uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta.

24. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23, **caracterizada** pelo fato de que a célula T apresenta citotoxicidade aumentada para uma célula que expressa um antígeno que interage especificamente com o domínio de ligação anti-MUC16 em comparação a uma célula T que não contém a TFP.

25. Método para proporcionar uma imunidade antitumoral em um mamífero, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração, ao mamífero, de uma quantidade eficaz de uma população de células T transduzidas com uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de

fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

- (a) uma subunidade de TCR compreendendo
 - (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e
 - (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador proveniente de um domínio de sinalização intracelular de TCR; e
- (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação ao antígeno que é um domínio de ligação anti-MUC16;

em que a subunidade de TCR e o domínio do anticorpo estão operacionalmente ligados,

em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T, e
 em que os níveis mais baixos de citocinas são liberados após o tratamento em comparação com os níveis de citocinas de um mamífero tratado com uma célula CAR-T que compreende o mesmo domínio de anticorpo.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de anticorpo é um domínio V_{HH} tendo pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência indicada na SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35, ou SEQ ID NO:40.

27. Método, de acordo com a reivindicação 25 ou 26, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula T autóloga.

28. Método, de acordo com a reivindicação 25 ou 26, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula T alogênica.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25-28, **caracterizado** pelo fato de que o mamífero é um humano.

30. Método de tratamento de um mamífero com uma doença associada à expressão de MUC16, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração, ao mamífero, de uma quantidade eficaz de uma população de células T transduzidas com uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

- (a) uma subunidade de TCR compreendendo
 - (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e

(ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador proveniente de um domínio de sinalização intracelular de TCR; e

(b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação ao antígeno que é um domínio de ligação anti-MUC16;

em que a subunidade de TCR e o domínio do anticorpo estão operacionalmente ligados,

em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T, e

em que os níveis mais baixos de citocinas são liberados após o tratamento em comparação com os níveis de citocinas de um mamífero tratado com uma célula CAR-T que compreende o mesmo domínio de anticorpo.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de anticorpo é um domínio V_{HH} tendo pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência indicada na SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35, ou SEQ ID NO:40.

32. Método, de acordo com a reivindicação 30 ou 31, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula T autóloga.

33. Método, de acordo com a reivindicação 30 ou 31, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula T alogênica.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25-33, **caracterizado** pelo fato de que a subunidade de TCR da TFP compreende ainda um domínio transmembrana de TCR.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, **caracterizado** pelo fato de que o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR são derivados de uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta.

36. Método, de acordo com a reivindicação 34, **caracterizado** pelo fato de que o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR da subunidade de TCR são derivados de uma subunidade única de um complexo de TCR, em que a subunidade única é uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma

cadeia delta de TCR, CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta.

37. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25-36, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de sinalização intracelular de TCR é derivado de CD3 épsilon ou CD3 gama.

38. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-33, **caracterizado** pelo fato de que a doença associada à expressão de MUC16 é selecionada do grupo consistindo em uma doença proliferativa, um câncer, uma neoplasia maligna e uma indicação não relacionada a câncer associada à expressão de MUC16.

39. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-38, **caracterizado** pelo fato de que a doença é um câncer selecionado do grupo consistindo em mesotelioma, carcinoma de células renais, câncer de estômago, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer ovariano, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer do colo do útero, câncer cerebral, câncer de fígado, câncer pancreático, câncer de tireoide, câncer de bexiga, câncer do ureter, câncer renal, câncer do endométrio, câncer do esôfago, câncer gástrico, carcinoma tímico, colangiocarcinoma, câncer de estômago e qualquer combinação destes.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-38, **caracterizado** pelo fato de que a doença é um câncer selecionado do grupo consistindo em mesotelioma, adenocarcinoma ovariano seroso papilar, carcinoma ovariano de células claras, carcinoma ovariano mulleriano misto, carcinoma ovariano mucinoso endometriode, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma pancreático ductal, carcinoma seroso uterino, adenocarcinoma de pulmão, carcinoma do duto biliar extra-hepático, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma esofágico, adenocarcinoma colorretal, adenocarcinoma de mama, uma doença associada à expressão de MUC16 e qualquer combinação destes.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-40, **caracterizado** pelo fato de que as células que expressam uma molécula de TFP são administradas em combinação com um agente que aumenta a eficácia de uma célula que expressa uma molécula de TFP.

42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25-41, **caracterizado** pelo fato de que, para uma dada citocina, pelo menos 10% a menos da dada citocina é liberado após o tratamento em comparação com uma quantidade

da dada citocina de um mamífero tratado com uma célula CAR-T compreendendo o mesmo domínio de anticorpo.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, **caracterizado** pelo fato de que a dada citocina compreende uma ou mais citocinas selecionadas do grupo consistindo em IL-2, IFN- γ , IL-4, TNF- α , IL-6, IL-13, IL-5, IL-10, sCD137, GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , e qualquer combinação destes.

44. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25-43, **caracterizado** pelo fato de que o crescimento de um tumor no mamífero é inibido de modo que o tamanho do tumor seja no máximo 10%, no máximo 20%, no máximo 30%, no máximo 40%, no máximo 50%, ou no máximo 60% do tamanho de um tumor em um mamífero tratado com células T que não expressam a TFP após pelo menos 8 dias de tratamento, em que o mamífero tratado com células T que expressam a TFP e o mamífero tratado com células T que não expressam a TFP têm o mesmo tamanho tumoral antes do tratamento.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizado** pelo fato de que o crescimento tumoral no mamífero é completamente inibido.

46. Método, de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que o crescimento tumoral no mamífero é completamente inibido por pelo menos 20 dias, pelo menos 30 dias, pelo menos 40 dias, pelo menos 50 dias, pelo menos 60 dias, pelo menos 70 dias, pelo menos 80 dias, pelo menos 90 dias, pelo menos 100 dias, ou mais.

47. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25-46, **caracterizado** pelo fato de que a população de células T transduzidas com TFP eliminam uma quantidade semelhante de células tumorais em comparação com as células CAR-T que compreendem o mesmo domínio de anticorpo.

48. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25-47, **caracterizado** pelo fato de que a população de células T transduzidas com a TFP têm um perfil de expressão gênica diferente em relação às células CAR-T que compreendem o mesmo domínio de anticorpo.

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que um nível de expressão de um gene é diferente nas células T transduzidas com a TFP em relação a um nível de expressão do gene nas células CAR-T que compreende o mesmo domínio de anticorpo.

50. Método, de acordo com a reivindicação 49, **caracterizado** pelo fato de que o gene tem uma função na apresentação de antígeno, sinalização de TCR, homeostase, metabolismo, sinalização por quimiocina, sinalização por citocina, sinalização por receptor tipo Toll, sinalização por MMP e molécula de adesão, ou sinalização relacionada a TNFR.

51. Molécula de ácido nucleico recombinante **caracterizada** pelo fato de que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

- (a) uma subunidade de TCR compreendendo
 - (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e
 - (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon; e
- (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-MUC16;

em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operacionalmente ligados, e

em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T.

52. Molécula de ácido nucleico recombinante **caracterizada** pelo fato de que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

- (a) uma subunidade de TCR compreendendo
 - (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e
 - (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 gama; e
- (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-MUC16;

em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operacionalmente ligados, e

em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T.

53. Molécula de ácido nucleico recombinante **caracterizada** pelo fato de que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

- (a) uma subunidade de TCR compreendendo

- (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e
 - (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 delta; e
- (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-MUC16;

em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operacionalmente ligados, e

em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T.

54. Molécula de ácido nucleico recombinante **caracterizada** pelo fato de que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

- (a) uma subunidade de TCR compreendendo
 - (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e
 - (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador a partir de um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia alfa de TCR; e
- (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-MUC16;

em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operacionalmente ligados, e

em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T.

55. Molécula de ácido nucleico recombinante **caracterizada** pelo fato de que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

- (a) uma subunidade de TCR compreendendo
 - (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e
 - (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador a partir de um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia beta de TCR; e
- (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-MUC16;

em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operacionalmente ligados, e

em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T.

56. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-55, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de anticorpo é um domínio de anticorpo humano ou humanizado.

57. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-56, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno codificado está conectado ao domínio extracelular de TCR por uma sequência ligante.

58. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 57, **caracterizada** pelo fato de que a sequência ligante codificada compreende $(G_4S)_n$, em que $n=1$ a 4.

59. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-58, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende um domínio extracelular de TCR.

60. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-59, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende um domínio transmembrana de TCR.

61. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-60, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular de TCR.

62. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-61, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende (i) um domínio extracelular de TCR, (ii) um domínio transmembrana de TCR, e (iii) um domínio intracelular de TCR, em que pelo menos dois dentre (i), (ii) e (iii) são da mesma subunidade de TCR.

63. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-62, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador selecionado dentre um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta, ou uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos uma modificação nela.

64. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-63, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de

TCR compreende um domínio intracelular compreendendo um domínio estimulador selecionado dentre um domínio de sinalização funcional de 4-1BB e/ou domínio de sinalização funcional de CD3 zeta, ou uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos uma modificação nela.

65. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-64, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de anticorpo compreende um fragmento de anticorpo.

66. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-65, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de anticorpo compreende um scFv ou um domínio V_H.

67. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-66, **caracterizada** pelo fato de que codifica

(i) uma sequência de CDR1 de cadeia pesada (HC) GRTVSSLF, GRAVSSLF ou GDSL DGYV,

(ii) uma sequência de CDR2 HC ISRYSLYT ou ISGDGSMR, e

(iii) uma sequência de CDR3 HC ASKLEYTSNDYDS ou AADPPTWDY.

68. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-67, **caracterizada** pelo fato de que codifica um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência indicada na SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35 ou SEQ ID NO:40.

69. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-68, **caracterizada** pelo fato de que a TFP inclui um domínio extracelular de uma subunidade de TCR que compreende um domínio extracelular ou uma porção do mesmo de uma proteína selecionada do grupo consistindo em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, fragmentos funcionais das mesmas e sequências de aminoácidos das mesmas tendo pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações.

70. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-69, **caracterizada** pelo fato de que a TFP codificada

inclui um domínio transmembrana que compreende um domínio transmembrana de uma proteína selecionada do grupo consistindo em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, fragmentos funcionais das mesmas e sequências de aminoácidos das mesmas tendo pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações.

71. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-70, **caracterizada** pelo fato de que a TFP codificada inclui um domínio transmembrana que compreende um domínio transmembrana de uma proteína selecionada do grupo consistindo em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia zeta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, fragmentos funcionais das mesmas e sequências de aminoácidos das mesmas tendo pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações.

72. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-71, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda uma sequência que codifica um domínio coestimulador.

73. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 72, **caracterizada** pelo fato de que o domínio coestimulador é um domínio de sinalização funcional obtido de uma proteína selecionada do grupo consistindo em OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) e 4-1BB (CD137), e sequências de aminoácidos destes tendo pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações nela.

74. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-73, **caracterizada** pelo fato de que a pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações nela compreende uma modificação de um aminoácido que medeia a sinalização celular ou uma modificação de aminoácido que é fosforilado em resposta à ligação de um ligante à TFP.

75. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-74, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de ácido nucleico isolado é mRNA.

76. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-75, **caracterizada** pelo fato de que a TFP inclui um motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM) de uma subunidade de TCR que compreende um ITAM ou porção deste de uma proteína selecionada do grupo consistindo em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama, subunidade de TCR de CD3 delta, cadeia zeta de TCR, cadeia de receptor Fc épsilon 1, cadeia de receptor Fc épsilon 2, cadeia de receptor Fc gama 1, cadeia de receptor Fc gama 2a, cadeia de receptor Fc gama 2b1, cadeia de receptor Fc gama 2b2, cadeia de receptor Fc gama 3a, cadeia de receptor Fc gama 3b, cadeia de receptor Fc beta 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, fragmentos funcionais das mesmas e sequências de aminoácidos das mesmas tendo pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações nela.

77. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 76, **caracterizada** pelo fato de que o ITAM substitui um ITAM de CD3 gama, CD3 delta ou CD3 épsilon.

78. Molécula de ácido nucleico recombinante 76, **caracterizada** pelo fato de que o ITAM é selecionado do grupo consistindo em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama e subunidade de TCR de CD3 delta e substitui um ITAM diferente selecionado do grupo consistindo em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama e subunidade de TCR de CD3 delta.

79. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-78, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende um análogo nucleotídico.

80. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 79, **caracterizada** pelo fato de que o análogo nucleotídico é selecionado do grupo consistindo em 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil, 2'-deoxi, T-deoxi-2'-fluoro, 2'-O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropil (2'-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietil (2'-O-DMAEOE), 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA)

modificado, um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido nucleico de etileno (ENA), um ácido nucleico peptídico (PNA), um ácido nucleico de 1',5'- anidro-hexitol (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo de tiolfosfonato e uma 2'-fluoro N3-P5'-fosforamidita.

81. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-80, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda uma sequência líder.

82. Molécula de polipeptídeo recombinante **caracterizada** pelo fato de que é codificada pela molécula de ácido nucleico recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-81.

83. Molécula de TFP recombinante **caracterizada** pelo fato de que compreende um domínio de ligação anti-MUC16, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular.

84. Molécula de TFP recombinante **caracterizada** pelo fato de que compreende um domínio de ligação anti-MUC16, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno.

85. Molécula de TFP recombinante **caracterizada** pelo fato de que compreende um domínio de ligação anti-MUC16, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de integrar funcionalmente em um complexo de TCR endógeno.

86. Molécula de TFP recombinante, de acordo com a reivindicação 83, **caracterizada** pelo fato de que compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-MUC16, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular.

87. Molécula de TFP recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 83-86, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação anti-MUC16 é um scFv, um domínio V_{HH} ou V_H.

88. Molécula de TFP recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 83-87, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação anti-MUC16 compreende uma cadeia pesada com 95-100% de identidade com uma

sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35 ou SEQ ID NO:40, um fragmento funcional da mesma, ou uma sequência de aminoácidos da mesma tendo pelo menos uma, mas não mais de 30 modificações.

89. Molécula de TFP recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 83-88, **caracterizada** pelo fato de que compreende um domínio extracelular de TCR que compreende um domínio extracelular, ou porção deste, de uma proteína selecionada do grupo consistindo em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, fragmentos funcionais das mesmas e sequências de aminoácidos das mesmas tendo pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações.

90. Molécula de TFP recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 83-89, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação anti-MUC16 está conectado ao domínio extracelular de TCR por uma sequência ligante.

91. Molécula de TFP recombinante, de acordo com a reivindicação 90, **caracterizada** pelo fato de que a região ligante compreende $(G_4S)_n$, em que $n=1$ a 4.

92. Ácido nucleico **caracterizado** pelo fato de que compreende uma sequência que codifica uma TFP de acordo com qualquer uma das reivindicações 83-91.

93. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 92, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico é selecionado do grupo consistindo em um DNA e um RNA.

94. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 92 ou 93, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico é um mRNA.

95. Ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 92-94, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico compreende um análogo nucleotídico.

96. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 95, **caracterizado** pelo fato de que o análogo nucleotídico é selecionado do grupo consistindo em 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil, 2'-deoxi, T-deoxi-2'-fluoro, 2'-

O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropil (2'-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietil (2'-O-DMAEOE), 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA) modificado, um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido nucleico de etileno (ENA), um ácido nucleico peptídico (PNA), um ácido nucleico de 1',5'- anidro-hexitol (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo de tiolfosfonato e uma 2'-fluoro N3-P5'-fosforamidita.

97. Ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 92-96, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um promotor.

98. Ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 92-97, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico é um ácido nucleico transcrito *in vitro*.

99. Ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 92-98, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico compreende ainda uma sequência que codifica uma cauda poli(A).

100. Ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 92-99, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico compreende ainda uma sequência 3'UTR.

101. Vetor **caracterizado** pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica uma TFP de acordo com qualquer uma das reivindicações 83-100.

102. Vetor, de acordo com a reivindicação 101, **caracterizado** pelo fato de que o vetor é selecionado do grupo consistindo em um DNA, um RNA, um plasmídeo, um vetor lentiviral, vetor adenoviral, um vetor do vírus do sarcoma de Rous (RSV), ou um vetor retroviral.

103. Vetor, de acordo com a reivindicação 101 ou 102, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um promotor.

104. Vetor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101-103, **caracterizado** pelo fato de que o vetor é um vetor transcrito *in vitro*.

105. Vetor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101-104, **caracterizado** pelo fato de que uma sequência de ácido nucleico no vetor compreende ainda uma cauda poli(A).

106. Vetor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101-105,

caracterizado pelo fato de que uma sequência de ácido nucleico no vetor compreende ainda uma 3'UTR.

107. Célula **caracterizada** pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucleico recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-81, a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 82, a molécula de TFP de acordo com qualquer uma das reivindicações 83-91, o ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 92-100, o vetor de acordo com qualquer uma das reivindicações 101-106.

108. Célula, de acordo com a reivindicação 107, **caracterizada** pelo fato de que a célula é uma célula T humana.

109. Célula, de acordo com a reivindicação 108, **caracterizada** pelo fato de que a célula T é uma célula T CD8+ ou CD4+.

110. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 107-109, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda um ácido nucleico que codifica uma molécula inibidora que compreende um primeiro polipeptídeo que compreende pelo menos uma porção de uma molécula inibidora, associada a um segundo polipeptídeo que compreende um sinal positivo a partir de um domínio de sinalização extracelular.

111. Célula, de acordo com a reivindicação 110, **caracterizada** pelo fato de que a molécula inibidora compreende um primeiro polipeptídeo que compreende pelo menos uma porção de PD1 e um segundo polipeptídeo compreendendo um domínio coestimulador e um domínio de sinalização primário.

112. Célula T CD8+ ou CD4+ humana **caracterizada** pelo fato de que compreende pelo menos duas moléculas de TFP, com as moléculas de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-MUC16, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno em e/ou sobre a superfície da célula T CD8+ ou CD4+.

113. Complexo proteico **caracterizado** pelo fato de que compreende:

i) uma molécula de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-MUC16, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular; e

ii) pelo menos uma subunidade de TCR endógena ou complexo de TCR endógeno.

114. Complexo proteico, de acordo com a reivindicação 113, **caracterizado** pelo fato de que o TCR compreende um domínio extracelular, ou porção deste, de uma proteína selecionada do grupo consistindo em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama e uma subunidade de TCR de CD3 delta.

115. Complexo proteico, de acordo com a reivindicação 113 ou 114, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação anti-MUC16 está conectado ao domínio extracelular de TCR por uma sequência ligante.

116. Complexo proteico, de acordo com a reivindicação 115, **caracterizado** pelo fato de que a região ligante compreende $(G_4S)_n$, em que $n=1$ a 4.

117. Complexo proteico **caracterizado** pelo fato de que compreende
(a) uma TFP codificada pela molécula de ácido nucleico recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-81, e
(b) pelo menos uma subunidade de TCR endógena ou complexo de TCR endógeno.

118. Complexo proteico **caracterizado** pelo fato de que compreende:
i) uma molécula de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-MUC16, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular; e
ii) pelo menos uma subunidade de TCR endógena ou complexo de TCR endógeno.

119. Complexo proteico, de acordo com a reivindicação 118, **caracterizado** pelo fato de que o TCR compreende um domínio extracelular, ou porção deste, de uma proteína selecionada do grupo consistindo em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama e uma subunidade de TCR de CD3 delta.

120. Complexo proteico, de acordo com a reivindicação 118 ou 119, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação anti-MUC16 está conectado

ao domínio extracelular de TCR por uma sequência ligante.

121. Complexo proteico, de acordo com a reivindicação 120, **caracterizado** pelo fato de que a região ligante compreende $(G_4S)_n$, em que $n=1$ a 4.

122. Célula T CD8+ ou CD4+ humana **caracterizada** pelo fato de que compreende pelo menos duas proteínas TFP diferentes pelo complexo proteico de acordo com qualquer uma das reivindicações 113-121.

123. Célula T CD8+ ou CD4+ humana **caracterizada** pelo fato de que compreende pelo menos duas moléculas de TFP diferentes codificadas pela molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-81.

124. População de células T CD8+ ou CD4+ humanas **caracterizada** pelo fato de que as células T da população compreendem, individual ou coletivamente, pelo menos duas moléculas de TFP, com as moléculas de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-MUC16, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno em e/ou sobre a superfície da célula T CD8+ ou CD4+.

125. População de células T CD8+ ou CD4+ humanas **caracterizada** pelo fato de que as células T da população compreendem, individual ou coletivamente, pelo menos duas moléculas de TFP codificadas pela molécula de ácido nucleico recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-81.

126. Método de produção de uma célula **caracterizado** pelo fato de que compreende a transdução de uma célula T com a molécula de ácido nucleico recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-81, o ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 92-100, ou o vetor de acordo com qualquer uma das reivindicações 101-106.

127. Método de geração de uma população de células com RNA modificado, **caracterizado** pelo fato de que compreende a introdução de um RNA transcrito *in vitro* ou RNA sintético em uma célula, onde o RNA compreende um ácido nucleico que codifica a molécula de TFP de acordo com qualquer uma das reivindicações 83-91.

128. Método para proporcionar uma atividade antitumoral em um mamífero, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração, ao mamífero, de uma quantidade eficaz da molécula de ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-81, a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 82, uma célula que expressa a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 82, a molécula de TFP de acordo com qualquer uma das reivindicações 83-91, o ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 92-100, o vetor de acordo com qualquer uma das reivindicações 101-106, ou a célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 107-112 e 122-126.

129. Método, de acordo com a reivindicação 128, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula T autóloga.

130. Método de acordo com a reivindicação 128, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula T alogênica.

131. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 128-130, **caracterizado** pelo fato de que o mamífero é um humano.

132. Método de tratamento de um mamífero com uma doença associada à expressão de MUC16, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração, ao mamífero, de uma quantidade eficaz da molécula de ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-81, a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 82, uma célula que expressa a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 82, a molécula de TFP de acordo com qualquer uma das reivindicações 83-91, o ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 92-100, o vetor de acordo com qualquer uma das reivindicações 101-106, ou a célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 107-112 e 122-125.

133. Método, de acordo com a reivindicação 132, **caracterizado** pelo fato de que a doença associada à expressão de MUC16 é selecionada do grupo consistindo em uma doença proliferativa, um câncer, uma neoplasia maligna, mielodisplasia, uma síndrome mielodisplásica, uma pré-leucemia, uma indicação não relacionada a câncer associada à expressão de MUC16.

134. Método, de acordo com a reivindicação 132, **caracterizado** pelo fato de que a doença é câncer pancreático, câncer de ovário, câncer de mama, ou

quaisquer combinações destes.

135. Método, de acordo com a reivindicação 132, **caracterizado** pelo fato de que as células que expressam uma molécula de TFP são administradas em combinação com um agente que aumenta a eficácia de uma célula que expressa uma molécula de TFP.

136. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 132-135, **caracterizado** pelo fato de que menos citocinas são liberadas no mamífero em comparação a um mamífero ao qual é administrada uma quantidade eficaz de células T que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-MUC16.

137. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 132-136, **caracterizado** pelo fato de que as células que expressam uma molécula de TFP são administradas em combinação com um agente que melhora um ou mais efeitos colaterais associados à administração de uma célula que expressa uma molécula de TFP.

138. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 132-137, **caracterizado** pelo fato de que as células que expressam uma molécula de TFP são administradas em combinação com um agente que trata a doença associada a MUC16.

139. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-81, molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 82, célula que expressa a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 82, TFP recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 83-91, ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 92-100, vetor de acordo com qualquer uma das reivindicações 101-106, complexo de acordo com qualquer uma das reivindicações 113-121, ou célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 107-112 e 122-125, **caracterizados** pelo fato de que são para uso como um medicamento.

140. Método de tratamento de um mamífero com uma doença associada à expressão de MUC16, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração, ao mamífero, de uma quantidade eficaz da molécula de ácido nucleico recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-81, a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 82, uma célula que expressa a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 82, a molécula

de TFP recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 83-91, o ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 92-100, o vetor de acordo com qualquer uma das reivindicações 101-106, ou a célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 107-112 e 122-125, em que menos citocinas são liberadas na mamífero em comparação a um mamífero ao qual é administrado uma quantidade eficaz de uma célula T que expressa um receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-MUC16.

141. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de que compreende

(I) uma célula T de um sujeito humano, em que a célula T compreende uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP) compreendendo

(a) uma subunidade do TCR compreendendo

(i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR,

(ii) um domínio transmembrana de TCR, e

(iii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador proveniente de um domínio de sinalização intracelular; e

(b) um domínio de ligação ao antígeno compreendendo um domínio de ligação anti-IL13R α 2; e

(II) um carreador farmacêuticamente aceitável;

em que a subunidade de TCR e o domínio de ligação anti-IL13R α 2 são operacionalmente ligados;

em que a TFP interage funcionalmente com um TCR quando expressa na célula T.

142. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 141, **caracterizada** pelo fato de que o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR da subunidade de TCR são derivados de uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3 épsilon, CD3 delta ou CD3 gama.

143. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 141, **caracterizado** pelo fato de que o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR da subunidade de TCR são derivados de uma subunidade única de um complexo de TCR, em que a

subunidade única é uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta.

144. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-143, **caracterizada** pelo fato de que a célula T apresenta maior citotoxicidade a uma célula que expressa um antígeno que interage especificamente com o domínio de ligação anti-IL13R α 2 em comparação a uma célula T que não contém a TFP.

145. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-144, **caracterizada** pelo fato de que a sequência que codifica o domínio de ligação anti-IL13R α 2 está conectada à sequência que codifica o domínio extracelular de TCR por uma sequência que codifica um ligante peptídico.

146. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 145, **caracterizado** pelo fato de que o ligante peptídico compreende (G₄S)_n, em que G é glicina, S é serina e n é um número inteiro de 1 a 4.

147. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-146, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação anti-IL13R α 2 compreende

(i) uma sequência de CDR1 de cadeia pesada (HC) GFTSDYYI ou GFASDDYI,

(ii) uma sequência de CDR2 HC ISSKYANT ou ISSRYANT, e

(iii) uma sequência CDR3 HC AADTRRYTCPDIATMHRNFDS ou AMDSRRVTCPEISTMHRNFDS.

148. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-147, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação anti-IL13R α 2 compreende uma sequência tendo pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou 100% de identidade de sequência das SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71 ou SEQ ID NO:76.

149. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 148, **caracterizada** pelo fato de que a identidade de sequência é determinada usando um algoritmo de BLAST com um tamanho de palavra de 6, uma matriz BLOSUM62, uma penalidade de existência de 11 e uma penalidade de extensão de 1.

150. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 141-148, **caracterizada** pelo fato de que a composição farmacêutica é substancialmente livre de soro.

151. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-150, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno é um scFv.

152. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-150, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno é um anticorpo de domínio único.

153. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 152, **caracterizada** pelo fato de que o anticorpo de domínio único é um domínio V_H.

154. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-153, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação anti-IL13R α 2 codificado compreende um domínio de ligação anti-IL13R α 2, e em que as células T têm maior atividade citotóxica ou atividade citotóxica mais eficiente do que as células T CD8⁺ ou CD4⁺ que compreendem um ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) compreendendo (a) o domínio de ligação anti-IL13R α 2, operacionalmente ligado a (b) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de CD28, (c) um domínio transmembrana de CD28, (d) pelo menos uma porção de um domínio intracelular de CD28 e (e) um domínio intracelular zeta de CD3.

155. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-154, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de TFP interage funcionalmente com um complexo de TCR endógeno, pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno, ou uma combinação destes quando expressa na célula T.

156. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-155, **caracterizada** pelo fato de que a célula T é uma célula T primária.

157. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-156, **caracterizada** pelo fato de que a célula T é uma célula T CD4⁺ humana.

158. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-156, **caracterizada** pelo fato de que a célula T é uma célula T CD8⁺ humana.

159. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-158, **caracterizada** pelo fato de que a célula T compreende ainda um ácido nucleico que codifica um primeiro polipeptídeo compreendendo pelo menos uma porção de uma molécula inibidora selecionada do grupo consistindo em PD-1 e BTLA, em que a pelo menos uma porção de uma molécula inibidora está associada a um segundo polipeptídeo compreendendo um sinal positivo a partir de um domínio de sinalização intracelular.

160. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 159, **caracterizada** pelo fato de que o segundo polipeptídeo compreende um domínio coestimulador e um domínio de sinalização primário provenientes de uma proteína selecionada do grupo consistindo em CD28, CD27, ICOS, CD3 ζ , 41-BB, OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160 e B7-H3.

161. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-160, **caracterizada** pelo fato de que a produção de IL-2 ou IFN γ pela célula T aumenta na presença de uma célula que expressa um antígeno que interage especificamente com o domínio de ligação anti-IL13R α 2 em comparação a uma célula T que não contém a TFP.

162. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-161, **caracterizada** pelo fato de que a célula é uma população de células T CD8 $^{+}$ ou CD4 $^{+}$ humanas, em que uma célula T individual da população compreende pelo menos duas moléculas de TFP, ou pelo menos duas células T da população compreendem, coletivamente, pelo menos duas moléculas de TFP; em que as pelo menos duas moléculas de TFP compreendem um domínio de ligação anti-IL13R α 2, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular; e em que pelo menos uma das duas moléculas de TFP interage funcionalmente com um complexo de TCR endógeno, pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno, ou uma combinação destes.

163. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-162, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR é derivada apenas de CD3 épsilon.

164. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-162, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR é

derivada apenas de CD3 gama.

165. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141-162, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR é derivada apenas de CD3 delta.

166. Método para proporcionar uma imunidade antitumoral em um mamífero, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração, ao mamífero, de uma quantidade eficaz de uma população de células T transduzidas com uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

- (a) uma subunidade de TCR compreendendo
 - (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e
 - (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador proveniente de um domínio de sinalização intracelular de TCR; e
- (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação ao antígeno que é um domínio de ligação anti-IL13R α 2;

em que a subunidade de TCR e o domínio do anticorpo estão operacionalmente ligados,

em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T, e em que os níveis mais baixos de citocinas são liberados após o tratamento em comparação com os níveis de citocinas de um mamífero tratado com uma célula CAR-T que compreende o mesmo domínio de anticorpo.

167. Método, de acordo com a reivindicação 166, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de anticorpo é um domínio V_{HH} que tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência indicada na SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71 ou SEQ ID NO:76.

168. Método, de acordo com a reivindicação 167, **caracterizado** pelo fato de que a identidade de sequência é determinada usando um algoritmo de BLAST com um tamanho de palavra de 6, uma matriz BLOSUM62, uma penalidade de existência de 11 e uma penalidade de extensão de 1.

169. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 166-168, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula T autóloga.

170. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 166-168, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula T alogênica.

171. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 166-170, **caracterizado** pelo fato de que o mamífero é um humano.

172. Método de tratamento de um mamífero com uma doença associada à expressão de IL13R α 2, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração, ao mamífero, de uma quantidade eficaz de uma população de células T transduzidas com uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

- (a) uma subunidade de TCR compreendendo
 - (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e
 - (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador proveniente de um domínio de sinalização intracelular de TCR; e
- (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação ao antígeno que é um domínio de ligação anti-IL13R α 2;

em que a subunidade de TCR e o domínio do anticorpo estão operacionalmente ligados,

em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T, e em que os níveis mais baixos de citocinas são liberados após o tratamento em comparação com os níveis de citocinas de um mamífero tratado com uma célula CAR-T que compreende o mesmo domínio de anticorpo.

173. Método, de acordo com a reivindicação 172, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de anticorpo é um domínio V_{HH} que tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência indicada na SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71 ou SEQ ID NO:76.

174. Método, de acordo com a reivindicação 173, **caracterizado** pelo fato de que a identidade de sequência é determinada usando um algoritmo de BLAST com um tamanho de palavra de 6, uma matriz BLOSUM62, uma penalidade de existência de 11 e uma penalidade de extensão de 1.

175. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 172-174,

caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula T autóloga.

176. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 172-174, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula T alogênica.

177. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 166-176, **caracterizado** pelo fato de que a subunidade de TCR da TFP compreende ainda um domínio transmembrana de TCR.

178. Método, de acordo com a reivindicação 177, **caracterizado** pelo fato de que o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR são derivados de uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta.

179. Método, de acordo com a reivindicação 177, **caracterizado** pelo fato de que o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR da subunidade de TCR são derivados de uma subunidade única de um complexo de TCR, em que a subunidade única é uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta.

180. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 166-179, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de sinalização intracelular de TCR é derivado de CD3 épsilon ou CD3 gama.

181. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 172-180, **caracterizado** pelo fato de que a doença associada à expressão de IL13R α 2 é selecionada do grupo consistindo em uma doença proliferativa, um câncer, uma neoplasia maligna e uma indicação não relacionada a câncer associada à expressão de IL13R α 2.

182. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 172-181, **caracterizado** pelo fato de que a doença é um câncer selecionado do grupo consistindo em glioblastoma, mesotelioma, carcinoma de células renais, câncer de estômago, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer ovariano, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer do colo do útero, câncer cerebral, câncer de fígado, câncer pancreático, câncer de tireoide, câncer de bexiga, câncer do ureter, câncer renal, câncer do endométrio, câncer do esôfago, câncer gástrico, carcinoma tímico, colangiocarcinoma, câncer de estômago e qualquer combinação destes.

183. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 172-181, **caracterizado** pelo fato de que a doença é um câncer selecionado do grupo consistindo em glioblastoma, mesotelioma, adenocarcinoma ovariano seroso papilar, carcinoma ovariano de células claras, carcinoma ovariano mulleriano misto, carcinoma ovariano mucinoso endometriode, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma pancreático ductal, carcinoma seroso uterino, adenocarcinoma de pulmão, carcinoma do ducto biliar extra-hepático, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma do esôfago, adenocarcinoma colorretal, adenocarcinoma de mama, uma doença associada à expressão de IL13R α 2, e qualquer combinação destes.

184. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 166-183, **caracterizado** pelo fato de que as células que expressam uma molécula de TFP são administradas em combinação com um agente que aumenta a eficácia de uma célula que expressa uma molécula de TFP.

185. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 166-184, **caracterizado** pelo fato de que, para uma dada citocina, pelo menos 10% a menos da dada citocina é liberado após o tratamento em comparação com uma quantidade da dada citocina de um mamífero tratado com uma célula CAR-T compreendendo o mesmo domínio de anticorpo.

186. Método, de acordo com a reivindicação 185, **caracterizado** pelo fato de que a dada citocina compreende uma ou mais citocinas selecionadas do grupo consistindo em IL-2, IFN- γ , IL-4, TNF- α , IL-6, IL-13, IL-5, IL-10, sCD137, GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , e qualquer combinação destes.

187. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 166-186, **caracterizado** pelo fato de que o crescimento de um tumor no mamífero é inibido de modo que o tamanho do tumor seja no máximo 10%, no máximo 20%, no máximo 30%, no máximo 40%, no máximo 50%, ou no máximo 60% do tamanho de um tumor em um mamífero tratado com células T que não expressam a TFP após pelo menos 8 dias de tratamento, em que o mamífero tratado com células T que expressam a TFP e o mamífero tratado com células T que não expressam a TFP têm o mesmo tamanho tumoral antes do tratamento.

188. Método, de acordo com a reivindicação 187, **caracterizado** pelo fato de que o crescimento tumoral no mamífero é completamente inibido.

189. Método, de acordo com a reivindicação 188, **caracterizado** pelo fato de que o crescimento tumoral no mamífero é completamente inibido por pelo menos 20 dias, pelo menos 30 dias, pelo menos 40 dias, pelo menos 50 dias, pelo menos 60 dias, pelo menos 70 dias, pelo menos 80 dias, pelo menos 90 dias, pelo menos 100 dias, ou mais.

190. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 166-189, **caracterizado** pelo fato de que a população de células T transduzidas com TFP eliminam uma quantidade similar de células tumorais em comparação com as células CAR-T que compreendem o mesmo domínio de anticorpo.

191. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 166-190, **caracterizado** pelo fato de que a população de células T transduzidas com a TFP tem um perfil de expressão gênica diferente das células CAR-T que compreendem o mesmo domínio de anticorpo.

192. Método, de acordo com a reivindicação 191, **caracterizado** pelo fato de que um nível de expressão de um gene é diferente nas células T transduzidas com a TFP em relação a um nível de expressão do gene nas células CAR-T que compreende o mesmo domínio de anticorpo.

193. Método, de acordo com a reivindicação 192, **caracterizado** pelo fato de que o gene tem uma função na apresentação de antígeno, sinalização de TCR, homeostase, metabolismo, sinalização por quimiocina, sinalização por citocina, sinalização por receptor tipo Toll, sinalização por MMP e molécula de adesão, ou sinalização relacionada a TNFR.

194. Molécula de ácido nucleico recombinante **caracterizada** pelo fato de que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

- (a) uma subunidade de TCR compreendendo
 - (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e
 - (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon; e
- (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-IL13R α 2;

em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operacionalmente ligados, e

em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T.

195. Molécula de ácido nucleico recombinante **caracterizada** pelo fato de que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

- (a) uma subunidade de TCR compreendendo
 - (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e
 - (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 gama; e
- (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-IL13R α 2;

em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operacionalmente ligados, e

em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T.

196. Molécula de ácido nucleico recombinante **caracterizada** pelo fato de que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

- (a) uma subunidade de TCR compreendendo
 - (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e
 - (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador a partir de um domínio de sinalização intracelular de CD3 delta; e
- (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-IL13R α 2;

em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operacionalmente ligados, e

em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T.

197. Molécula de ácido nucleico recombinante **caracterizada** pelo fato de que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

- (a) uma subunidade de TCR compreendendo
 - (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e
 - (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador a partir de um domínio de sinalização intracelular de TCR alfa; e
- (b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-

IL13R α 2;

em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operacionalmente ligados, e

em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T.

198. Molécula de ácido nucleico recombinante **caracterizada** pelo fato de que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

(a) uma subunidade de TCR compreendendo

(i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e

(ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador a partir de um domínio de sinalização intracelular de um TCR beta; e

(b) um domínio de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-IL13R α 2;

em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operacionalmente ligados, e

em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T.

199. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-198, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de anticorpo é um domínio de anticorpo humano ou humanizado.

200. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-199, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno codificado está conectado ao domínio extracelular de TCR por uma sequência ligante.

201. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 200, **caracterizada** pelo fato de que a sequência ligante codificada compreende (G₄S)_n, em que n=1 a 4.

202. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-201, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende um domínio extracelular de TCR.

203. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-202, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende um domínio transmembrana de TCR.

204. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 194-203, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade compreende um domínio intracelular de TCR.

205. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-204, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende (i) um domínio extracelular de TCR, (ii) um domínio transmembrana de TCR, e (iii) um domínio intracelular de TCR, em que pelo menos dois dentre (i), (ii) e (iii) são da mesma subunidade de TCR.

206. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-205, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador selecionado dentre um domínio de sinalização intracelular de CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta, ou uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos uma modificação nela.

207. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-206, **caracterizada** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende um domínio intracelular compreendendo um domínio estimulador selecionado dentre um domínio de sinalização funcional de 4-1BB e/ou um domínio de sinalização funcional de CD3 zeta, ou uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos uma modificação nela.

208. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-207, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de anticorpo compreende um fragmento de anticorpo.

209. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-208, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de anticorpo compreende um scFv ou um domínio V_H.

210. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-209, **caracterizada** pelo fato de que codifica

- (i) uma sequência de CDR1 de cadeia pesada (HC) GFTSDYYI ou GFASDDYI,
- (ii) uma sequência de CDR2 HC ISSKYANT ou ISSRYANT, e
- (iii) uma sequência CDR3 HC AADTRRYTCPDIATMHRNFDS ou AMDSRRVTCPEISTMHRNFDS.

211. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 194-210, **caracterizada** pelo fato de que codifica um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência indicada na SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71 ou SEQ ID NO:76.

212. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 211, **caracterizada** pelo fato de que a identidade de sequência é determinada usando um algoritmo de BLAST com um tamanho de palavra de 6, uma matriz BLOSUM62, uma penalidade de existência de 11 e uma penalidade de extensão de 1.

213. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-212, **caracterizada** pelo fato de que a TFP inclui um domínio extracelular de uma subunidade de TCR que compreende um domínio extracelular ou uma porção do mesmo de uma proteína selecionada do grupo consistindo em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, fragmentos funcionais das mesmas e sequências de aminoácidos das mesmas tendo pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações.

214. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-213, **caracterizada** pelo fato de que a TFP codificada inclui um domínio transmembrana que compreende um domínio transmembrana de uma proteína selecionada do grupo consistindo em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, fragmentos funcionais das mesmas e sequências de aminoácidos das mesmas tendo pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações.

215. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-214, **caracterizada** pelo fato de que a TFP codificada inclui um domínio transmembrana que compreende um domínio transmembrana de uma proteína selecionada do grupo consistindo em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia zeta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de

TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, fragmentos funcionais das mesmas e sequências de aminoácidos das mesmas tendo pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações.

216. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-215, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda uma sequência que codifica um domínio coestimulador.

217. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 216, **caracterizada** pelo fato de que o domínio coestimulador é um domínio de sinalização funcional obtido de uma proteína selecionada do grupo consistindo em OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) e 4-1BB (CD137), e sequências de aminoácidos destes tendo pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações nela.

218. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-217, **caracterizada** pelo fato de que a pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações nela compreende uma modificação de um aminoácido que medeia a sinalização celular ou uma modificação de aminoácido que é fosforilado em resposta à ligação de um ligante à TFP.

219. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-218, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de ácido nucleico isolado é mRNA.

220. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-219, **caracterizada** pelo fato de que a TFP inclui um motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM) de uma subunidade de TCR que compreende um ITAM ou porção deste de uma proteína selecionada do grupo consistindo em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama, subunidade de TCR de CD3 delta, cadeia zeta de TCR, cadeia de receptor Fc épsilon 1, cadeia de receptor Fc épsilon 2, cadeia de receptor Fc gama 1, cadeia de receptor Fc gama 2a, cadeia de receptor Fc gama 2b1, cadeia de receptor Fc gama 2b2, cadeia de receptor Fc gama 3a, cadeia de receptor Fc gama 3b, cadeia de receptor Fc beta 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, fragmentos funcionais das mesmas e sequências

de aminoácidos das mesmas tendo pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações nela.

221. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 220, **caracterizada** pelo fato de que o ITAM substitui um ITAM de CD3 gama, CD3 delta ou CD3 épsilon.

222. Molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 221, **caracterizada** pelo fato de que o ITAM é selecionado do grupo consistindo em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama e subunidade de TCR de CD3 delta e substitui um ITAM diferente selecionado do grupo consistindo em subunidade de TCR de CD3 zeta, subunidade de TCR de CD3 épsilon, subunidade de TCR de CD3 gama e subunidade de TCR de CD3 delta.

223. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-222, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende um análogo nucleotídico.

224. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com a reivindicação 223, **caracterizada** pelo fato de que o análogo nucleotídico é selecionado do grupo consistindo em 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil, 2'-deoxi, T-deoxi-2'-fluoro, 2'-O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropil (2'-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloetil (2'-O-DMAEOE), 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA) modificado, um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido nucleico de etileno (ENA), um ácido nucleico peptídico (PNA), um ácido nucleico de 1',5'- anidro-hexitol (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo de tiolfosfonato e uma 2'-fluoro N3-P5'-fosforamidita.

225. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-224, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda uma sequência líder.

226. Molécula de polipeptídeo recombinante **caracterizada** pelo fato de que é codificada pela molécula de ácido nucleico recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-225.

227. Molécula de TFP recombinante **caracterizada** pelo fato de que compreende um domínio de ligação anti-IL13R α 2, um domínio extracelular de TCR,

um domínio transmembrana e um domínio intracelular.

228. Molécula de TFP recombinante **caracterizada** pelo fato de que compreende um domínio de ligação anti-IL13R α 2, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno.

229. Molécula de TFP recombinante **caracterizada** pelo fato de que compreende um domínio de ligação anti-IL13R α 2, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de integrar funcionalmente em um complexo de TCR endógeno.

230. Molécula de TFP recombinante, de acordo com a reivindicação 227, **caracterizada** pelo fato de que compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo compreendendo um domínio de ligação anti-IL13R α 2, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular.

231. Molécula de TFP recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 227-230, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação anti-IL13R α 2 é um scFv, um domínio V_{HH} ou V_H.

232. Molécula de TFP recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 227-231, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação anti-IL13R α 2 compreende uma cadeia pesada com 95-100% de identidade com uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71, ou SEQ ID NO:76, um fragmento funcional da mesma, ou uma sequência de aminoácidos da mesma tendo pelo menos uma, mas não mais de 30 modificações.

233. Molécula de TFP recombinante, de acordo com a reivindicação 232, **caracterizada** pelo fato de que a identidade de sequência é determinada usando um algoritmo de BLAST com um tamanho de palavra de 6, uma matriz BLOSUM62, uma penalidade de existência de 11 e uma penalidade de extensão de 1.

234. Molécula de TFP recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 227-233, **caracterizada** pelo fato de que compreende um domínio extracelular de TCR que compreende um domínio extracelular, ou porção deste, de uma proteína selecionada do grupo consistindo em uma cadeia alfa de TCR, uma

cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama, uma subunidade de TCR de CD3 delta, fragmentos funcionais das mesmas e sequências de aminoácidos das mesmas tendo pelo menos uma, mas não mais de 20 modificações.

235. Molécula de TFP recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 227-234, **caracterizada** pelo fato de que o domínio de ligação anti-IL13R α 2 está conectado ao domínio extracelular de TCR por uma sequência ligante.

236. Molécula de TFP recombinante, de acordo com a reivindicação 235, **caracterizada** pelo fato de que a região ligante compreende (G₄S)_n, em que n=1 a 4.

237. Ácido nucleico **caracterizado** pelo fato de que compreende uma sequência que codifica uma TFP de acordo com qualquer uma das reivindicações 227-236.

238. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 237, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico é selecionado do grupo consistindo em um DNA e um RNA.

239. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 237 ou 238, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico é um mRNA.

240. Ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 237-239, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico compreende um análogo nucleotídico.

241. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 240, **caracterizado** pelo fato de que o análogo nucleotídico é selecionado do grupo consistindo em 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil, 2'-deoxi, T-deoxi-2'-fluoro, 2'-O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropil (2'-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietil (2'-O-DMAEOE), 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA) modificado, um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido nucleico de etileno (ENA), um ácido nucleico peptídico (PNA), um ácido nucleico de 1',5'- anidro-hexitol (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo de tiolfosfonato e uma 2'-fluoro N3-P5'-fosforamidita.

242. Ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 237-241, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um promotor.

243. Ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 237-242, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico é um ácido nucleico transcrito *in vitro*.

244. Ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 237-243, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico compreende ainda uma sequência que codifica uma cauda poli(A).

245. Ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 237-244, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico compreende ainda uma sequência 3'UTR.

246. Vetor **caracterizado** pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica uma TFP de acordo com qualquer uma das reivindicações 227-236.

247. Vetor, de acordo com a reivindicação 246, **caracterizado** pelo fato de que o vetor é selecionado do grupo consistindo em um DNA, um RNA, um plasmídeo, um vetor lentiviral, vetor adenoviral, um vetor do vírus do sarcoma de Rous (RSV), ou um vetor retroviral.

248. Vetor, de acordo com a reivindicação 246 ou 247, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um promotor.

249. Vetor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246-248, **caracterizado** pelo fato de que o vetor é um vetor transcrito *in vitro*.

250. Vetor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246-249, **caracterizado** pelo fato de que uma sequência de ácido nucleico no vetor compreende ainda uma cauda poli(A).

251. Vetor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246-250, **caracterizado** pelo fato de que uma sequência de ácido nucleico no vetor compreende ainda uma 3'UTR.

252. Célula **caracterizada** pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucleico recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-225, a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 226, a molécula de TFP de acordo com qualquer uma das reivindicações 227-236, o ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 237-245, o vetor de acordo com

qualquer uma das reivindicações 246-251.

253. Célula, de acordo com a reivindicação 252, **caracterizada** pelo fato de que a célula é uma célula T humana.

254. Célula, de acordo com a reivindicação 253, **caracterizada** pelo fato de que a célula T humana é uma célula T CD8+ ou CD4+.

255. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 252-254, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda um ácido nucleico que codifica uma molécula inibidora que compreende um primeiro polipeptídeo que compreende pelo menos uma porção de uma molécula inibidora, associada a um segundo polipeptídeo que compreende um sinal positivo a partir de um domínio de sinalização extracelular.

256. Célula, de acordo com a reivindicação 255, **caracterizada** pelo fato de que a molécula inibidora compreende um primeiro polipeptídeo que compreende pelo menos uma porção de PD1 e um segundo polipeptídeo compreendendo um domínio coestimulador e um domínio de sinalização primário.

257. Célula T CD8+ ou CD4+ humana **caracterizada** pelo fato de que compreende pelo menos duas moléculas de TFP, com as moléculas de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-IL13R α 2, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno em e/ou sobre a superfície da célula T CD8+ ou CD4+.

258. Complexo proteico **caracterizado** pelo fato de que compreende:

i) uma molécula de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-IL13R α 2, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular; e

ii) pelo menos uma subunidade de TCR endógena ou complexo de TCR endógeno.

259. Complexo proteico, de acordo com a reivindicação 258, **caracterizado** pelo fato de que o TCR compreende um domínio extracelular, ou porção deste, de uma proteína selecionada do grupo consistindo em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama e uma subunidade de TCR de CD3 delta.

260. Complexo proteico, de acordo com a reivindicação 258 ou 259, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação anti-IL13R α 2 está conectado ao domínio extracelular de TCR por uma sequência ligante.

261. Complexo proteico, de acordo com a reivindicação 260, **caracterizado** pelo fato de que a região ligante compreende (G₄S)_n, em que n=1 a 4.

262. Complexo proteico **caracterizado** pelo fato de que compreende
(a) uma TFP codificada pela molécula de ácido nucleico recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-225, e
(b) pelo menos uma subunidade de TCR endógena ou complexo de TCR endógeno.

263. Complexo proteico **caracterizado** pelo fato de que compreende:
iii) uma molécula de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-IL13R α 2, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular; e
iv) pelo menos uma subunidade de TCR endógena ou complexo de TCR endógeno.

264. Complexo proteico, de acordo com a reivindicação 263, **caracterizado** pelo fato de que o TCR compreende um domínio extracelular, ou porção deste, de uma proteína selecionada do grupo consistindo em uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma subunidade de TCR de CD3 épsilon, uma subunidade de TCR de CD3 gama e uma subunidade de TCR de CD3 delta.

265. Complexo proteico, de acordo com a reivindicação 263 ou 264, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de ligação anti-IL13R α 2 está conectado ao domínio extracelular de TCR por uma sequência ligante.

266. Complexo proteico, de acordo com a reivindicação 265, **caracterizado** pelo fato de que a região ligante compreende (G₄S)_n, em que n=1 a 4.

267. Célula T CD8⁺ ou CD4⁺ humana **caracterizada** pelo fato de que compreende pelo menos duas proteínas TFP diferentes pelo complexo proteico de acordo com qualquer uma das reivindicações 258-266.

268. Célula T CD8⁺ ou CD4⁺ humana **caracterizada** pelo fato de que compreende pelo menos duas moléculas de TFP diferentes codificadas pela

molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-225.

269. População de células T CD8+ ou CD4+ humanas **caracterizada** pelo fato de que as células T da população compreendem, individual ou coletivamente, pelo menos duas moléculas de TFP, com as moléculas de TFP compreendendo um domínio de ligação anti-IL13R α 2, um domínio extracelular de TCR, um domínio transmembrana e um domínio intracelular, em que a molécula de TFP é capaz de interagir funcionalmente com um complexo de TCR endógeno e/ou pelo menos um polipeptídeo de TCR endógeno em e/ou sobre a superfície da célula T CD8+ ou CD4+.

270. População de células T CD8+ ou CD4+ humanas **caracterizada** pelo fato de que as células T da população compreendem, individual ou coletivamente, pelo menos duas moléculas de TFP codificadas pela molécula de ácido nucleico recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-225.

271. Método de produção de uma célula, **caracterizado** pelo fato de que compreende a transdução de uma célula T com a molécula de ácido nucleico recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-225, o ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 237-245, ou o vetor de acordo com qualquer uma das reivindicações 246-251.

272. Método de geração de uma população de células com RNA modificado, **caracterizado** pelo fato de que compreende a introdução de um RNA transcrito *in vitro* ou RNA sintético em uma célula, onde o RNA compreende um ácido nucleico que codifica a molécula de TFP recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 227-236.

273. Método para proporcionar uma imunidade antitumoral em um mamífero, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração, ao mamífero, de uma quantidade eficaz da molécula de ácido nucleico recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-225, a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 226, uma célula que expressa a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 226, a molécula de TFP recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 227-236, o ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 237-245, o vetor de acordo com qualquer uma das reivindicações 246-251, ou a célula de acordo com

qualquer uma das reivindicações 252-257 e 267-270.

274. Método, de acordo com a reivindicação 273, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula T autóloga.

275. Método, de acordo com a reivindicação 273, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula T alogênica.

276. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 273-275, **caracterizado** pelo fato de que o mamífero é um humano.

277. Método de tratamento de um mamífero com uma doença associada à expressão de IL13R α 2, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração, ao mamífero, de uma quantidade eficaz da molécula de ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-225, a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 226, uma célula que expressa a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 226, a molécula de TFP recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 227-236, o ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 237-245, o vetor de acordo com qualquer uma das reivindicações 246-251, ou a célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 252-257 e 267-270.

278. Método, de acordo com a reivindicação 277, **caracterizado** pelo fato de que a doença associada à expressão de IL13R α 2 é selecionada do grupo consistindo em uma doença proliferativa, um câncer, uma neoplasia maligna, mielodisplasia, uma síndrome mielodisplásica, uma pré-leucemia, uma indicação não relacionada a câncer associada à expressão de IL13R α 2.

279. Método, de acordo com a reivindicação 277, **caracterizado** pelo fato de que a doença é câncer pancreático, câncer de ovário, câncer de mama, ou quaisquer combinações destes.

280. Método, de acordo com a reivindicação 277, **caracterizado** pelo fato de que as células que expressam uma molécula de TFP são administradas em combinação com um agente que aumenta a eficácia de uma célula que expressa uma molécula de TFP.

281. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 277-280, **caracterizado** pelo fato de que menos citocinas são liberadas no mamífero em comparação a um mamífero ao qual é administrada uma quantidade eficaz de células T que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-IL13R α 2.

282. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 277-281, **caracterizado** pelo fato de que as células que expressam uma molécula de TFP são administradas em combinação com um agente que melhora um ou mais efeitos colaterais associados à administração de uma célula que expressa uma molécula de TFP.

283. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 277-282, **caracterizado** pelo fato de que as células que expressam uma molécula de TFP são administradas em combinação com um agente que trata a doença associada a IL13R α 2.

284. Molécula de ácido nucleico recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-225, molécula de polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 226, célula que expressa a molécula de polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 226, TFP recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 227-236, ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 237-245, vetor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246-251, complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 258-266, ou célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 252-257 e 267-270, **caracterizados** pelo fato de que é para uso como um medicamento.

285. Método de tratamento de um mamífero com uma doença associada à expressão de IL13R α 2, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração, ao mamífero, de uma quantidade eficaz da molécula de ácido nucleico recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-225, a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 226, uma célula que expressa a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 226, a molécula de TFP recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 227-236, o ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 237-245, o vetor de acordo com qualquer uma das reivindicações 246-251, ou a célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 252-257 e 267-270, em que menos citocinas são liberadas no mamífero em comparação com um mamífero ao qual é administrada uma quantidade eficaz de uma célula T que expressa um receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-IL13R α 2.

286. Método de tratamento de um mamífero com um tumor sólido que compreende as células que expressam IL13R α 2, sendo o método **caracterizado**

pelo fato de que compreende a administração, ao mamífero, de uma quantidade eficaz da molécula de ácido nucleico recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 194-225, a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 226, uma célula que expressa a molécula de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 226, a molécula de TFP recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 227-236, o ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 237-245, o vetor de acordo com qualquer uma das reivindicações 246-251, ou a célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 252-257 e 267-270, em que o volume tumoral é reduzido ou o crescimento tumoral é inibido.

287. Método para proporcionar uma imunidade antitumoral em um mamífero, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração, ao mamífero, de uma quantidade eficaz de uma população de células T transduzidas com uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma proteína de fusão de receptor de células T (TCR) (TFP), compreendendo

(a) uma subunidade de TCR compreendendo

- (i) pelo menos uma porção de um domínio extracelular de TCR, e
- (ii) um domínio intracelular de TCR compreendendo um domínio estimulador a partir de um domínio de sinalização intracelular; e

(b) um domínio de anticorpo humano ou humanizado compreendendo um domínio de ligação ao antígeno que é um domínio de ligação anti-mesotelina; em que a subunidade de TCR e o domínio de anticorpo estão operacionalmente ligados, em que a TFP se incorpora a um TCR quando expressa em uma célula T, e em que a população de células T elimina, preferencialmente, células tumorais com maior expressão de mesotelina em comparação a células tumorais com menor expressão de mesotelina.

288. Método, de acordo com a reivindicação 287, **caracterizado** pelo fato de que a subunidade de TCR compreende ainda um domínio transmembrana de TCR.

289. Método, de acordo com a reivindicação 287 ou 288, **caracterizado** pelo fato de que o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR são derivados de uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3

épsilon, CD3 gama ou CD3 delta.

290. Método, de acordo com a reivindicação 287 ou 288, **caracterizado** pelo fato de que o domínio extracelular de TCR, o domínio transmembrana de TCR e o domínio intracelular de TCR da subunidade de TCR são derivados de uma subunidade única de um complexo de TCR, em que a subunidade única é uma cadeia alfa de TCR, uma cadeia beta de TCR, uma cadeia gama de TCR, uma cadeia delta de TCR, CD3 épsilon, CD3 gama ou CD3 delta.

291. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 287-290, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de sinalização intracelular de TCR é derivado de CD3 épsilon ou CD3 gama.

Clone 1 de IL13Ra2

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYIIGWFRQAPGKEREGVSCISSKYANFYADSVKGRFTQSRGAAKNTVYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIA~~TMHRNFD~~SGCGTQVTVSS - parental
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYIIMGWFRQAPGKLEWVSCISSKYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIA~~TMHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v10
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYIIMGWFRQAPGKLEWVSCISSKYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIA~~TMHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v9
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYIIMGWFRQAPGKLEGVSCISSKYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIA~~TMHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v8
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYIIMGWFRQAPGKLEGVSCISSKYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIA~~TMHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v7
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYIIMGWFRQAPGKLEGVSCISSKYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIA~~TMHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v6
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYIIMGWFRQAPGKLEGVSCISSKYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIA~~TMHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v5
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYIIMGWFRQAPGKLEGVSCISSKYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIA~~TMHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v4
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYIIMGWFRQAPGKLEGVSCISSKYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIA~~TMHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v3
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYIIMGWFRQAPGKLEGVSCISSKYANFYADSVKGRFTQSRGNAKNTVYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIA~~TMHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYIIMGWFRQAPGKLEGVSCISSKYANFYADSVKGRFTQSRGNAKNTVYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIA~~TMHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v1

Clone 2 de IL13Ra2

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFA~~SDDY~~IIGWFRQAPGKEREGVSCISSRYANFYADSVKGRFISRGTA~~NT~~VYLQMSALRPEDTAVYYCANDSRRVTCPELST~~MHRNFD~~SGCGTQVTVSS - parental
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFA~~SDDY~~IIMGWFRQAPGKLEWVSCISSRYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCANDSRRVTCPELST~~MHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v10
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFA~~SDDY~~IIMGWFRQAPGKLEWVSCISSRYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCANDSRRVTCPELST~~MHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v9
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFA~~SDDY~~IIMGWFRQAPGKLEGVSCISSRYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCANDSRRVTCPELST~~MHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v8
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFA~~SDDY~~IIMGWFRQAPGKLEGVSCISSRYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCANDSRRVTCPELST~~MHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v7
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFA~~SDDY~~IIMGWFRQAPGKLEGVSCISSRYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCANDSRRVTCPELST~~MHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v6
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFA~~SDDY~~IIMGWFRQAPGKLEGVSCISSRYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCANDSRRVTCPELST~~MHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v5
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFA~~SDDY~~IIMGWFRQAPGKLEGVSCISSRYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCANDSRRVTCPELST~~MHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v4
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFA~~SDDY~~IIMGWFRQAPGKLEGVSCISSRYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCANDSRRVTCPELST~~MHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v3
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFA~~SDDY~~IIMGWFRQAPGKLEGVSCISSRYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSALRPEDTAVYYCANDSRRVTCPELST~~MHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFA~~SDDY~~IIMGWFRQAPGKLEGVSCISSRYANFYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSALRPEDTAVYYCANDSRRVTCPELST~~MHRNFD~~SGCGTQVTVSS - v1

CDRs estão em preto **italico** sublinhado
 Constante, regiões de framework estão em cinza
 Mutações de humanização em regiões constantes estão em preto **negrito**

FIGURA. 1

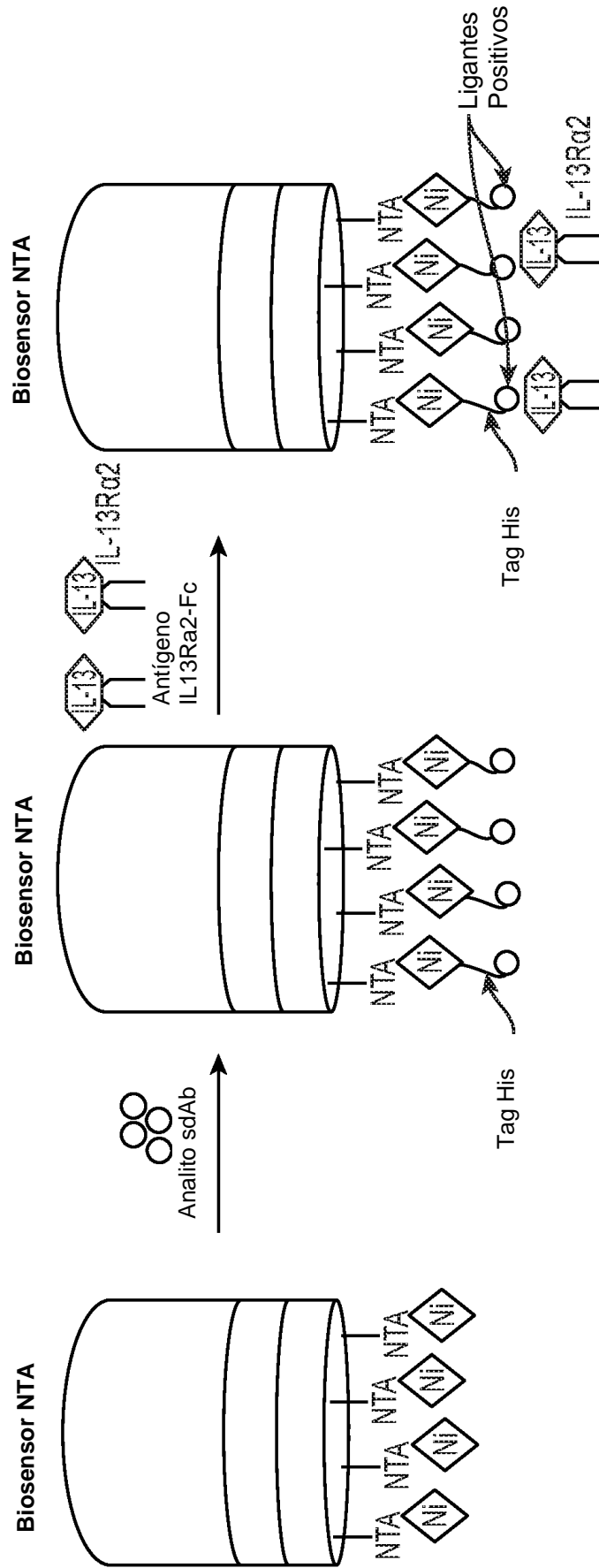


FIGURA. 2

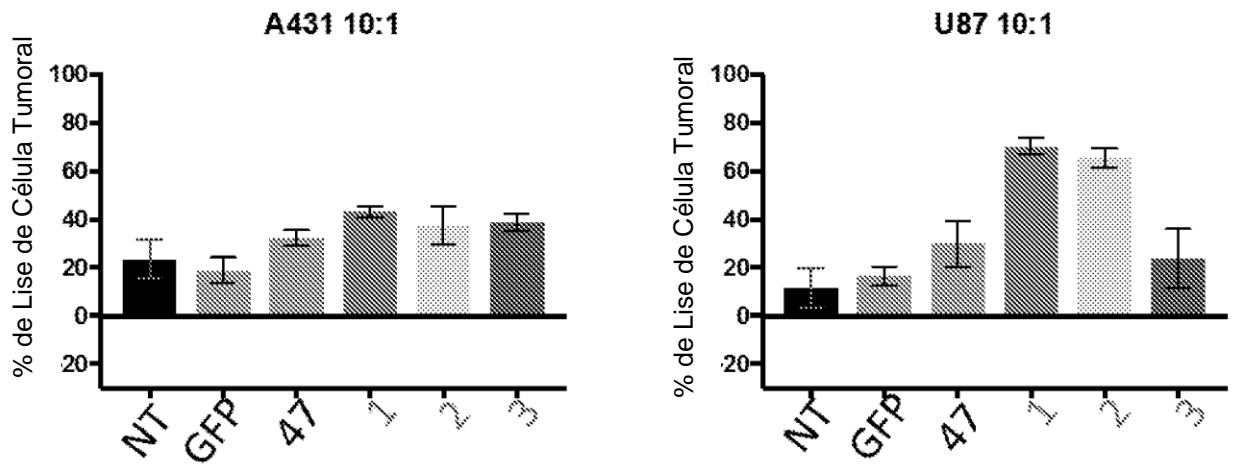


FIGURA. 3A

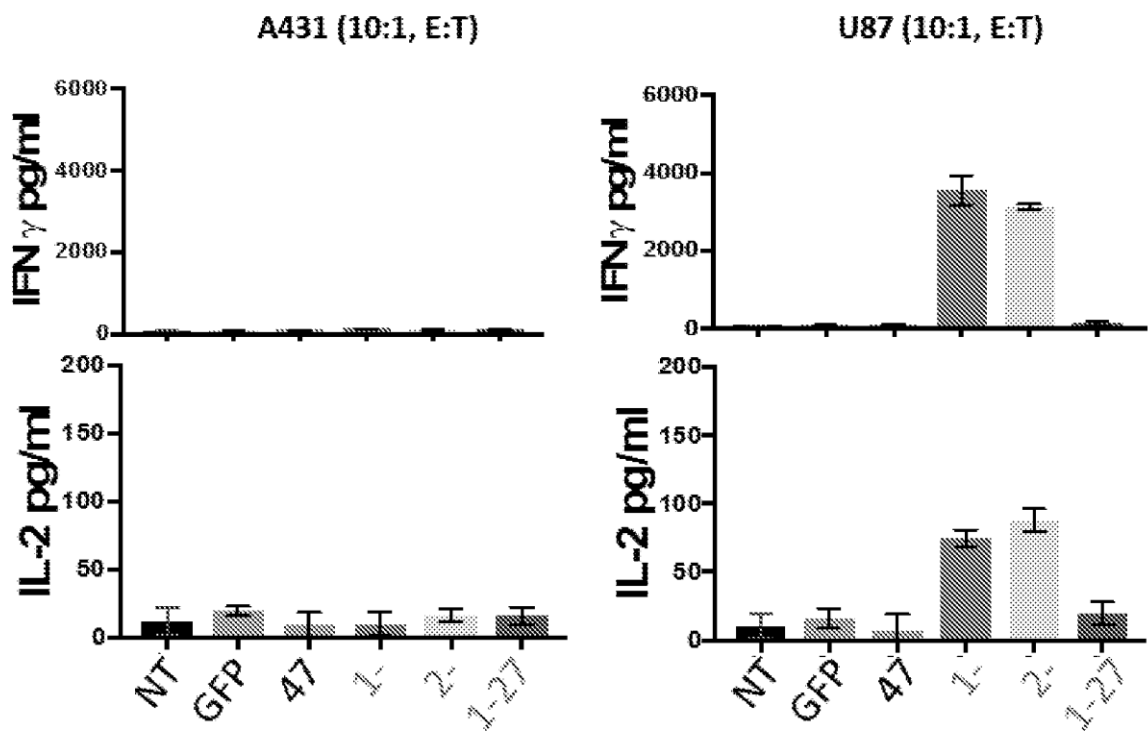


FIGURA. 3B

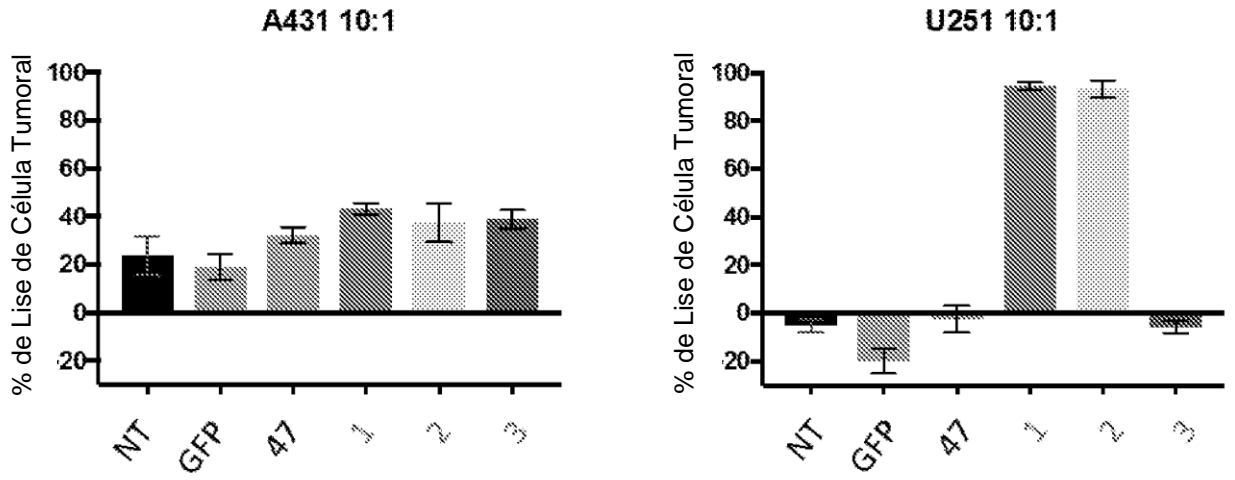


FIGURA. 3C

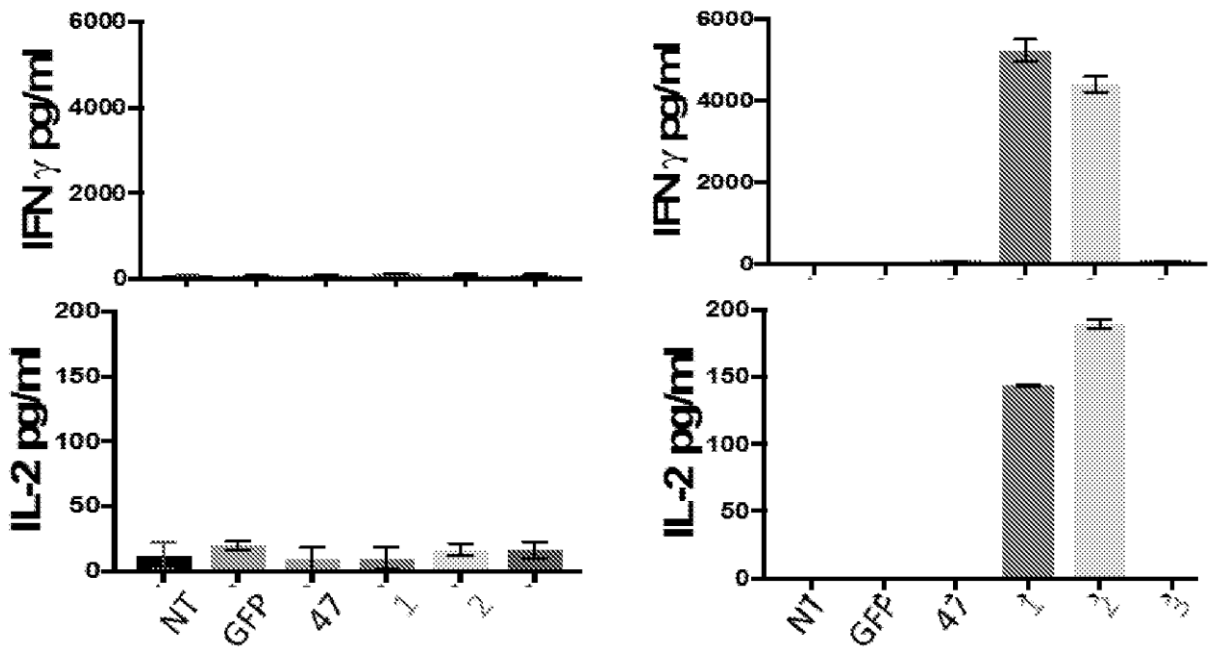


FIGURA. 3D

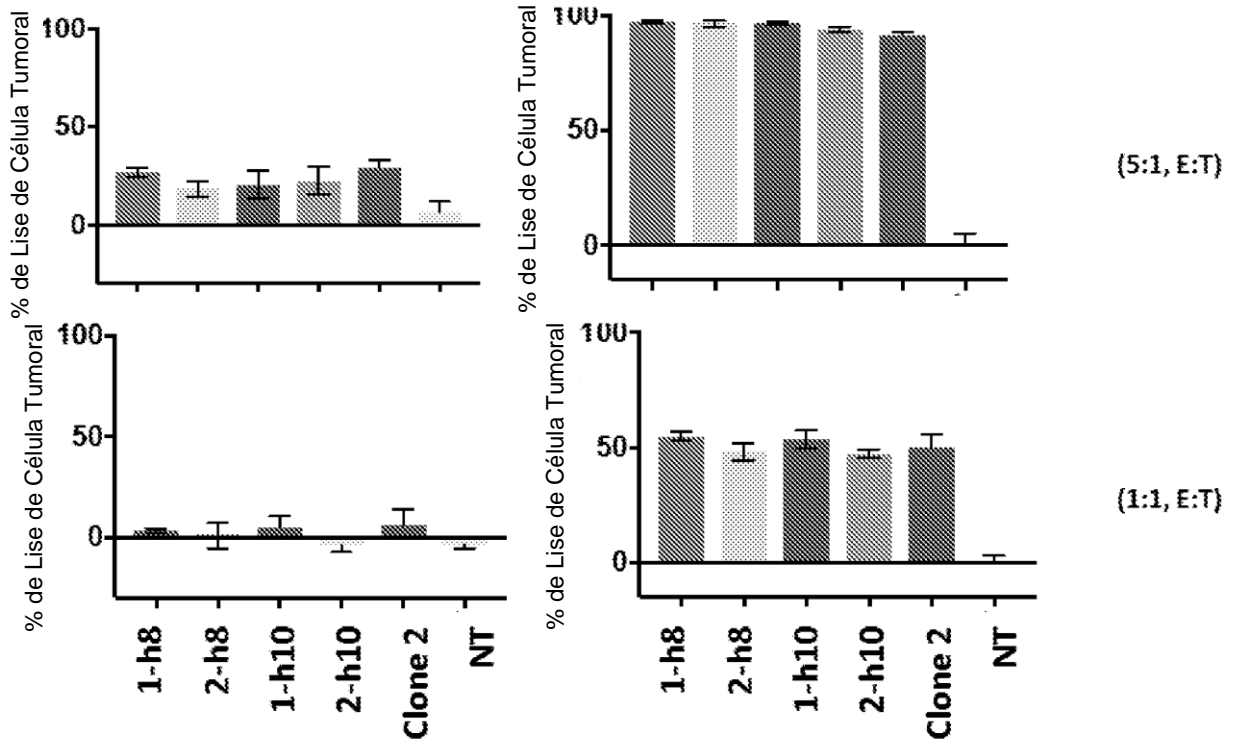


FIGURA. 3E

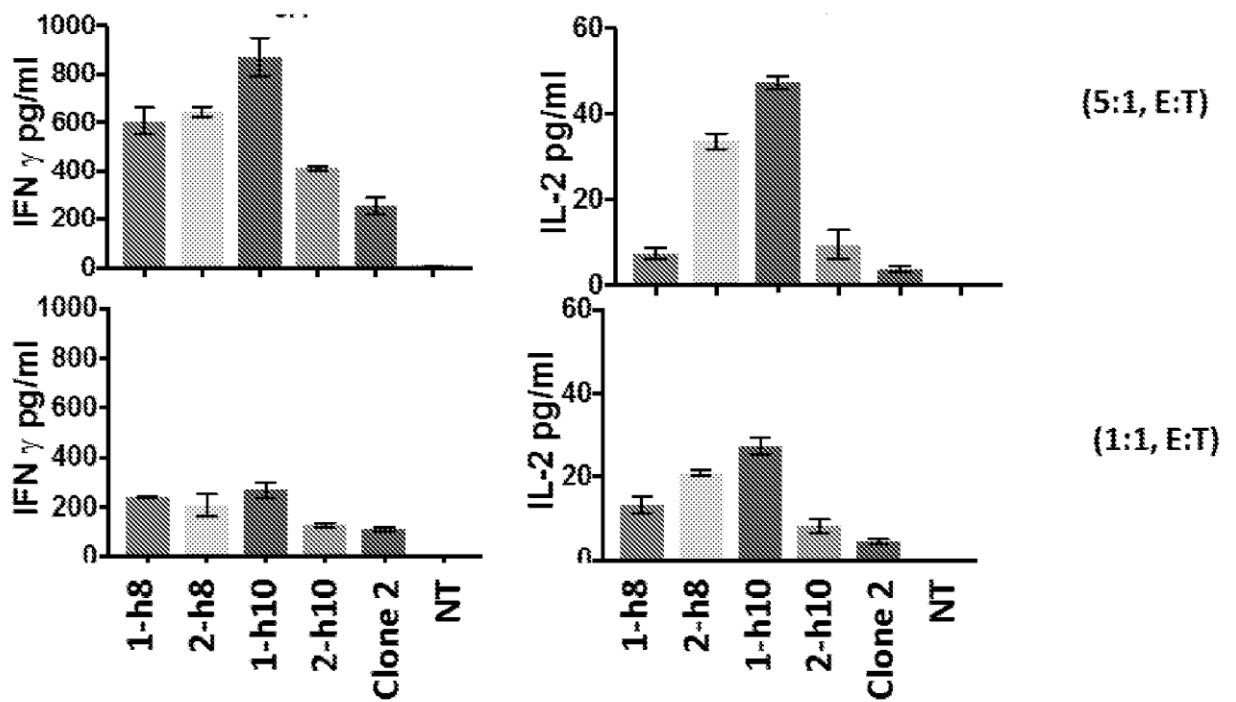


FIGURA. 3F

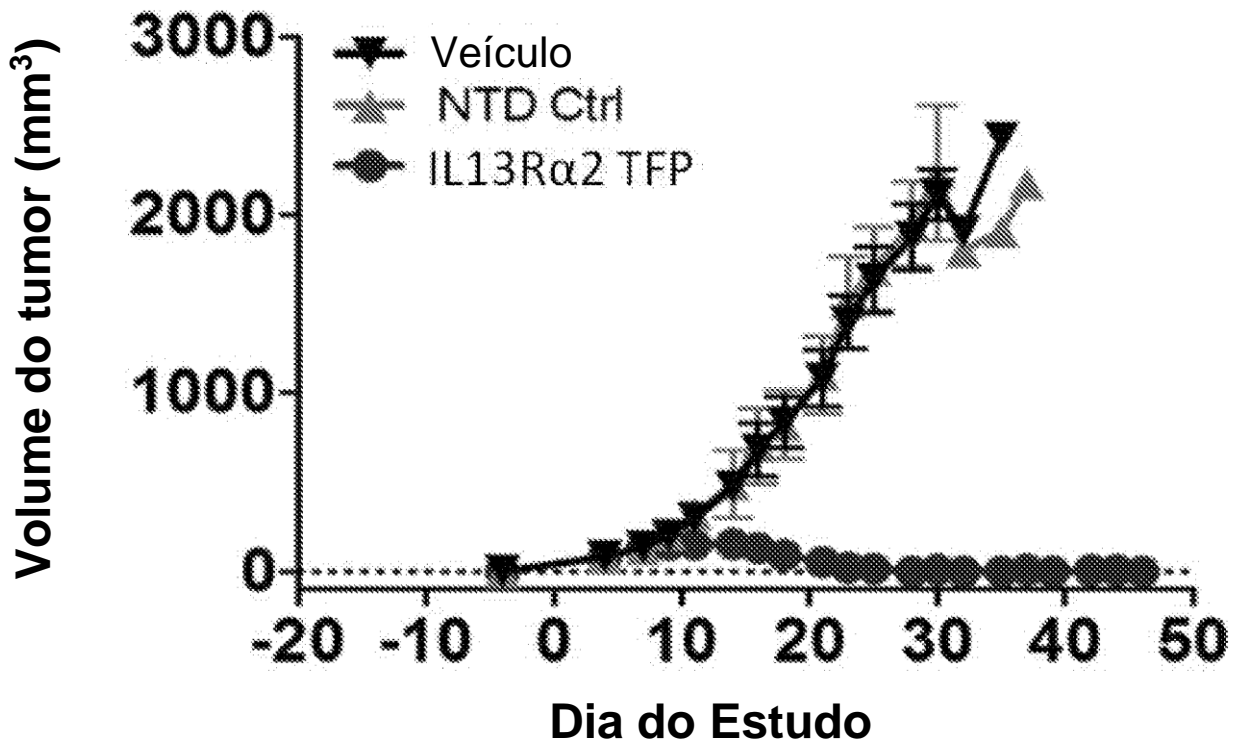


FIGURA. 4

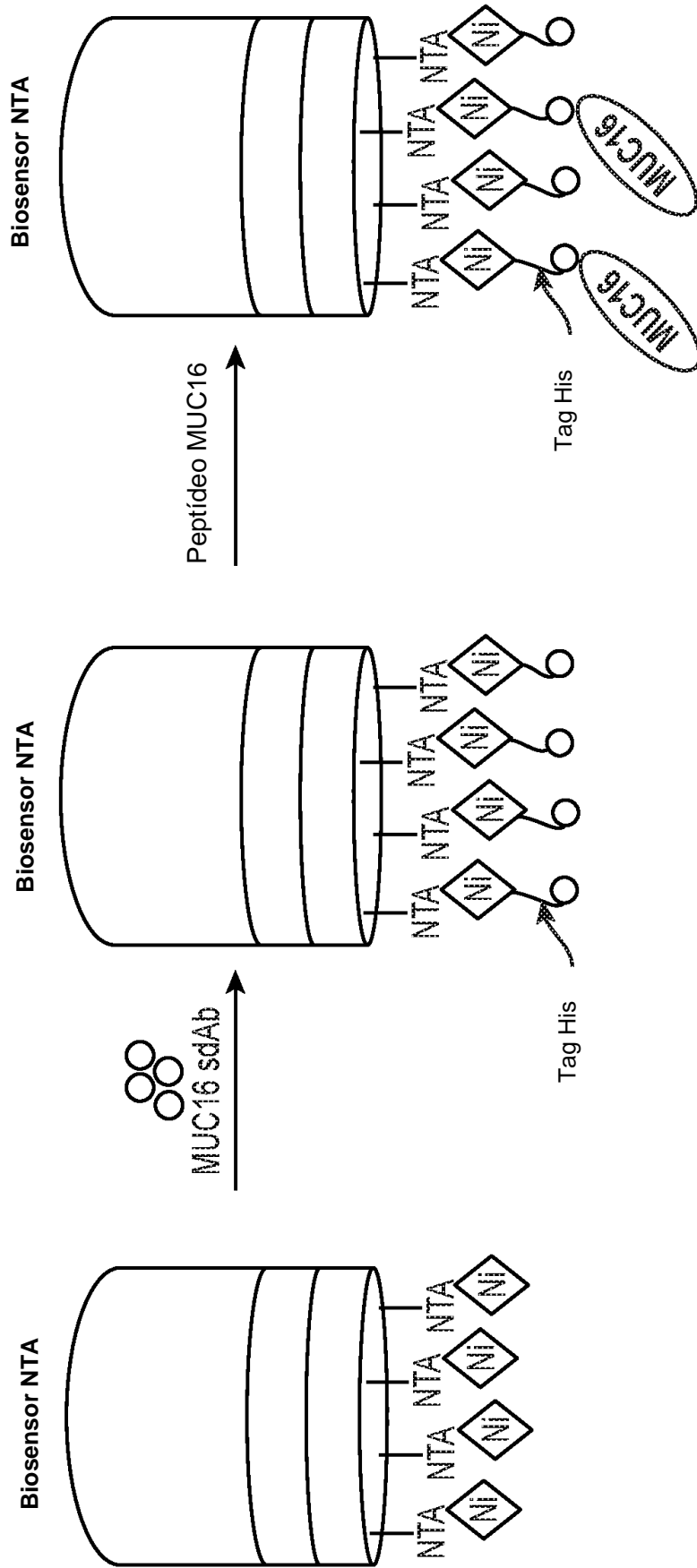


FIGURA. 5A

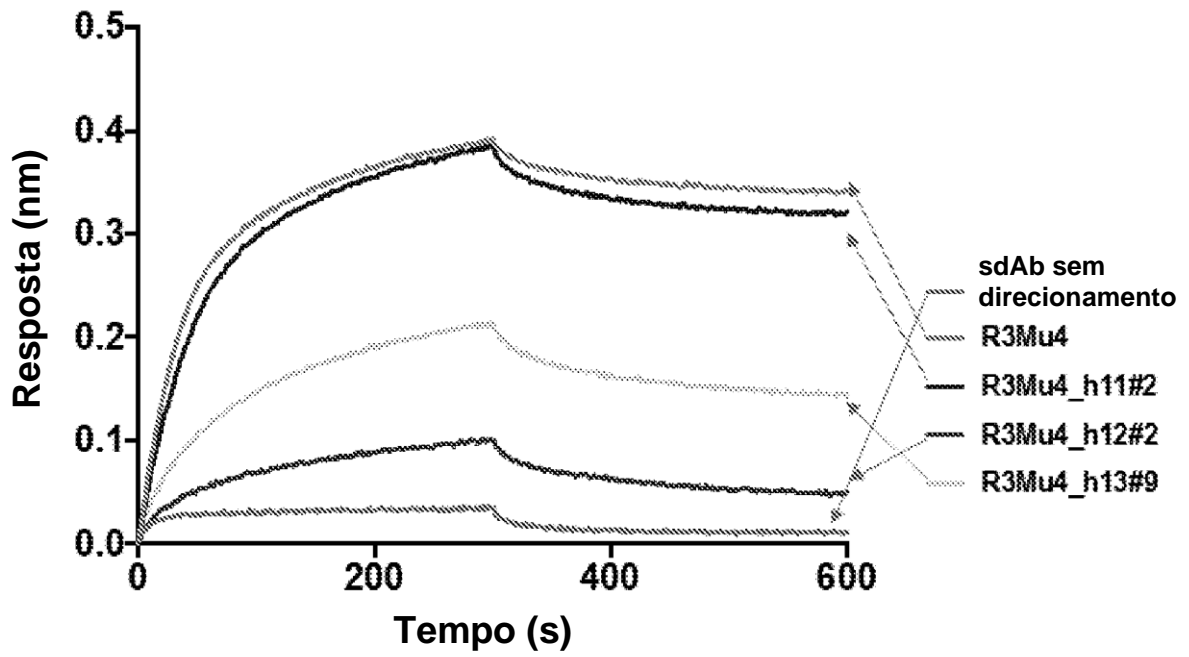


FIGURA. 5B

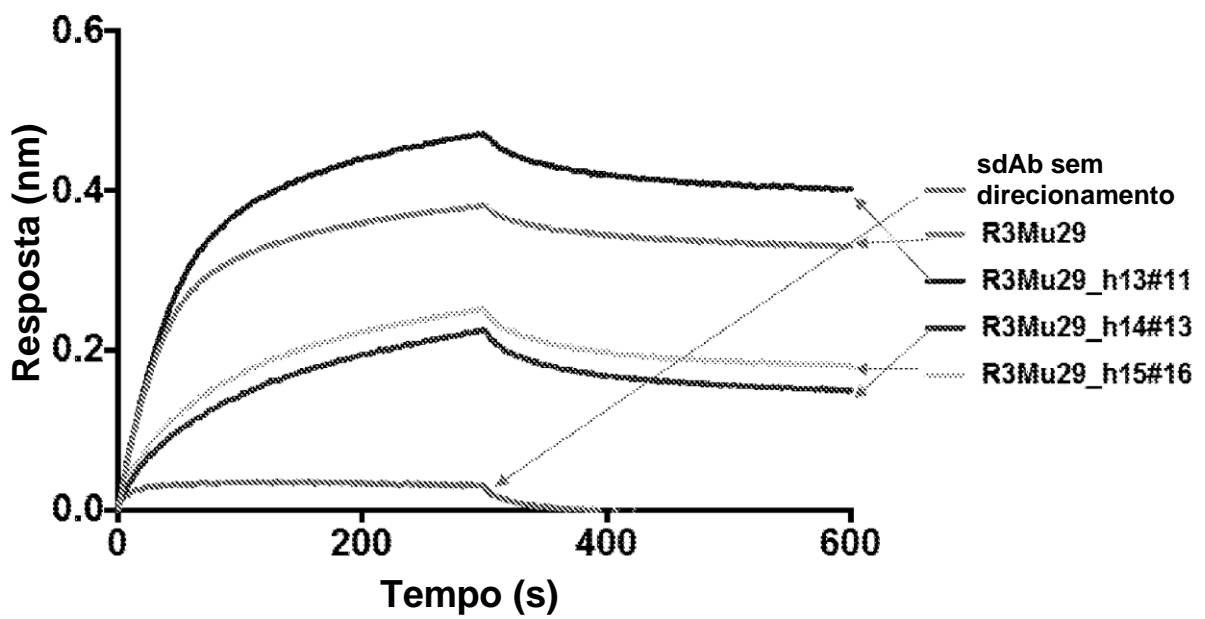


FIGURA. 5C

B: Ensaio em Sanduíche Clássico

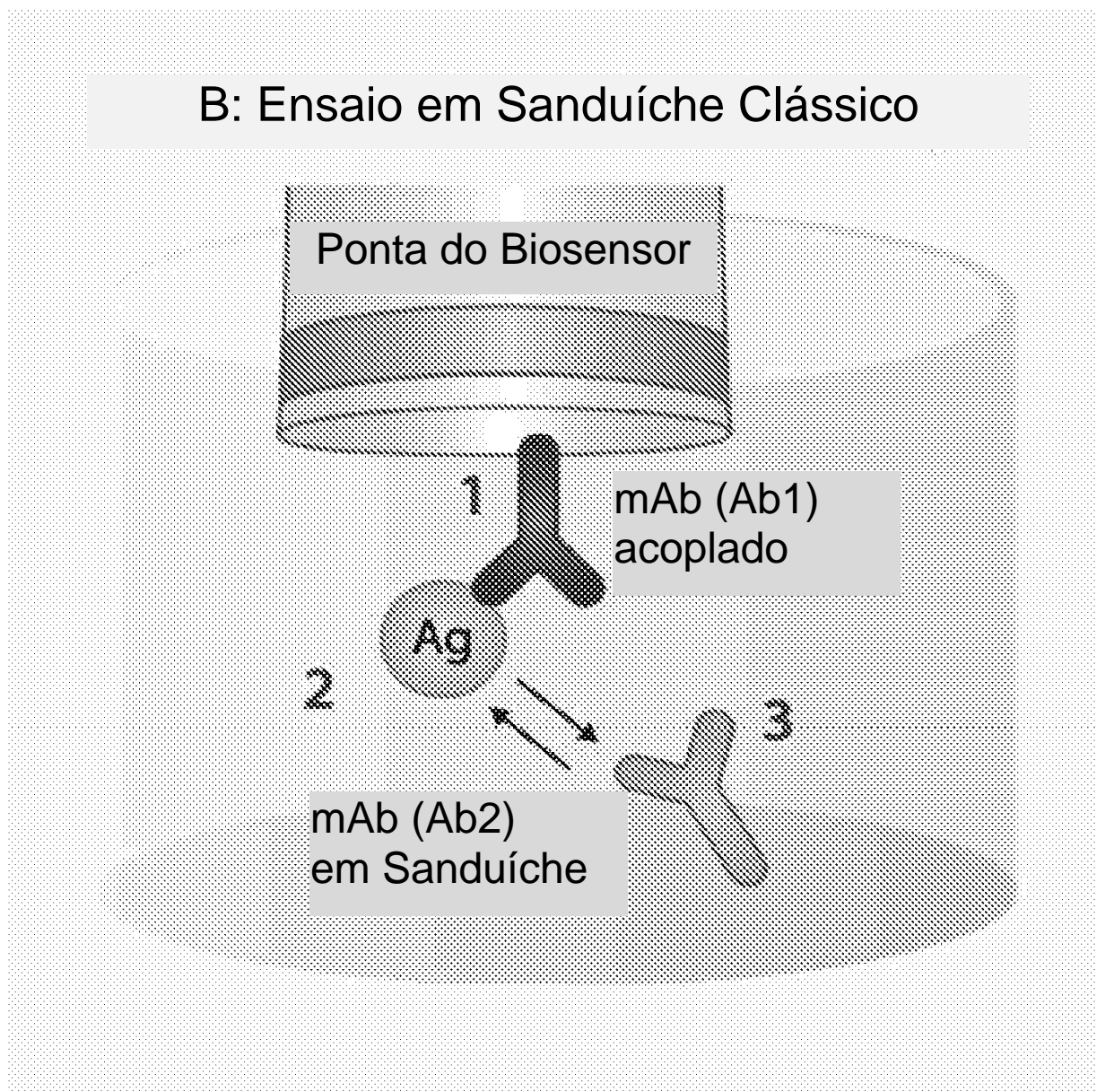


FIGURA. 6A

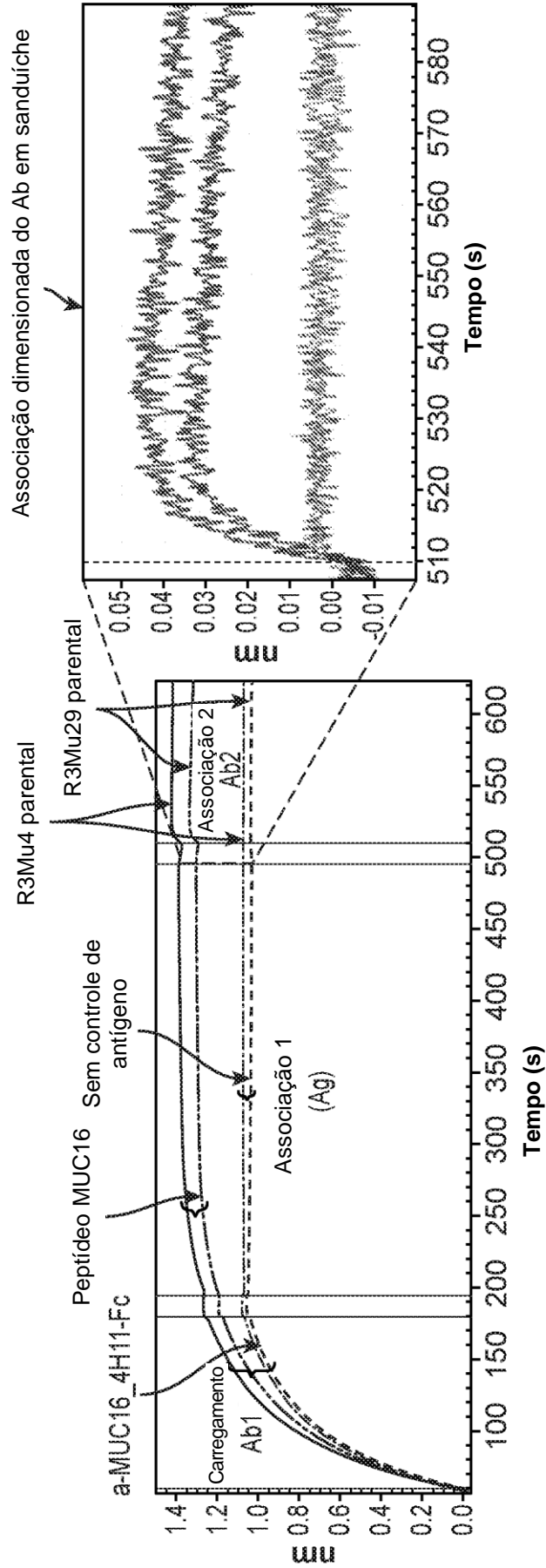


FIGURA. 6B

Peptídeo do Ectodomínio MUC16



FIGURA. 6C

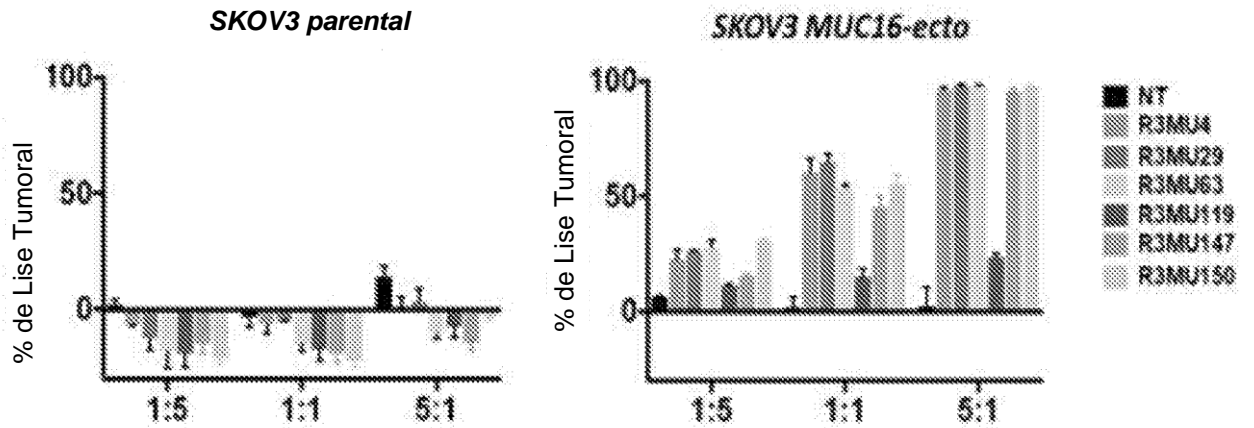


FIGURA. 7

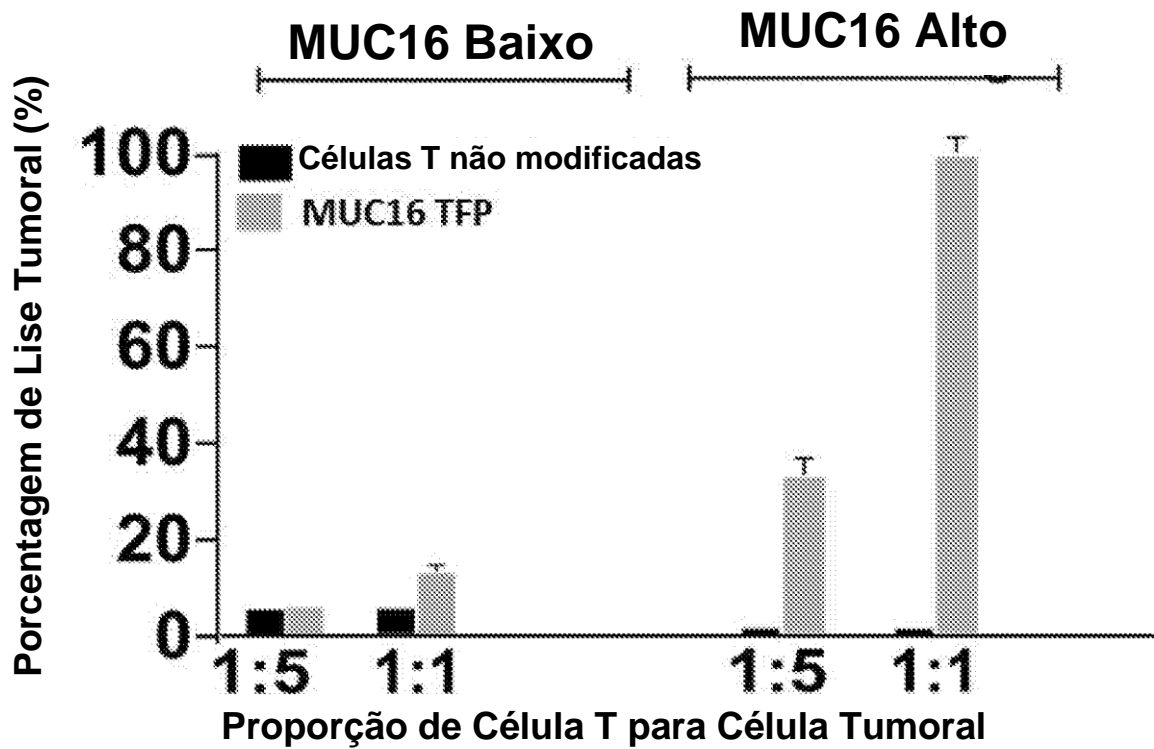


FIGURA. 8

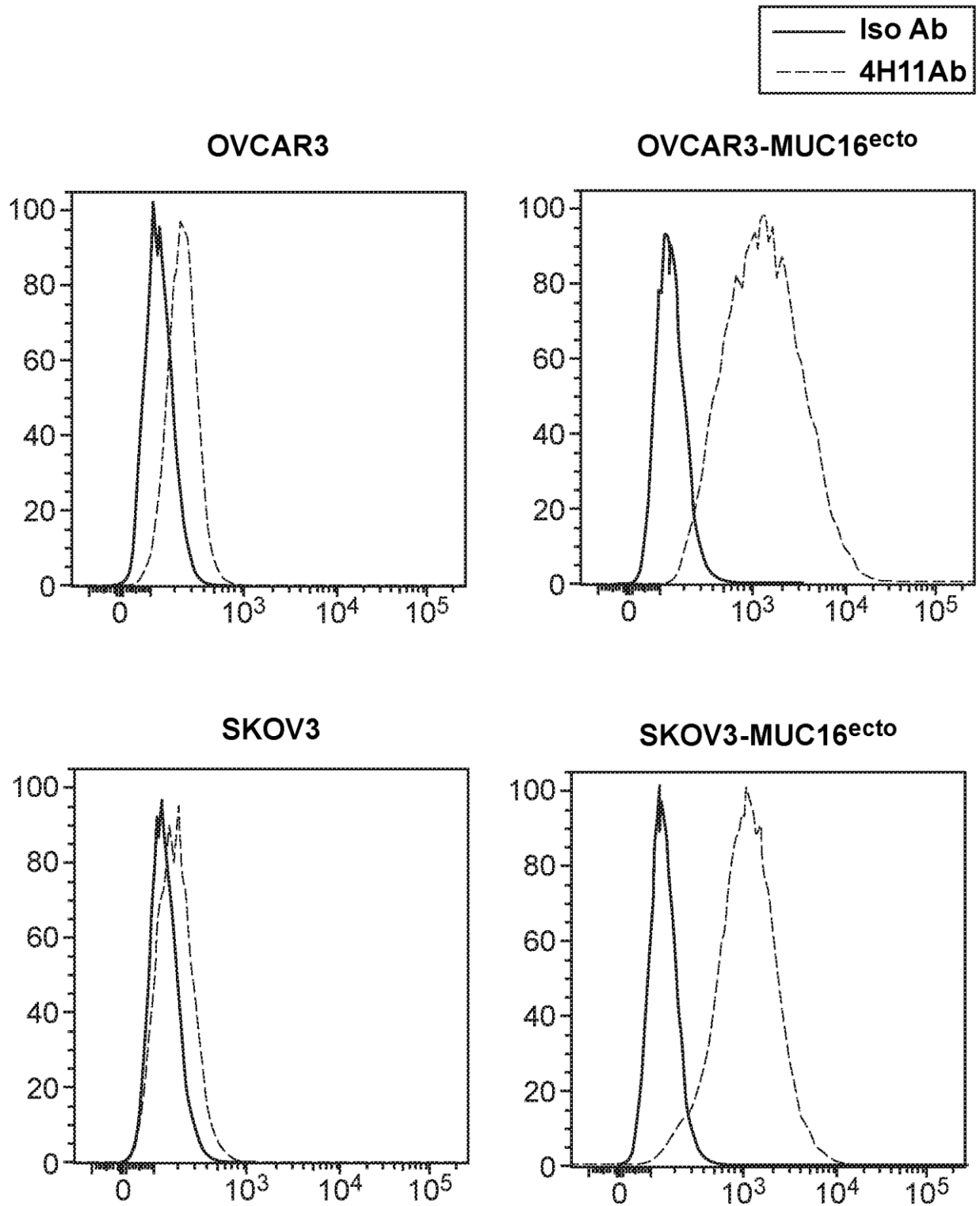


FIGURA. 9A

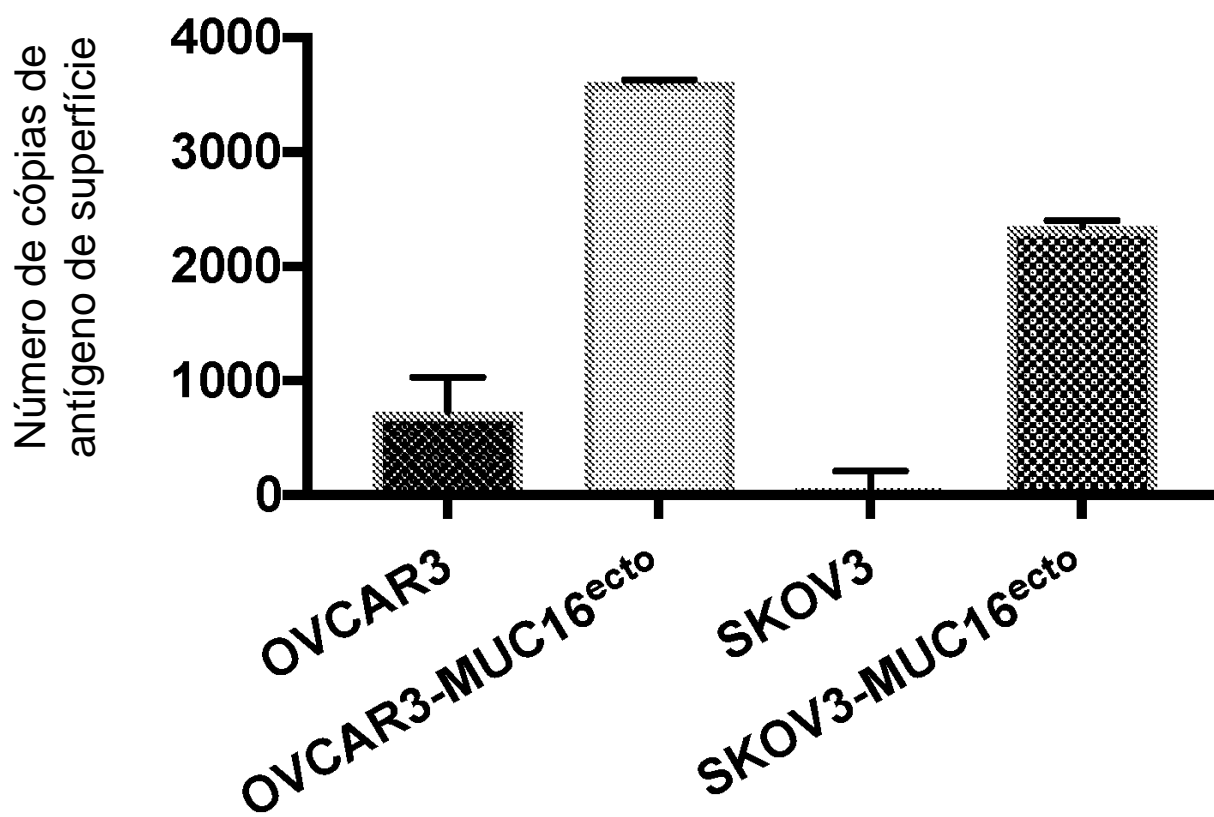


FIGURA. 9B

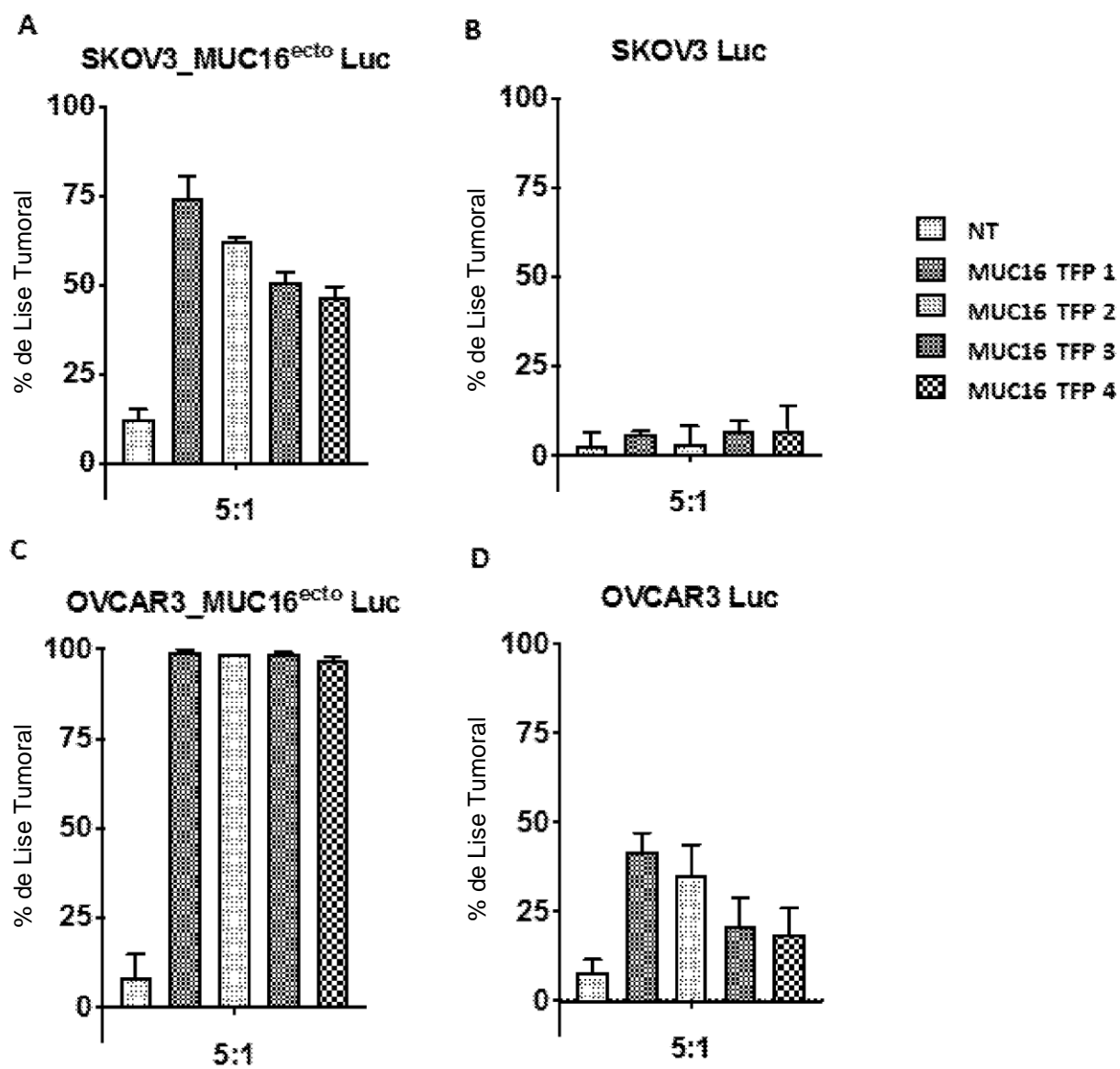


FIGURA. 10A-D

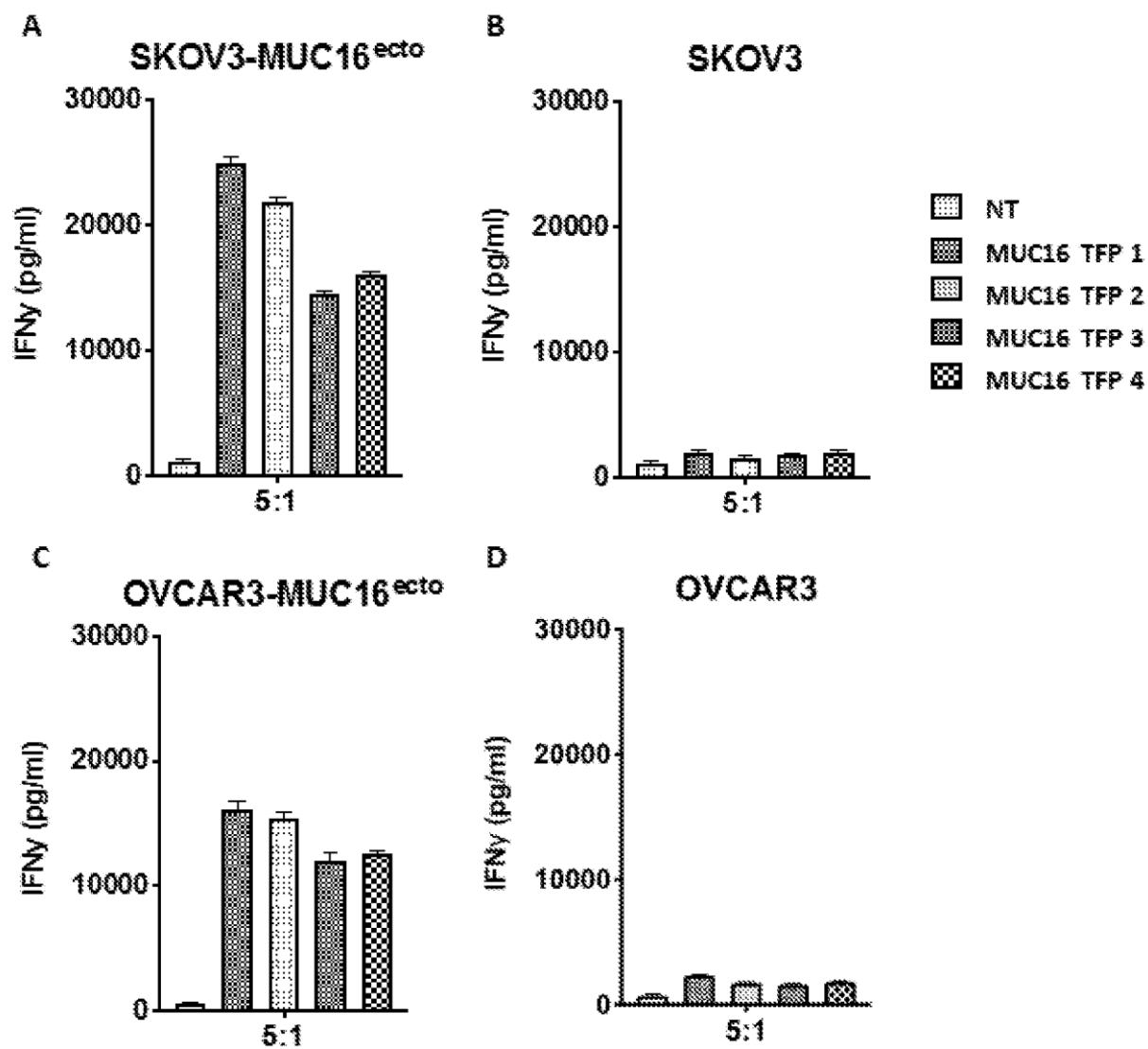


FIGURA. 11A-D

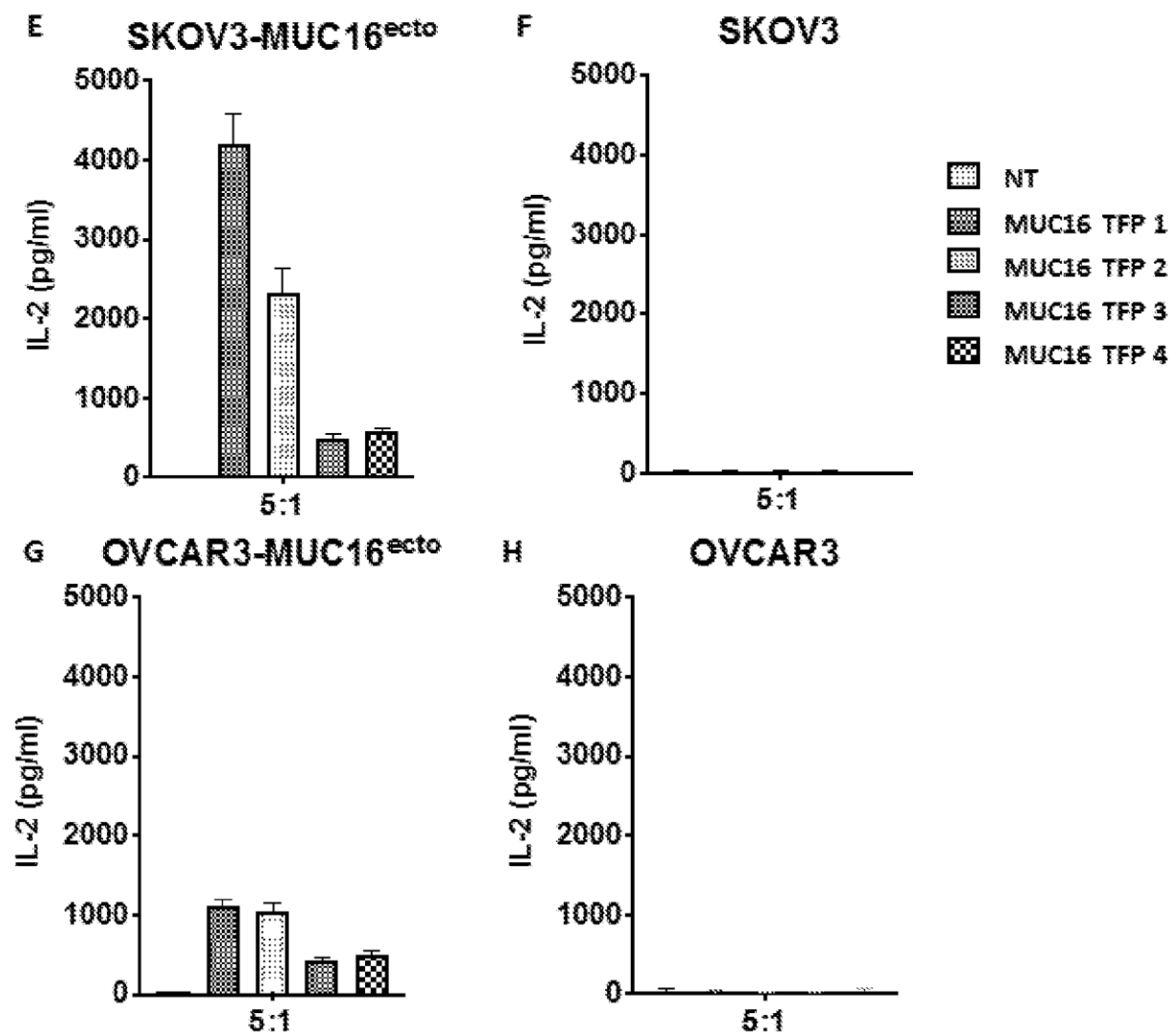
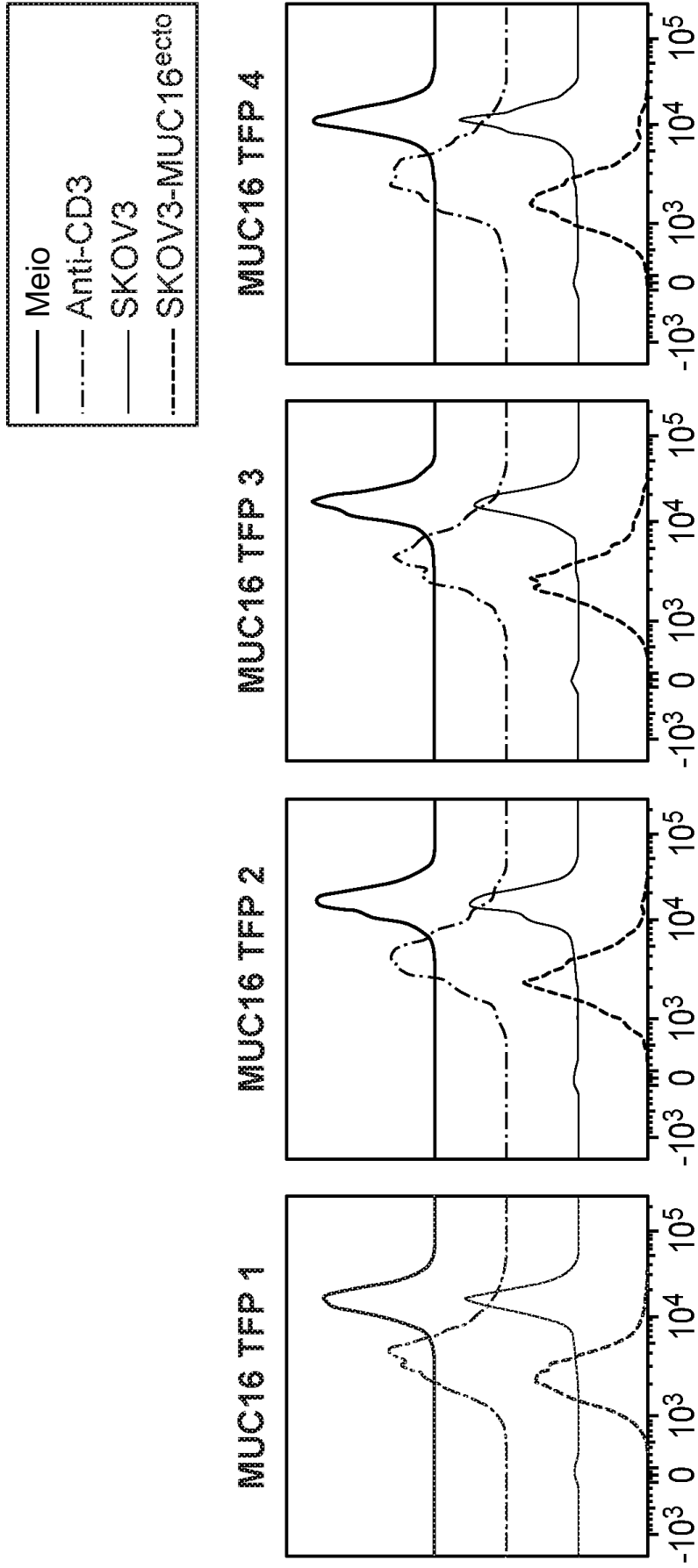
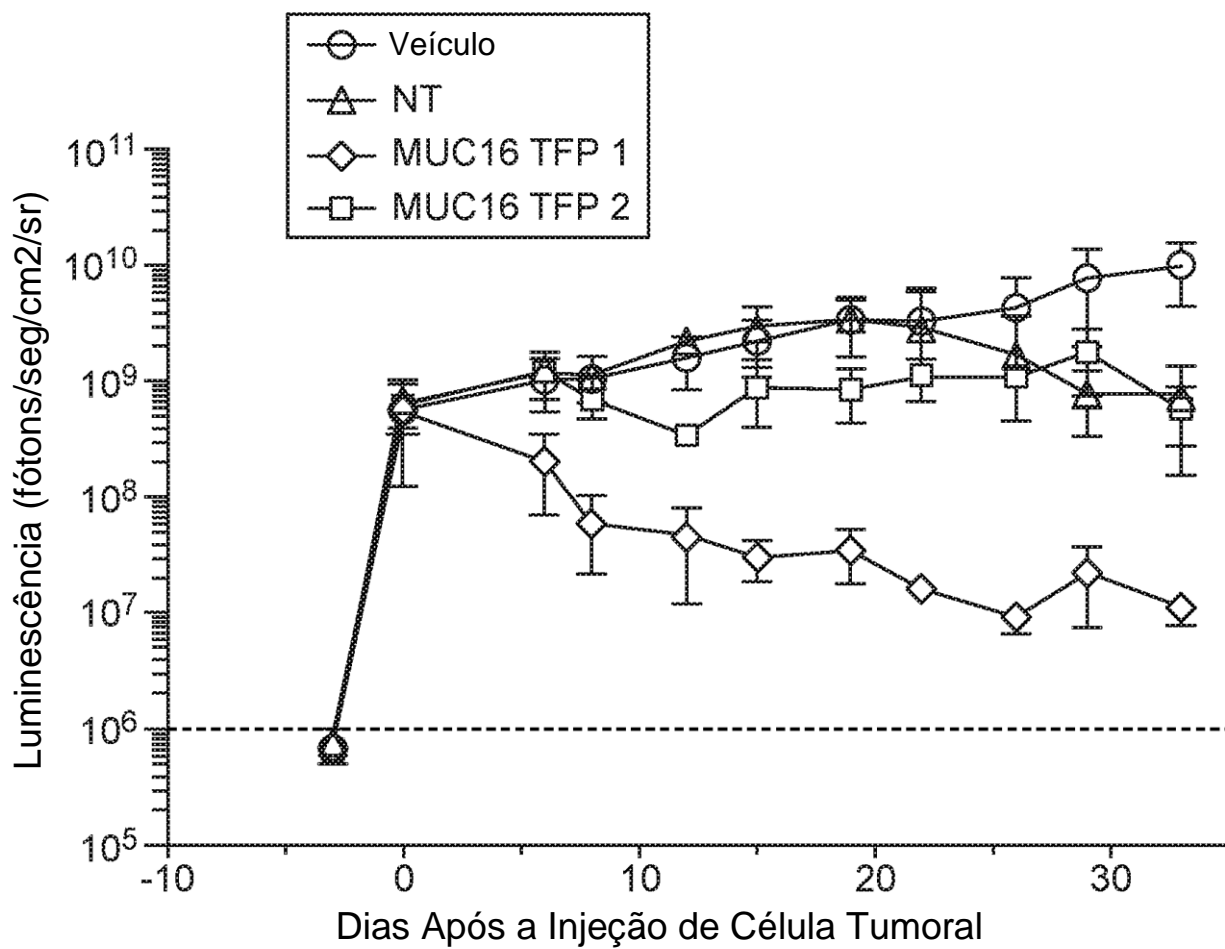


FIGURA. 11E-H



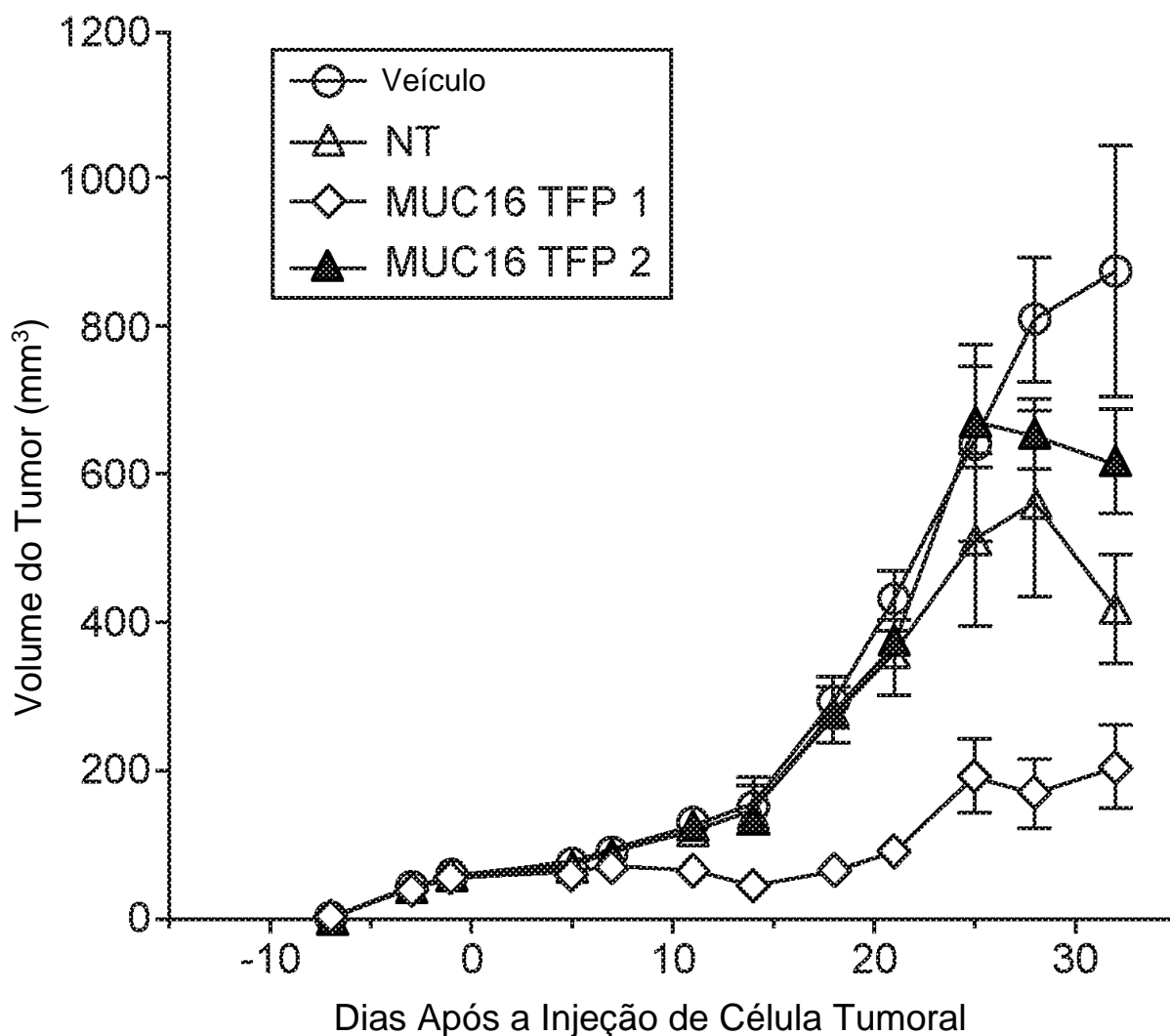
→ Corante de marcação de célula Far Red

FIGURA. 12



SKOV3-MUC16^{ecto}, i.p.

FIGURA. 13A



SKOV3-MUC16^{ecto}, s.c.

FIGURA. 13B

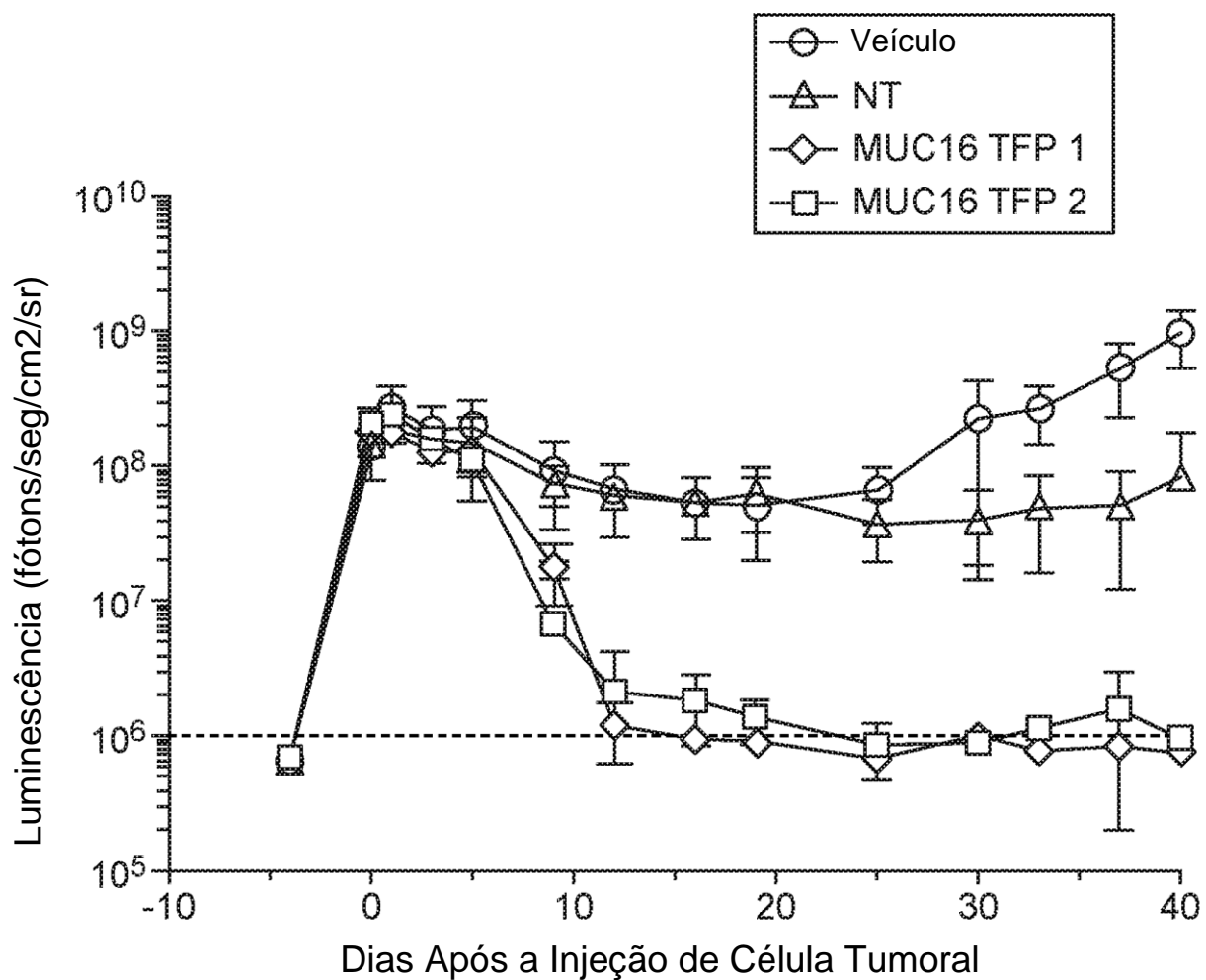
OVCAR3-MUC16^{ecto}, i.p.

FIGURA. 13C

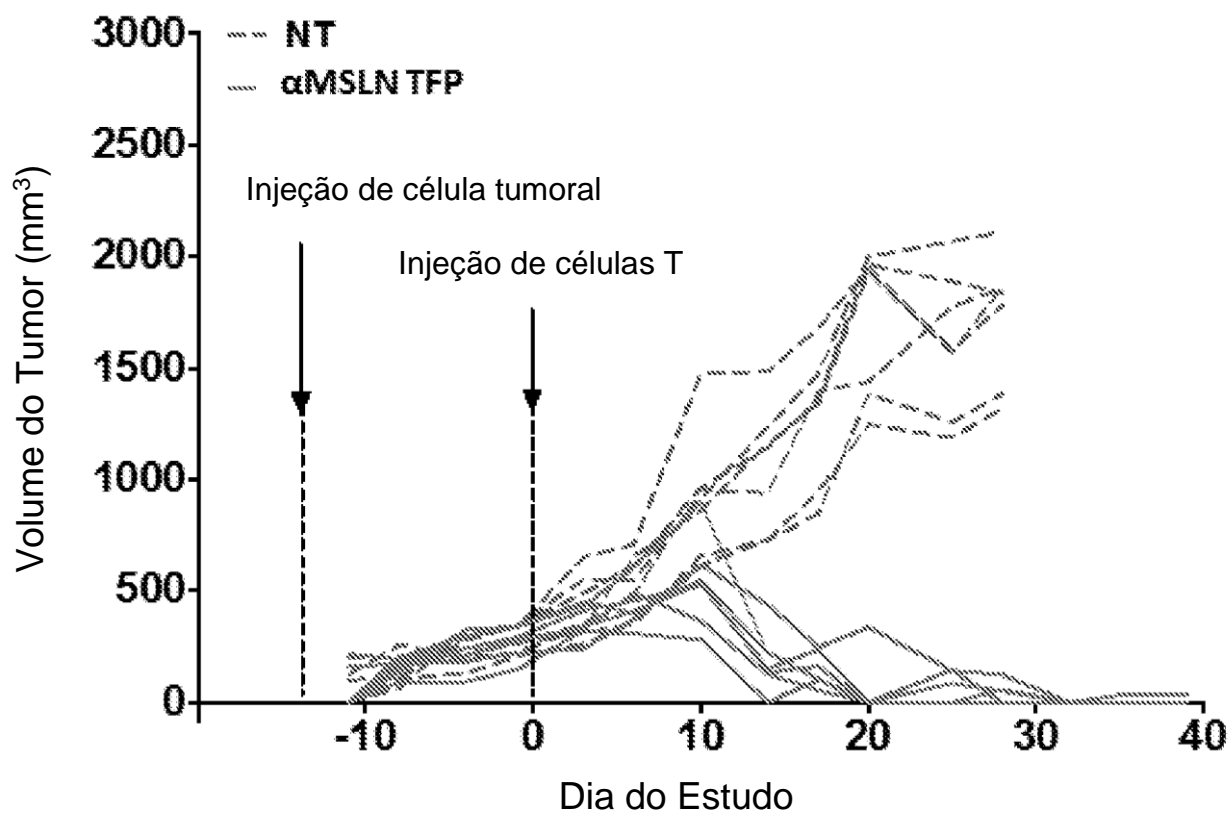
MSTO-MSLN^{alto}

FIGURA. 14A

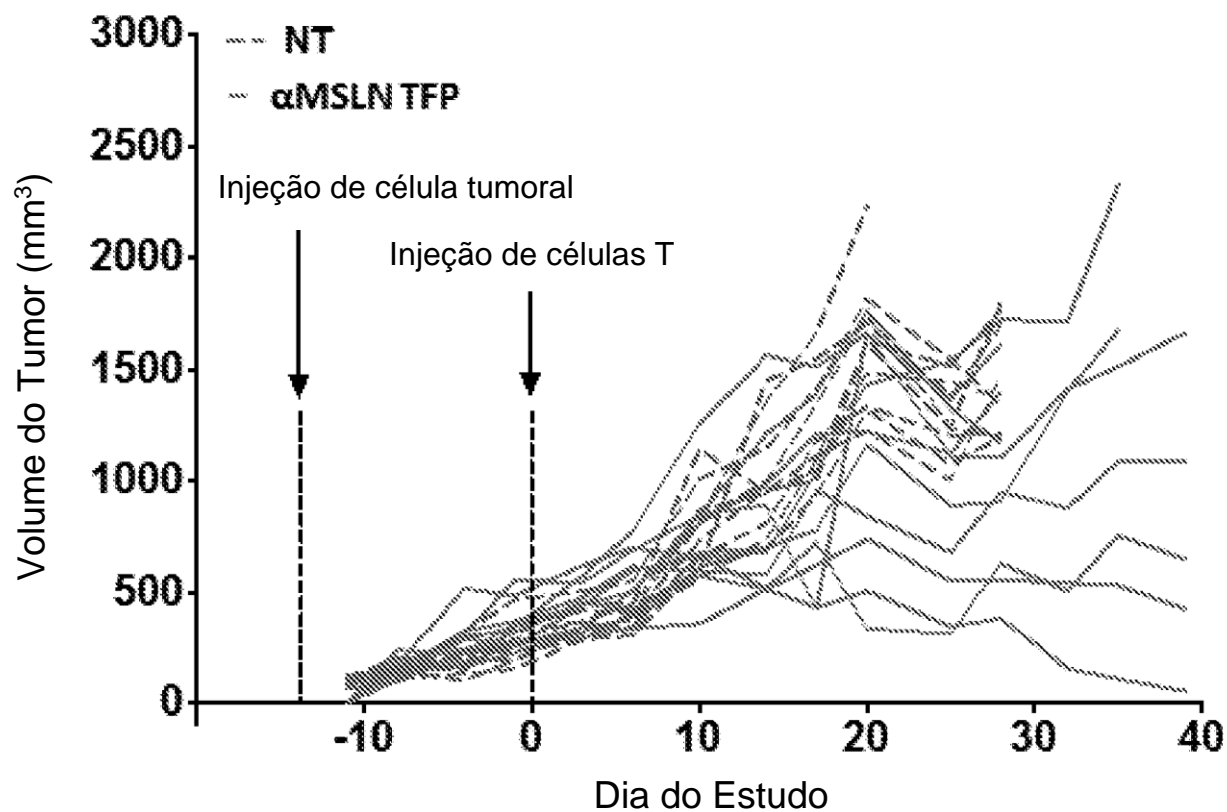
MSTO-MSLN^{baixo}

FIGURA. 14B

RESUMO

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REPROGRAMAÇÃO DE TCR USANDO PROTEÍNAS DE FUSÃO ESPECÍFICAS PARA O ALVO

São fornecidas, neste documento, proteínas de fusão do receptor de células T (TCR) (TFPs), células T modificadas para expressar uma ou mais TFPs MUC16 ou IL13R α 2 ou MSLN, e métodos de uso das mesmas para o tratamento de doenças, incluindo câncer.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 2021_723 LISTAGEM.TXT
- Data de Geração do Código: 26/03/2021
- Hora de Geração do Código: 15:31:12
- Código de Controle:
 - Campo 1: 513E2E3E21A2B758
 - Campo 2: BD3F2F6BC37B4208