



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

(21) BR 112019019917-9 A2



(22) Data do Depósito: 27/03/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 22/04/2020

(54) **Título:** RECEPTORES QUIMÉRICOS NKG2D TRUNCADOS E SEUS USOS EM IMUNOTERAPIA DE CÉLULAS EXTERMINADORAS NATURAIS

(51) **Int. Cl.:** A61K 35/17; A61K 38/00; A01N 63/00; C07K 14/725; C07K 14/705; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 09/02/2018 US 62/628,774; 27/03/2017 US 62/477,335.

(71) **Depositante(es):** NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE; NKARTA, INC..

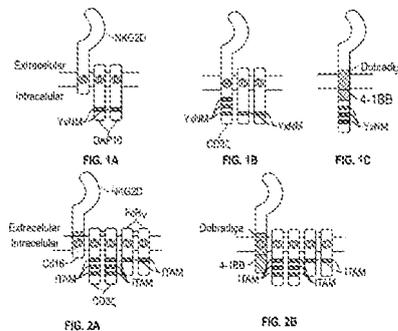
(72) **Inventor(es):** JUN HAO LEONG; NORIKO SHIMASAKI; SEE VOON SEOW; DARIO CAMPANA; JAMES BARNABY TRAGER; ALEXANDRA LEIDA LIANA LAZETIC; CHAO GUO; LUXUAN GUO BUREN; SHYAM SASHIKANT MASRANI.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018024650 de 27/03/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/183385 de 04/10/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 24/09/2019

(57) **Resumo:** Várias modalidades aqui divulgadas referem-se às composições compreendendo células Exterminadoras Naturais (NK) modificadas que expressam um receptor quimérico, o receptor quimérico transmitindo às células NK uma capacidade aumentada de atingir células específicas, tais como células cancerosas ou aquelas afetadas por uma doença infecciosa. Várias modalidades referem-se a células NK que têm como alvo células que expressam ligantes naturais de NKG2D, em que as células NK compreendem domínios transmembranares e/ou de sinalização que conduzem a efeitos citotóxicos e/ou citolíticos quando as células NK ligam uma célula-alvo. Usos de composições de células NK para tratar doenças são também proporcionados em várias modalidades.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"RECEPTORES QUIMÉRICOS NKG2D TRUNCADOS E USOS DOS  
MESMOS EM IMUNOTERAPIA DE CÉLULAS EXTERMINADORAS  
NATURAIS".**

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório dos E.U.A. N.º. 62/477,335, depositado em 27 de março de 2017 e do Pedido Provisório dos E.U.A. N.º 62/628,774, depositado em 9 de fevereiro de 2018. A totalidade de cada um dos pedidos acima listados é aqui incorporada por referência.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA DE MATERIAL EM ARQUIVO DE TEXTO ASCII

[002] Este pedido incorpora por referência a Listagem de Sequências contida no seguinte arquivo de texto ASCII sendo submetido conjuntamente com este documento:

[003] a) Nome do arquivo: 44591144002SequenceListing.txt; criado em 27 de março de 2018, 186 KB de tamanho.

ANTECEDENTES

[004] A emergência e persistência de muitas doenças é caracterizada por uma resposta imune insuficiente a células aberrantes, incluindo células malignas e infetadas com vírus. A imunoterapia é o uso e manipulação do sistema imune do paciente para tratamento de várias doenças.

SUMÁRIO

[005] A imunoterapia apresenta um novo avanço tecnológico no tratamento de doenças, em que células imunes são modificadas para expressar certas moléculas alvejadoras e/ou efectoras que identificam e reagem especificamente a células doentes ou danificadas. Isto representa um avanço promissor devido, ao menos em parte, ao potencial para alvejar especificamente células doentes ou danificadas,

em oposição a abordagens mais tradicionais, tais como a quimioterapia, em que todas as células são atingidas e o resultado desejado é o de que suficientes células saudáveis sobrevivam para que o paciente possa viver. Uma abordagem de imunoterapia é a expressão recombinante de receptores quiméricos em células imunes para alcançarem o reconhecimento alvejado e a destruição de células aberrantes de interesse.

[006] Para tratar esta necessidade para especificamente alvejar e destruir, desativar ou de outro modo tornar inertes células doentes ou infectadas, são aqui previstos polinucleotídeos, aminoácidos e vetores que codificam receptores quiméricos que transmitem alvejamento e citotoxicidade melhorados às células, tais como células exterminadoras naturais. Estão também previstos métodos para produção de células e métodos de uso das células para alvejar e destruir células doentes ou danificadas. Em várias modalidades, é proporcionado um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular e um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular, em que o domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D), em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D.

[007] Em várias modalidades, é proporcionado um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um ou ambos de: (a) um domínio receptor extracelular e (b) um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular. Em várias modalidades, o domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D). Em várias modalidades, o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um

fragmento de NKG2D, por exemplo, um fragmento de NKG2D é codificado por um polinucleotídeo compreendendo a SEQ ID NO. 2. Conforme divulgado aqui, são também usados fragmentos adicionais de NKG2D, dependendo da modalidade. Em várias modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende CD3zeta. Em uma modalidade, o CD3zeta é codificado por um polinucleotídeo compreendendo a SEQ ID NO. 13, porém, conforme aqui divulgado, sequências que diferem de CD3zeta, mas partilham função semelhante podem também ser usadas, dependendo da modalidade.

[008] Em várias modalidades, a região transmembranar do domínio efetor compreende um domínio transmembranar CD8a. Em uma modalidade, a região transmembranar do domínio efetor compreende ainda uma região de dobradiça CD8a. Em várias modalidades, a região de dobradiça CD8a é codificada por um polinucleotídeo compreendendo a SEQ ID NO: 5. Em várias modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende ainda 4-1BB. Em uma modalidade, o 4-1BB é codificado por um polinucleotídeo compreendendo a SEQ ID NO. 12, porém, conforme aqui divulgado, sequências que diferem de 4-1BB, mas partilham função semelhante podem também ser usadas, dependendo da modalidade.

[009] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a CD8a, 4-1BB e CD3z. Em várias modalidades, um tal receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 18. Em modalidades adicionais, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 108, porém, conforme aqui divulgado, sequências que diferem da SEQ ID NO. 108, mas partilham função semelhante podem também ser usadas, dependendo da modalidade. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 19.

[0010] Em várias modalidades, qualquer dos receptores quiméricos aqui divulgados pode também ser coexpresso com interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15). Em várias modalidades, a mbIL15 é codificada por um polinucleotídeo compreendendo a SEQ ID NO. 16. Em algumas modalidades, a mbIL15 compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 17. Outras sequências para mbIL15 podem também ser usadas, dependendo da modalidade. Em algumas modalidades, a mbIL15 é expressa bicistronicamente no mesmo polinucleotídeo que o receptor quimérico. Em outras modalidades, a mbIL15 é coexpressa em uma construção separada. Em várias modalidades, o domínio de sinalização intracelular é ainda reforçado por acoplamento de sua expressão com a da interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15).

[0011] Em várias modalidades, o domínio efetor compreende ainda um domínio OX-40. Em várias modalidades, o domínio OX-40 está no lugar da, ou adicionalmente à mbIL15. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, o domínio OX-40 e o CD3zeta. Em algumas modalidades, a construção de polinucleotídeo está configurada para coexpressar bicistronicamente mbIL15. Em algumas dessas modalidades, a construção de polinucleotídeo compreende um ou mais dos locais de clivagem (por exemplo, local(is) de clivagem T2A, P2A, E2A, e/ou F2A) reconhecidos e clivados por exemplo por uma protease citosólica. Em algumas modalidades, a mbIL15 é acoplada ao receptor quimérico por um local de clivagem de protease citosólica. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 90 acoplada à mbIL15 codificada pela SEQ ID NO. 16 por um local de clivagem de protease citosólica. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 109 acoplada à mbIL15 codificada pela SEQ ID NO. 16 por um local de

clivagem de protease citosólica. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 91 e é coexpresso com mbIL15 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 17. Conforme aqui divulgado, as sequências que diferem das SEQ ID NOs: 90, 91, 109, 16 e/ou 16, mas partilham função semelhante podem também ser usadas, dependendo da modalidade.

[0012] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça IgG4, um domínio transmembranar CD8a, o domínio OX-40 e o CD3zeta. Em algumas modalidades, a construção de polinucleotídeo está configurada para coexpressar bicistronicamente mbIL15 com o receptor quimérico. Em algumas dessas modalidades, a construção de polinucleotídeo compreende um ou mais dos locais de clivagem (por exemplo, local(is) de clivagem T2A, P2A, E2A, e/ou F2A) reconhecidos e clivados por uma protease citosólica. Em algumas modalidades, a mbIL15 é acoplada ao receptor quimérico por um local de clivagem de protease citosólica. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 100 acoplada à mbIL15 codificada pela SEQ ID NO. 16 por um local de clivagem de protease citosólica. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 101 e é coexpressa com mbIL15 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 17. Conforme aqui divulgado, as sequências que diferem das SEQ ID NOs: 100, 101 e/ou 16, mas partilham função semelhante podem também ser usadas, dependendo da modalidade.

[0013] Em várias modalidades, são proporcionados métodos para tratamento de câncer, compreendendo administrar a um sujeito que tem um câncer uma composição compreendendo uma célula Exterminadora Natural (NK) expressando o receptor quimérico codificado pelos

polinucleotídeos descritos acima ou em outras partes deste documento.

[0014] Em uma modalidade, as células NK são células autólogas isoladas de um paciente que tem um câncer ou uma doença infecciosa. Em modalidades adicionais, as células NK são células alogênicas isoladas de um doador.

[0015] Também aqui previsto está o uso de um polinucleotídeo como descrito acima, ou em outras partes deste documento, no fabrico de um medicamento para aumentar a citotoxicidade das células NK em um mamífero que disso tenha necessidade. Em várias modalidades, está previsto o uso de um polinucleotídeo como acima descrito, ou em outras partes deste documento, no fabrico de um medicamento para o tratamento ou a prevenção de câncer ou de uma doença infecciosa em um mamífero que disso tenha necessidade.

[0016] De acordo com várias modalidades, é proporcionado um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico, o receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular, um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular. Conforme discutido aqui em maior detalhe, o domínio receptor extracelular serve para reconhecer e ligar ligantes em uma célula-alvo. O domínio efetor serve para transmitir sinais (ao ligar uma célula-alvo pelo domínio extracelular) que coloca em movimento uma cascata de sinais que conduz a atividade citotóxica contra a célula-alvo. De acordo com várias modalidades, o polinucleotídeo codifica um receptor quimérico que inesperadamente proporciona citotoxicidade aumentada quando comparado com células NK não modificadas.

[0017] Em várias modalidades, o domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D). De acordo com várias modalidades, o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um

fragmento funcional de NKG2D (por exemplo, um truncamento, fragmento ou porção de comprimento completo NKG2D. Tal como aqui usados, os termos "fragmento", "truncamento" e "porção" devem assumir seus significados usuais e devem também ser permutáveis entre eles. Por exemplo, em várias modalidades, o fragmento de NKG2D é codificado por um polinucleotídeo compreendendo um fragmento da sequência SEQ ID NO: 1. Em várias modalidades, o fragmento de NKG2D compreende a sequência da SEQ ID NO: 2, enquanto em modalidades adicionais, o fragmento codificando NKG2D é códon otimizado e compreende, por exemplo, a sequência da SEQ ID NO: 3. Em modalidades adicionais, o fragmento codificando NKG2D é códon otimizado e compreende, por exemplo, a sequência da SEQ ID NO: 68.

[0018] Em várias modalidades, o domínio efetor compreende um ou mais dentre CD16, NCR1, NCR2, NCR3, 4-1BB, NKp80, CD3zeta e 2B4. Em várias modalidades, estes domínios efetores são acoplados a CD8 alfa.

[0019] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a CD16. Tal como aqui usado, acoplamento deve assumir seu significado usual e deve também referir-se a uma ligação direta (por exemplo, um primeiro nucleotídeo seguido diretamente de um segundo nucleotídeo) ou indireta (por exemplo, sequências estão enquadradas umas nas outras mas separadas por nucleotídeos intervenientes) de sequências de nucleotídeos de uma maneira que possibilita a expressão das sequências de nucleotídeos em, por exemplo, um sistema de transcrição/tradução *in vitro*, uma célula hospedeira (por exemplo, *in vitro* e/ou *in vivo*). Em várias modalidades, "ligado" e "acoplado" são usados de modo interpermutável. Em várias modalidades, o receptor quimérico NKG2D/CD16 é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID

NO: 23. Em várias modalidades, o receptor quimérico NKG2D/CD16 compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 24. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a NCR1. Em várias modalidades, um tal receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 27. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 28.

[0020] Tal como discutido acima, em várias modalidades, o fragmento NKG2D é acoplado a NCR2, e o receptor quimérico resultante compreende pelo menos uma porção da sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 21. Várias modalidades preveem um receptor quimérico compreendendo um fragmento de NKG2D acoplado a NCR3. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 29, e o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 30.

[0021] Tal como discutido em maior detalhe abaixo, combinações de domínios transmembranares e intracelulares são usadas em várias modalidades e preveem interações sinérgicas entre os componentes do receptor quimérico e produzem efeitos citotóxicos melhorados. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a um domínio CD16 transmembranar/intracelular e 4-1BB. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, a um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB. Em várias modalidades, um tal receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 25. Em várias modalidades, o receptor quimérico resultante compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 26.

[0022] Em várias modalidades, NCR1 é usado em conjunto com o fragmento NKG2D. Em várias modalidades, o fragmento NKG2D está ligado ao NCR1 apenas. Em modalidades adicionais, o receptor

quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a NCR1 e 4-1BB. Em algumas destas modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido NCR1 da SEQ ID NO: 20.

[0023] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a CD8a, 4-1BB e CD3z. Em várias modalidades, um tal receptor quimérico NKG2D/CD8a/4-1bb/CD3z é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 18. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 19.

[0024] Em várias modalidades, NCR3 é incluído no receptor quimérico. Por exemplo, uma construção NKG2D/NCR3 está prevista em várias modalidades. O receptor quimérico resultante compreende por isso a sequência de aminoácido NCR3 da SEQ ID NO: 22. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende uma construção NKG2D/NCR2/4-1BB ou uma construção NKG2D/NCR3/4-1BB.

[0025] Em várias modalidades, estão previstos ligantes, dobradiças ou outros elementos de "espaçamento" nas construções de receptor quimérico. Por exemplo, em várias modalidades, o domínio efetor compreende um ligante. Em várias modalidades, os polinucleotídeos codificam um ligante GS entre as porções da construção, por exemplo entre qualquer um dentre 4-1BB, CD16, NCR1, NCR3, 2B4 ou NKp80. Em várias modalidades, estão previstos um ou mais ligantes GS, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais. Em várias modalidades, está previsto um receptor quimérico compreendendo uma região de dobradiça. Dependendo da localização dentro de uma construção particular, uma região de dobradiça pode ser sinônimo de uma região ligante e vice-versa. Em várias modalidades, a região de dobradiça é codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 5. Em algumas modalidades, a região de dobradiça pode ser truncada para um comprimento desejado e é, portanto, codificada por um fragmento da

sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 5. Em várias modalidades, é usado um motivo glicina-serina como dobradiça. Em várias modalidades, a região de dobradiça compreende um motivo repetitivo de glicina-serina que tem a sequência de aminoácido da (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 31) onde n é o número de repetições. Em várias modalidades, são usadas 9 repetições, resultando em uma região de dobradiça compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 33. Em várias modalidades, são usadas 3 repetições, resultando em uma região dobradiça compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 34.

[0026] Em várias modalidades, podem ser usadas duas moléculas separadas como dobradiça ou ligante, tais como a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 32 (CD8a/GS3). Em várias modalidades, são usadas porções de um receptor beta adrenérgico como dobradiça ou ligante. Em várias modalidades, são usadas porções do receptor beta-2 adrenérgico. Em uma modalidade, é usado um domínio extracelular do receptor beta-2 adrenérgico, que é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 40. Em algumas modalidades, é usada a primeira hélice transmembranar do receptor beta-2 adrenérgico, que é codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 42. Dependendo da modalidade, estas duas porções de receptor beta-2 adrenérgico são usadas em conjunto no receptor quimérico. Em várias modalidades, o domínio receptor extracelular compreende ainda um peptídeo sinal CD8a, em que o peptídeo sinal compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 4. Outros peptídeos sinal são usados opcionalmente dependendo da modalidade. Peptídeos sinal podem ser utilizados em um formato multimérico, de acordo com algumas modalidades.

[0027] Em várias modalidades, o domínio efetor compreende uma ou mais sequências hemi-ITAM. Em algumas dessas modalidades, o

hemi-ITAM compreende o motivo aminoácido DGYXXL (onde X é qualquer aminoácido; SEQ ID NO: 14). Em algumas modalidades, são usados múltiplos hemi-ITAM. Em várias modalidades, o hemi-ITAM compreende NKp80. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende uma ou mais sequências ITSM. As sequências ITSM são usadas em conjunto com motivos hemi-ITAM em várias modalidades. Em várias modalidades, o ITSM compreende o motivo aminoácido S/TXYXXL/I (onde X é qualquer aminoácido; SEQ ID NO: 15). Em várias modalidades, o efetor compreende um domínio 2B4.

[0028] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a um ligante GS3, uma dobradiça CD8a, a um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a um ligante GS3, um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a um domínio CD16 transmembranar/intracelular e 4-1BB. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB e 2B4. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a um domínio extracelular beta-adrenérgico, um domínio transmembranar beta-adrenérgico, 4-1BB e 2B4. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB, 2B4, um ligante GS3 e NKp80. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB, um ligante GS3 e NKp80. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D, em que o fragmento é codificado por uma sequência que é

códon otimizada acoplada a um ligante GS3, um fragmento adicional de NKG2D, um domínio extracelular beta-adrenérgico, um domínio transmembranar beta-adrenérgico, 4-1BB, um ligante GS3 adicional e NKp80. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a um ligante GS3, um fragmento adicional de NKG2D, uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB, um ligante GS3 adicional e NKp80. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a um ligante GS3, um fragmento adicional de NKG2D, uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD16, 4-1BB e 2B4. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD16, 4-1BB, um ligante GS3 e NKp80. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que está acoplado a uma dobradiça CD8a e um domínio transmembranar CD8a. Em várias modalidades, o efetor compreende 4-1BB. Em algumas destas modalidades, o efetor compreende 4-1BB opcionalmente em conjunto com um ou mais de NKp80, 2B4, CD3zeta, Dap10, Dap12, CD28 ou outros domínios de sinalização aqui previstos). Em várias modalidades, o domínio efetor compreende ainda CD3zeta. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende um domínio intracelular de 2B4. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende ainda um domínio intracelular de DAP10.

[0029] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB, 2B4 e CD3zeta. Em várias modalidades,

o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 58. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 59.

[0030] Adicionalmente, qualquer dos receptores quiméricos aqui divulgados pode também ser coexpresso com interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15). Por exemplo, está previsto em várias modalidades um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular, em que o domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D, em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D, uma região transmembranar, um domínio efetor, o polinucleotídeo sendo coexpresso com uma construção adicional codificando interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15). Em várias modalidades, os receptores quiméricos aqui discutidos são coexpressos com mbIL-15. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende 4-1BB e CD3 zeta, e a região transmembranar compreende CD8a.

[0031] Em várias modalidades, os receptores quiméricos são modificados de modo a que eles não incluam proteína ativadora de DNAX 10 (DAP10). Adicionalmente, em várias modalidades, os receptores quiméricos são modificados de modo a que eles não incluam um motivo ITAM.

[0032] Em várias modalidades, é proporcionado um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um, dois ou todos dentre: (a) um domínio receptor extracelular compreendendo um fragmento de NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, (b) uma região transmembranar, em que a região transmembranar compreende CD8a, e (c) um domínio efetor, em que o domínio efetor compreende 4-1BB e o domínio intracelular de 2B4 ou DAP10. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende 2B4 seguido de 4-1BB. Em modalidades

adicionais, o domínio efetor compreende 4-1BB seguido de 2B4. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende DAP10 seguido de 4-1BB. Em modalidades adicionais, o domínio efetor compreende 4-1BB seguido de DAP10. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB e DAP10. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 60. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 61. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB, 2B4 e DAP10. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende 4-1BB, seguido de DAP10, seguido de 2B4. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 62. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 63. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende 4-1BB, seguido de 2B4, seguido de DAP10. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 64. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 65.

[0033] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento códon-otimizado de NKG2D acoplado a um domínio efetor intracelular. Em várias modalidades, são utilizados múltiplos fragmentos de NKG2D, por exemplo, um fragmento adicional NKG2D (opcionalmente códon otimizado) está acoplado ao primeiro fragmento, por exemplo, por um ligante GS3. Em várias modalidades, tais receptores quiméricos compreendem ainda uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB e CD3zeta. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido

nucleico da SEQ ID NO. 66. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 67. Em várias modalidades, o polinucleotídeo é coexpresso com uma construção adicional que codifica uma interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15).

[0034] Em várias modalidades, é proporcionado um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular, compreendendo um fragmento de NKG2D que liga um ligante nativo de NKG2D e está codificado por um fragmento da SEQ ID NO: 1, uma região transmembranar compreendendo uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor. Em várias modalidades, é proporcionado um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular, compreendendo um fragmento de NKG2D que liga um ligante nativo de NKG2D e está codificado pela SEQ ID NO. 2, uma região transmembranar compreendendo uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor. Em várias modalidades, é proporcionado um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular, compreendendo um fragmento de NKG2D que liga um ligante nativo de NKG2D e está codificado pela SEQ ID NO. 3, uma região transmembranar compreendendo uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor. Em várias modalidades, é proporcionado um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular, compreendendo um fragmento de NKG2D que liga um ligante nativo de NKG2D e está codificado pela SEQ ID NO. 68, uma região transmembranar compreendendo uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor. Em várias modalidades, fragmentos do NKG2D codificados por qualquer das SEQ ID NO. 2, 3 ou 68 podem também ser usados. Em várias modalidades, a região transmembranar CD3zeta compreende a sequência de

aminoácido da SEQ ID NO: 69. Fragmentos da sequência da SEQ ID NO: 69 são também usados, em várias modalidades, os fragmentos detendo a capacidade de transduzir pelo menos cerca de 65%, cerca de 75%, cerca de 85%, ou cerca de 95% da transdução do sinal de uma subunidade CD3 zeta nativa (incluindo dímeros). Em várias modalidades, o domínio receptor extracelular compreende ainda resíduos adicionais adjacentes à região transmembranar CD3zeta. Em várias modalidades, os aminoácidos adicionais são resíduos extracelulares de uma sequência CD3zeta nativa. Em outras modalidades, os aminoácidos adicionais são selecionados aleatoriamente. Em várias modalidades, há 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15 ou 20 aminoácidos adicionais. Em várias modalidades, o domínio receptor quimérico compreende uma região de dobradiça, a qual, em várias modalidades, é uma dobradiça CD8a codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 5. Em várias modalidades, a região de dobradiça é uma dobradiça CD8a codificada por um fragmento da sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 5. Dependendo da modalidade, o fragmento é cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95% do comprimento da sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 5. Dependendo da modalidade, o fragmento é cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 98% ou cerca de 99% homólogo à sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 5. Em várias modalidades, o domínio receptor extracelular compreende ainda um peptídeo sinal CD8a, o qual, dependendo da modalidade, pode compreender a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 4. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende 4-1BB. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende um domínio intracelular CD16. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende 4-1BB e CD16 (com qualquer das metades sendo "primeira" vs. "segunda" na construção). Em várias modalidades,

são usadas repetições de um ou mais de 4-1BB e/ou CD16.

[0035] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado e está acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 78. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 79.

[0036] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo CD16 seguido de 4-1BB. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 71. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 70.

[0037] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado e está acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB seguido de CD16, opcionalmente acoplado por um ligante GS3. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 85. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 84.

[0038] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado e está acoplado a um ligante GS3, um fragmento adicional de NKG2D, uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo CD16 e 4-1BB. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO.

72. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 73.

[0039] Em várias modalidades, o domínio efetor inclui NKp80. Em várias modalidades, o domínio efetor é NKp80. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que está acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo um CD16, 4-1BB e NKp80 e, opcionalmente, incluindo um ligante GS3. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 74. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 75. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D que é códon otimizado e está acoplado a um ligante GS3, um fragmento adicional de NKG2D (opcionalmente códon otimizado), uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo CD16, 4-1BB e NKp80, e opcionalmente incluindo um ligante GS3. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 76. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 77. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado e está acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB e NKp80 e, opcionalmente, incluindo um ligante GS3. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 82. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 83.

[0040] Em várias modalidades, o domínio efetor compreende CD3zeta. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado e está acoplado a uma

dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB e CD3zeta. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 80. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 81.

[0041] Em várias modalidades, o domínio efetor compreende FcRγ. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB e FcRγ. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 86. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 87.

[0042] Em várias modalidades, o domínio efetor compreende CD28. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo CD28 e CD3zeta. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 102. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 103.

[0043] Em várias modalidades, o domínio efetor compreende um ligante GS3.

[0044] Em várias modalidades, os polinucleotídeos aqui divulgados são coexpressos com interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15).

[0045] Em várias modalidades, um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular compreendendo um fragmento de NKG2D que é capaz de ligar um ligante nativo de NKG2D e está codificado por um fragmento de qualquer uma das sequências da SEQ ID NO: 1, da SEQ ID NO. 2, da

SEQ ID NO. 3, ou SEQ ID NO. 68, e um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular. Em várias modalidades, é proporcionado um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular, compreendendo um fragmento de NKG2D que é capaz de ligar um ligante nativo de NKG2D e está codificado por (i) um fragmento da sequência da SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência da SEQ ID NO. 2, (iii) a sequência da SEQ ID NO. 3, ou (iv) a sequência da SEQ ID NO. 68, e um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular. Em várias modalidades, um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular compreendendo um fragmento de NKG2D que é capaz de ligar um ligante nativo de NKG2D e está codificado pela sequência da SEQ ID NO: 2, e um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular. Em várias modalidades, um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular compreendendo um fragmento de NKG2D que é capaz de ligar um ligante nativo de NKG2D e está codificado pela sequência da SEQ ID NO: 3, e um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular. Em várias modalidades, um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular compreendendo um fragmento de NKG2D que é capaz de ligar um ligante nativo de NKG2D e está codificado por um fragmento da sequência da SEQ ID NO. 68, e um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular. Em várias modalidades, o domínio receptor extracelular compreende uma região de dobradiça. Em várias modalidades, a região de dobradiça é uma dobradiça CD8a codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 5 ou, opcionalmente,

um fragmento da sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 5 (por exemplo, um fragmento tendo cerca de 75%, cerca de 85%, cerca de 95% de homologia com a SEQ ID NO: 5). Em várias modalidades, a região de dobradiça é uma dobradiça de Imunoglobulina G4 (IgG4) codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 104. Em várias modalidades, a região de dobradiça é uma dobradiça de Imunoglobulina G4 (IgG4) codificada por um fragmento da sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 104 (por exemplo, um fragmento tendo cerca de 75%, cerca de 85%, cerca de 95% de homologia com a SEQ ID NO: 104). Em várias modalidades, o domínio receptor extracelular compreende ainda um peptídeo sinal CD8a, em que o peptídeo sinal compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 4. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende pelo menos um dos domínios de sinalização selecionados do grupo constituído por OX40 (CD134), CD3zeta, 4-1BB, CD28 e DAP12. Em várias modalidades, o domínio transmembranar do receptor quimérico compreende um domínio transmembranar CD8. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende IL-15 ligada (opcionalmente por um ligante GS3) ao fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB e CD3z. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 88. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 89.

[0046] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça IgG4, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB e CD3zeta. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 96. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 97.

[0047] Em várias modalidades, o domínio efetor compreende OX40.

Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, OX40 e CD3z. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 90. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 109. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 91. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça IgG4, um domínio transmembranar CD8a, OX40 e CD3zeta. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 100. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 101.

[0048] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um domínio transmembranar/intracelular CD28. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, a um domínio transmembranar/intracelular CD28 e CD3zeta. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 92. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 93.

[0049] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD28, 4-1BB e CD3zeta. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 94. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 95.

[0050] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça IgG4, um domínio

transmembranar/intracelular CD28 e CD3zeta. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 98. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 99.

[0051] Em várias modalidades, o domínio efetor compreende um ligante GS3. Em várias modalidades, os polinucleotídeos aqui divulgados estão configurados para serem coexpressos (seja no mesmo polinucleotídeo, seja em outro polinucleotídeo) com interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15).

[0052] Qualquer dos receptores quiméricos pode opcionalmente incluir um domínio receptor extracelular que inclui um segundo peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D. Em várias modalidades, o segundo peptídeo é homólogo a NKG2D, enquanto em outras modalidades, o segundo peptídeo é heterólogo relativamente ao NKG2D. Se o receptor quimérico incluir um domínio receptor extracelular dimerizado, os domínios receptores extracelulares podem reconhecer pelo menos os seguintes ligantes nativos de NKG2D: MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 ou ULBP6.

[0053] Tal como descrito abaixo em maior detalhe, variantes funcionais dos domínios de ligação a ligantes de NKG2D são utilizadas em várias modalidades. Por exemplo, o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D tem, em várias modalidades, pelo menos 80% de homologia com a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, ou SEQ ID NO: 68. Em várias modalidades, o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% de homologia com a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, ou SEQ ID NO: 68.

[0054] Adicionalmente, estão aqui previstos, em várias modalidades, vetores para a expressão dos receptores quiméricos. Em várias modalidades, os polinucleotídeos aqui previstos são mRNA e

podem incluir uma ligação operável a pelo menos elemento regulador para a expressão do receptor quimérico. Em várias modalidades, os polinucleotídeos incluem ainda um ou mais sítios internos de entrada do ribossomo (IRES). Em várias modalidades, o vetor é um retrovírus.

[0055] Estão também previstas, em várias modalidades, células exterminadoras naturais modificadas que expressam qualquer uma das construções de receptor quimérico aqui divulgadas, as células NK modificadas apresentando efeitos citotóxicos melhorados contra células-alvo. Efeitos citotóxicos melhorados incluem, mas não estão limitados a, maior afinidade para células-alvo (por exemplo, cancerosas) quando comparadas com células normais (por exemplo, não cancerosas), um maior efeito exterminador dirigido contra células-alvo, efeitos fora do alvo reduzidos, duração dos efeitos citotóxicos aumentada, mais citotoxicidade eficaz e semelhantes. Esses efeitos melhorados podem ser identificados através do uso de vários ensaios de citotoxicidade *in vitro* (por exemplo, medição de produção de citocina, etc.), medição de morte de células-alvo, ou através de vários resultados clínicos (por exemplo, redução da carga tumoral). Em várias modalidades, as células NK modificadas são células autólogas isoladas de um paciente. Em modalidades adicionais, as células NK modificadas são geradas a partir de células alogênicas isoladas de um doador. Essas células NK modificadas tal como aqui divulgadas são usadas, em várias modalidades, para aumentar a citotoxicidade de células NK em um mamífero que disso tenha necessidade, por administração das células NK. Estas células NK modificadas são usadas em várias modalidades para o tratamento ou a prevenção de câncer ou uma doença infecciosa em um mamífero. Os polinucleotídeos que codificam, os vetores que carregam e as células NK que expressam os vários receptores quiméricos aqui divulgados podem também ser usados, em várias modalidades, no fabrico de um medicamento para aumentar a

citotoxicidade de células NK (por exemplo, para tratar ou prevenir câncer ou uma doença infecciosa). Em várias modalidades, as construções de receptor quimérico aqui divulgadas não aumentam significativamente a citotoxicidade das células NK modificadas contra células normais e, como aqui descrito, são vantajosamente melhoradas quando comparadas com células NK não modificadas. Em várias modalidades, é proporcionado um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular, uma região transmembranar, e um domínio efetor. Em várias modalidades, o domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D), em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D. Várias modalidades referem-se a um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo: (a) um domínio receptor extracelular, em que o referido domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D), em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D, em que o fragmento de NKG2D é codificado por um polinucleotídeo compreendendo: (i) um fragmento da sequência da SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência da SEQ ID NO. 2, (iii) a sequência da SEQ ID NO. 3, ou (iv) a sequência da SEQ ID NO. 68, (b) uma região transmembranar, e (c) um domínio efetor.

[0056] Em várias modalidades, é proporcionado um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo: (a) um domínio receptor extracelular, em que o referido domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D), em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D, em que o fragmento de NKG2D é codificado por um polinucleotídeo

compreendendo: (i) um fragmento da sequência da SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência da SEQ ID NO. 2, (iii) a sequência da SEQ ID NO. 3, (iv) ou a sequência da SEQ ID NO. 68; e (b) um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular.

[0057] Em várias modalidades, a região transmembranar compreende uma região transmembranar CD3zeta. Em várias modalidades, a região transmembranar CD3zeta compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 69. Em várias modalidades, a região transmembranar compreende CD8a. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende 4-1BB, um domínio intracelular de 2B4, NKp80, um domínio intracelular CD16, um Receptor de Disparo de Citotoxicidade Natural 1 (NCR1), um Receptor de Disparo de Citotoxicidade Natural 2 (NCR2), um Receptor de Disparo de Citotoxicidade Natural 3 (NCR3) e/ou um domínio intracelular de DAP10. Em uma modalidade, o domínio efetor compreende 4-1BB e CD16. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende 4-1BB e CD3 zeta. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende 4-1BB e um domínio intracelular de 2B4 ou DAP10. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende 2B4 seguido de 4-1BB enquanto em outras modalidades o domínio efetor compreende 4-1BB seguido de 2B4. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende DAP10 seguido de 4-1BB. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende 4-1BB seguido de DAP10. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende ainda CD3zeta. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende pelo menos um domínio de sinalização selecionado do grupo constituído por OX40 (CD134), CD3zeta, 4-1BB, CD28 e DAP12. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende uma ou mais sequências hemi-ITAM. Em várias modalidades, o hemi-ITAM compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 14. Em várias modalidades, o hemi-ITAM compreende a sequência de aminoácido da

SEQ ID NO. 37. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende uma ou mais sequências ITSM. Em várias modalidades, o ITSM compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 15 ou a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 35.

[0058] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB, 2B4 e CD3zeta. Em uma modalidade, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 58. Em uma modalidade, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 59. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB e DAP10. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 60 e compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 61.

[0059] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB, 2B4 e DAP10. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende 4-1BB, seguido de DAP10, seguido de 2B4. Em algumas modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 62 e o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 63. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende 4-1BB, seguido de 2B4, seguido de DAP10. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 64 e o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 65.

[0060] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a um ligante GS3, um fragmento adicional de NKG2D, uma dobradiça CD8a, um

domínio transmembranar CD8a, 4-1BB e CD3zeta. Em uma modalidade, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 66. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 67.

[0061] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB, é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 78 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 79.

[0062] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo CD16 seguido de 4-1BB. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 70 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 71.

[0063] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB seguido de um ligante GS3 e CD16. Em uma modalidade, o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 85 e/ou é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 84.

[0064] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a um ligante GS3, um fragmento adicional de NKG2D, uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo um CD16 e 4-1BB. Em uma modalidade, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 72 e/ou

compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 73.

[0065] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende IL-15 ligada por um ligante GS3 ao fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB e CD3zeta, é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 88 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 89.

[0066] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça IgG4, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB e CD3zeta é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 96 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 97.

[0067] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, OX40 e CD3z, é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 90 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 91.

[0068] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça IgG4, um domínio transmembranar CD8a, OX40 e CD3zeta, é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 100 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 101.

[0069] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD28, e CD3zeta, é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 92 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 93.

[0070] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD28, 4-1BB, e CD3zeta, é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 94 e/ou compreende a

sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 95.

[0071] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça IgG4, um domínio transmembranar/intracelular CD28 e CD3zeta, é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 98 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 99.

[0072] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo um CD16, 4-1BB, um ligante GS3 e NKp80. Em uma modalidade, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 74 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 75.

[0073] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a um ligante GS3, um fragmento adicional de NKG2D, uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo CD16, 4-1BB, um ligante GS3 e NKp80. Em uma modalidade, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 76 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 77. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB, um ligante GS3 e NKp80. Em uma modalidade, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 82 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 83.

[0074] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB e CD3zeta. Em uma modalidade, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da

SEQ ID NO: 80 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 81.

[0075] Dependendo da modalidade, o domínio efetor também pode compreender FcRγ. Por exemplo, em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB e FcRγ. Em uma modalidade, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 86 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 87.

[0076] Dependendo da modalidade, o domínio efetor também pode compreender CD28. Por exemplo, em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo CD28 e CD3zeta. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 102 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 103.

[0077] Em várias modalidades, o domínio efetor compreende um ligante GS3.

[0078] Em várias modalidades, o domínio receptor extracelular compreende ainda um peptídeo sinal CD8a, em que o peptídeo sinal compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 4. Em várias modalidades, o domínio receptor extracelular compreende ainda 2 resíduos extracelulares de CD3zeta diretamente adjacentes à região transmembranar CD3zeta. Em várias modalidades, o domínio receptor extracelular compreende um peptídeo sinal CD8a, em que o peptídeo sinal compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 4.

[0079] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um ou mais ligantes GS3. Em várias modalidades, o domínio receptor quimérico compreende uma região de dobradiça. Em várias

modalidades, a região de dobradiça é codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 5, enquanto em outras modalidades, a região de dobradiça é codificada por um fragmento da sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 5. Em várias modalidades, a região de dobradiça é uma dobradiça CD8a. Em várias modalidades, a região de dobradiça compreende um motivo repetitivo de glicina-serina que tem a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 31. Em várias modalidades, a região de dobradiça compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 32 e em algumas modalidades, a região de dobradiça compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 33. Em modalidades adicionais, a região de dobradiça é codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 34. Em várias modalidades, a região de dobradiça compreende uma porção do receptor beta-adrenérgico. Em algumas dessas modalidades, a região de dobradiça é codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 40. Em modalidades adicionais, a região de dobradiça é codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 42. Em várias modalidades, a região de dobradiça é uma dobradiça de Imunoglobulina G4 (IgG4) codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 104. Em várias modalidades, a região de dobradiça é uma dobradiça de Imunoglobulina G4 (IgG4) codificada por um fragmento da sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 104. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a e um domínio transmembranar CD8a.

[0080] Em uma modalidade, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a CD16, é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 23 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 24. Em uma modalidade, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a NCR1. Em algumas dessas modalidades, o receptor quimérico é codificado pela

sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 27 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 28. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende pelo menos uma porção da sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 21. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a NCR3, em diversas modalidades é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 29 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 30.

[0081] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a um domínio CD16 transmembranar/intracelular e 4-1BB. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB, é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 25 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 26.

[0082] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a NCR1 e 4-1BB, em que o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido NCR1 da SEQ ID NO: 20.

[0083] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a CD8a, 4-1BB e CD3z, é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 18 e/ou compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 19.

[0084] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a NCR3 e 4-1BB, e em que o NCR3 compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 22. Em uma modalidade, o receptor quimérico compreende um ou mais dentre o domínio transmembranar/intracelular NCR1 da SEQ ID NO: 20 ou o domínio transmembranar/intracelular NCR3 da SEQ ID NO: 22.

[0085] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o

fragmento de NKG2D acoplado a um ligante GS3, uma dobradiça CD8a, a um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 43. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a um ligante GS3, um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB. Em uma modalidade, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 44.

[0086] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB e é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 45.

[0087] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB e 2B4 e é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 46.

[0088] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a um domínio extracelular beta-adrenérgico, um domínio transmembranar beta-adrenérgico, 4-1BB e 2B4, e é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 47.

[0089] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB, 2B4, um ligante GS3 e NKp80 e é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 48.

[0090] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB, um ligante GS3 e NKp80 e é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 49.

[0091] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o

fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a um ligante GS3, um fragmento adicional de NKG2D, um domínio extracelular beta-adrenérgico, um domínio transmembranar beta-adrenérgico, 4-1BB, um ligante GS3 adicional e NKp80 e é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 50.

[0092] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a um ligante GS3, um fragmento adicional de NKG2D, uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB, um ligante GS3 adicional e NKp80 e é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 51.

[0093] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a um ligante GS3, um fragmento adicional de NKG2D, uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB e é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 52.

[0094] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD16, 4-1BB e 2B4 e é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 53.

[0095] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD16, 4-1BB, um ligante GS3 e NKp80 e é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 54.

[0096] Em várias modalidades, as construções de receptor quimérico são codificadas por um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico em que o domínio receptor extracelular compreende um segundo peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D, (por exemplo, um ou mais dentre MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 ou ULBP6. Dependendo da modalidade, o peptídeo que

liga ligantes nativos de NKG2D tem pelo menos 80% de homologia com a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, ou SEQ ID NO. 3.

[0097] Em várias modalidades, o polinucleotídeo é coexpresso com uma construção adicional que codifica uma interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15). Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 18. Em várias modalidades, o receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 19.

[0098] De acordo com várias modalidades, o receptor quimérico não compreende proteína ativadora de DNAX 10 (DAP10) e/ou o receptor quimérico não codifica um motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM).

[0099] Em várias modalidades, os polinucleotídeos aqui divulgados são mRNA. Adicionalmente, em várias modalidades, o polinucleotídeo aqui divulgado está ligado de modo operacional a pelo menos um elemento regulador para a expressão do receptor quimérico.

[00100] Estão também aqui previstos vetores que compreendem os polinucleotídeos aqui divulgados. Em várias modalidades, o polinucleotídeo está ligado de modo operacional a pelo menos um elemento regulador para expressão do receptor quimérico. Em várias modalidades, o vetor é um retrovírus.

[00101] Estão também aqui previstas células exterminadoras naturais geneticamente modificadas compreendendo qualquer um ou mais dentre os polinucleotídeos aqui divulgados. Em várias modalidades, as células exterminadoras naturais são para uso autólogo, enquanto em algumas modalidades elas são para uso alogênico.

[00102] Estão também aqui previstos métodos para aumentar a citotoxicidade de células NK em um mamífero que disso tenha necessidade, compreendendo administrar ao mamífero células NK, em que as referidas células NK expressam um receptor quimérico

codificado por um polinucleotídeo aqui divulgado.

[00103] Adicionalmente, são proporcionados métodos para tratamento ou prevenção de câncer ou de uma doença infecciosa em um mamífero que disso tenha necessidade, o referido método compreendendo administrar ao referido mamífero uma quantidade terapêuticamente eficaz de células NK, em que as referidas células NK expressam um receptor quimérico codificado por um polinucleotídeo aqui divulgado. Tal como acima divulgado, as células NK podem ser alogênicas ou autólogas.

[00104] É também aqui proporcionado um uso de um polinucleotídeo como aqui divulgado no fabrico de um medicamento para aumentar a citotoxicidade das células NK em um mamífero que disso tenha necessidade. Ademais, é proporcionado um uso de um polinucleotídeo no fabrico de um medicamento para o tratamento ou a prevenção de câncer ou de uma doença infecciosa em um mamífero que disso tenha necessidade.

[00105] Também é proporcionado o uso de um vetor compreendendo um polinucleotídeo aqui divulgado no fabrico de um medicamento para aumentar a citotoxicidade das células NK em um mamífero que disso tenha necessidade. Também é proporcionado o uso de um vetor compreendendo um polinucleotídeo aqui divulgado no fabrico de um medicamento para o tratamento ou a prevenção de câncer ou de uma doença infecciosa em um mamífero que disso tenha necessidade.

[00106] Também é proporcionado o uso de uma célula exterminadora natural geneticamente modificada isolada que expressa um receptor quimérico tal como aqui divulgado para aumentar a citotoxicidade das células NK em um mamífero que disso tenha necessidade. Também é proporcionado o uso de uma célula exterminadora natural geneticamente modificada isolada que expressa um receptor quimérico tal como aqui divulgado para o tratamento ou a

prevenção de câncer ou de uma doença infecciosa em um mamífero que disso tenha necessidade.

[00107] As composições e métodos relacionados sumarizados acima e estabelecidos em maior detalhe abaixo descrevem certas ações tomadas por um clínico; todavia, deve ser entendido que eles podem também incluir a instrução dessas ações por outra parte. Assim, ações tais como "administrar uma população de células NK que expressam um receptor quimérico" incluem "instruir a administração de uma população de células NK que expressam um receptor quimérico".

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00108] As descrições das figuras abaixo estão relacionadas com experimentos e resultados que representam modalidades não limitativas das invenções aqui divulgadas.

[00109] As FIGURAS 1A-1C mostram representações esquemáticas dos receptores quiméricos de acordo com várias modalidades aqui divulgadas. A FIGURA 1A mostra o NKG2D endógeno, a FIGURA 1B mostra NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$ , e a FIGURA 1C mostra NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$ .

[00110] As FIGURAS 2A-2B mostram representações esquemáticas dos receptores quiméricos de acordo com várias modalidades aqui divulgadas. A FIGURA 2A mostra NKG2D-CD16 e a FIGURA 2B mostra NKG2D-CD16-41BB.

[00111] As FIGURAS 3A-3B mostram mapas de plasmídeos ilustrando o ponto de inserção de certas construções de acordo com várias modalidades nos plasmídeos, é ilustrado um plasmídeo de Vírus de Células Estaminais de Murino (MSCV). A FIGURA 3A mostra construções de gene para NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  e NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$  que foram inseridas nos sítios de restrição EcoRI e NotI, com remoção da sequência IRES-GFP no vetor. A FIGURA 3B mostra os plasmídeos para NKG2D-CD16 e NKG2D-CD16-41BB que foram inseridos nos

sítios de restrição EcoRI e XhoI localizados no sítio de clonagem múltipla (MCS). A sequência IRES-GFP no vetor possibilita o rastreamento da eficiência de transdução.

[00112] As FIGURAS 4A-4C mostram dados relacionados com a expressão de NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  e NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$  em células NK. A FIGURA 4A mostra dados de citometria de fluxo ilustrando a percentagem de células NK com NKG2D-positivo após a transdução. A FIGURA 4B mostra um gráfico de pontos resumindo a percentagem de células NK com NKG2D-positivo. A FIGURA 4C mostra dados relacionados com a intensidade média de fluorescência (MFI) em um grupo diferente de células NK após a transdução.

[00113] As FIGURAS 5A-5C mostram dados relacionados com a citotoxicidade das várias construções geradas a partir de células NK do Doador 1, Doador 2, e Doador 3 (FIGURAS 5A, 5B e 5C, respectivamente) contra células REH cultivadas.

[00114] As FIGURAS 6A-6C mostram dados relacionados com a citotoxicidade das várias construções geradas a partir de células NK do Doador 1, Doador 2, e Doador 3 (FIGURAS 6A, 6B e 6C, respectivamente) contra células U-2 OS cultivadas.

[00115] As FIGURAS 7A-7B mostram dados relacionados com a produção de interferon-gama por células NK que expressam várias construções NKG2D na presença e na ausência de estimulação com células REH. A FIGURA 7A mostra a quantidade relativa de IFN $\gamma$  nos diferentes grupos de células NK com ou sem estimulação por células REH. A FIGURA 7B mostra níveis de IFN $\gamma$  entre diferentes grupos de células NK após estimulação (valores medianos representados).

[00116] As FIGURAS 8A-8C mostram dados relacionados com a expressão de NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  e NKG2D-CD16 em células NK. A FIGURA 8A mostra dados de citometria de fluxo ilustrando a percentagem de células NK com NKG2D-positivo após a transdução. A

FIGURA 8B mostra um gráfico de pontos resumindo a percentagem de células NK com NKG2D-positivo. A FIGURA 8C mostra dados relacionados com a intensidade média de fluorescência (MFI) em um grupo diferente de células NK após a transdução.

[00117] As FIGURAS 9A-9C mostram dados relacionados com a citotoxicidade das várias construções geradas a partir de células NK de 3 doadores (FIGURAS 9A, 9B e 9C, respectivamente) contra células REH cultivadas.

[00118] As FIGURAS 10A-10C mostram dados relacionados com a citotoxicidade das várias construções geradas a partir de células NK de 3 doadores (FIGURAS 10A, 10B e 10C, respectivamente) contra células U-2 OS cultivadas.

[00119] A FIGURA 11 mostra dados relacionados com a produção de interferon-gama por células NK que expressam várias construções NKG2D na presença e na ausência de estimulação com células REH.

[00120] As FIGURAS 12A-12B mostram dados relacionados com a expressão de NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  e NKG2D-CD16-41BB em células NK. A FIGURA 12A mostra dados de citometria de fluxo ilustrando a percentagem de células NK com NKG2D-positivo após a transdução. A FIGURA 12B mostra um histograma relacionado com a quantidade relativa de expressão de superfície das várias construções em células NK.

[00121] As FIGURAS 13A-13B mostram dados relacionados com o grau de citotoxicidade das várias construções NKG2d. A FIGURA 13A mostra o grau de citotoxicidade contra células REH cultivadas. A FIGURA 13B mostra o grau de citotoxicidade contra células U2OS cultivadas.

[00122] A FIGURA 14 representa esquematicamente mapas de construção de várias construções NKG2D de acordo com algumas modalidades aqui divulgadas.

[00123] A FIGURA 15 representa esquematicamente mapas de construção de construções NKG2D adicionais de acordo com algumas modalidades aqui divulgadas.

[00124] As FIGURAS 16A-16C mostram dados relacionados com a expressão de várias construções NKG2D em células NK. A FIGURA 16A mostra dados relacionados com a intensidade média de fluorescência (MFI) das várias construções NKG2D em células NK. A FIGURA 16B mostra dados de citometria de fluxo ilustrando a percentagem de células NK com NKG2D-positivo e CD56-positivo após transdução de várias construções NKG2D para as células NK de dois doadores (505 e 870). A FIGURA 16C mostra dados relacionados com a intensidade média de fluorescência (MFI) em células NK de 2 doadores sete dias após transdução.

[00125] A FIGURA 17 representa dados relacionados com a citotoxicidade das várias construções NKG2D 14 dias após transdução em células NK com um rácio E:T de 1:1.

[00126] As FIGURAS 18A-18B mostram dados relacionados com a expressão das várias construções NKG2D depois de transdução em células NK. A FIGURA 18A mostra dados relacionados com a intensidade média de fluorescência (MFI) em células NK sete dias após a transdução. A FIGURA 18B mostra dados relacionados com a mudança em MFI das várias construções NKG2D relativas às células NK transduzidas da simulação.

[00127] As FIGURAS 19A-19B mostram dados relacionados com a citotoxicidade das várias construções NKG2D. A FIGURA 19A mostra dados relacionados com a citotoxicidade das várias construções NKG2D transduzidas em células NK com um rácio E:T de 1:1. A FIGURA 19B mostra dados relacionados com a mudança percentual em citotoxicidade das várias construções NKG2D relativa às células NK transduzidas da simulação.

[00128] A FIGURA 20 representa dados relacionados com a citotoxicidade das várias construções NKG2D 14 dias após transdução em células NK com um rácio E:T de 1:1. Antes da análise, as células NK foram cultivadas em meio suplementado com 40 IU de IL-2/mL.

[00129] A FIGURA 21 representa dados relacionados com a citotoxicidade das várias construções NKG2D 10 dias após a transdução nas células NK do Doador 238 (com 4 dias de cultura em meio suplementado com 40 IU de IL-2/mL a cada dois dias) contra células REH cultivadas com rácios E:T de 1:1 e 1:2 durante duas horas.

[00130] A FIGURA 22 representa esquematicamente mapas de construção de construções NKG2D adicionais de acordo com modalidades aqui divulgadas.

[00131] As FIGURAS 23A-23B mostram dados relacionados com a persistência das várias construções NKG2D geradas a partir de células NK de dois diferentes doadores (Doador 61 e Doador 103 nas FIGURAS 23A e 23B, respectivamente). As células NK foram cultivadas em meio suplementado com 40 IU de IL-2/mL.

[00132] A FIGURA 24 mostra dados relacionados com a expressão das várias construções NKG2D. As células NK foram expandidas a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de 4 doadores saudáveis (224, 225, 362 e 363) e transduzidas com vírus direcionando a expressão das construções indicadas. Três dias após a transdução, as células NK foram coradas com um anticorpo anti-NKG2D marcado com fluorescência e foram analisadas usando citometria de fluxo. A expressão relativa de NKG2D foi avaliada por intensidade média de fluorescência (MFI) das células marcadas.

[00133] As FIGURAS 25A-25B mostram dados relacionados com a citotoxicidade de células NK transduzidas com várias construções NKG2D. As células NK foram expandidas a partir de PBMC de 4 doadores; Oito dias após a transdução, foi medida a citotoxicidade NK

contra células REH e HL60 cultivadas (FIGURAS 25A e 25B, respectivamente) com um rácio E:T de 1:1. As células NK foram cultivadas em meio suplementado com 40 IU de IL-2/mL, antes da análise.

[00134] As FIGURAS 26A-26C representam dados relacionados com a produção de interferon-gama (IFN $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) por células NK expressando várias construções NKG2D após estimulação durante a noite com células tumorais REH. Oito dias após transdução com as construções indicadas, foram estimuladas  $1 \times 10^5$  células NK com  $1 \times 10^5$  células REH em poços individuais de uma placa de fundo redondo de 96 poços; após incubação durante a noite, foram colhidos os sobrenadantes, e medidos os níveis de citocina contra padrões relevantes usando um dispositivo Meso Scale Discovery. A FIGURA 26A representa os níveis acumulados de IFN $\gamma$ , a FIGURA 26B representa os níveis de TNF $\alpha$ , e a FIGURA 26C representa os níveis de GM-CSF nos diferentes grupos de células NK a seguir à estimulação. Antes da análise, as células NK foram cultivadas em meio suplementado com 40 IU de IL-2/mL.

[00135] As FIGURAS 27A-27B mostram dados relacionados com a persistência das células NK de dois doadores (doadores 224 e 225 nas FIGURAS 27A e 27B, respectivamente) expressando as várias construções NKG2D 7, 14, e 21 dias após a transdução. Antes da análise, as células NK foram cultivadas em meio suplementado com 40 IU de IL-2/mL.

[00136] As FIGURAS 28A-28B mostram dados relacionados com a citotoxicidade de células NK transduzidas com as construções NKG2D indicadas. A citotoxicidade NK foi medida contra células U2OS transduzidas de modo estável para expressar Proteína Fluorescente Vermelha; foram cultivadas células U2OS com células NK com rácios

E:T de 1:4 e 1:2 (FIGURAS 28A e 28B, respectivamente). Foram contadas as células U2OS vivas a cada 60 minutos durante 72 horas usando um Sistema de Análise de Células Vivas Incucyte S3. Antes da análise, as células NK foram cultivadas em meio suplementado com 40 IU de IL-2/mL.

## DESCRIÇÃO DETALHADA

### *Generalidades*

[00137] A emergência e persistência de células aberrantes (incluindo células infectadas com vírus e malignas) ocultando muitas doenças é ativada por uma resposta imune insuficiente às referidas células aberrantes. Um objetivo da imunoterapia é iniciar ou aumentar a resposta do sistema imunológico do paciente, por exemplo, para potenciar a capacidade de células imunes, tais como células Exterminadoras Naturais (NK) para danificar, exterminar ou de outro modo inibir células danificadas ou doentes. Uma abordagem da imunoterapia é a expressão recombinante de receptores quiméricos em células imunes para o reconhecimento do alvo e a destruição das células aberrantes. No geral, os receptores quiméricos compreendem um domínio receptor extracelular que reconhece ligantes em células-alvo, um domínio transmembranar de ancoragem, e um domínio efetor que transduz sinais de ativação na ligação do ligante. Algumas modalidades aqui divulgadas utilizam receptores quiméricos que têm essa estrutura geral, ou que têm variações nessa estrutura geral. Adicionalmente, em várias modalidades, o domínio transmembranar e o domínio efetor são peptídeos separados fundidos um no outro. Em várias outras modalidades, o domínio transmembranar e o efetor derivam do mesmo peptídeo. Em algumas dessas modalidades, os domínios transmembranar e efetor compreendem um único peptídeo (por exemplo, um peptídeo que passa através da membrana e está também posicionado para iniciar uma cascata de sinalização). Tal como

discutido em maior detalhe abaixo, truncamentos, mutações, elementos ligantes/espaçadores adicionais, dímeros, e semelhantes, são usados para gerar construções de receptor quimérico que exibem um grau desejado de expressão em uma célula imune (por exemplo, célula NK), induzir atividade citotóxica da célula NK, equilibrada com um grau de avidéz do alvo que evita efeitos adversos em células não alvo. A expressão recombinante de receptores quiméricos tal como aqui divulgados na superfície de células imunes pode redirecionar a identificação do alvo de células imunes para células aberrantes de interesse bem como aumentar a ativação imune no engajamento.

#### *Células NK para Imunoterapia*

[00138] Uma abordagem de imunoterapia envolve a administração em pacientes de células T modificadas para expressar receptores quiméricos para obter uma resposta imune positiva. Contudo, um inconveniente desta abordagem é o de ela necessitar de usar células autólogas para prevenir a indução da doença do enxerto-versus-hospedeiro no paciente. Tal como é proporcionado em várias modalidades aqui divulgadas, composições compreendendo células NK modificadas beneficiam de várias vantagens. Por exemplo, tanto as células autólogas como as alogênicas que derivam de um doador podem ser utilizadas com uma abordagem de células NK. Adicionalmente, de acordo com várias modalidades, as células NK modificadas tal como aqui previsto não aumentam significativamente a citotoxicidade contra células normais. Ademais, as células NK têm um efeito citotóxico significativo, uma vez ativadas. Em vista disso, não é expectável que as células NK modificadas tal como aqui previstas, sejam capazes de elevar mais aquele efeito citotóxico, assim proporcionando meios ainda mais eficazes de exterminar seletivamente células doentes alvejadas. Assim, em várias modalidades, é proporcionado um método de tratamento ou prevenção do câncer ou de

uma doença infecciosa, compreendendo administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de células NK que expressam os receptores quiméricos aqui descritos. Em uma modalidade, as células NK administradas são células autólogas. Em uma outra modalidade, as células NK administradas são células derivadas de um doador (alógenas).

[00139] Em várias modalidades, o engajamento e a ativação de uma célula NK recombinante (por exemplo, por ligação a um ligante em uma célula-alvo) que expressa um receptor quimérico leva à direta exterminação da célula aberrante e/ou estressada (por exemplo, células tumorais, células infectadas por vírus, etc.) por citólise. Assim, em várias modalidades, é proporcionado um método de aumento da citotoxicidade de células NK, compreendendo administrar células NK modificadas para expressar os receptores quiméricos aqui descritos. Em uma modalidade, as células NK administradas são células autólogas. Em uma outra modalidade, as células NK são células derivadas de um doador (alógenas). Em várias modalidades, células NK modificadas conduzem a destruição ou inibição indireta de células estressadas e/ou aberrantes (por exemplo, células tumorais, células infectadas por vírus, etc.).

#### *Domínios de Ligação a ligantes*

[00140] Como mencionado acima, em várias modalidades, células NK reconhecem e destroem células aberrantes, incluindo células tumorais e células infectadas com vírus. A atividade citotóxica destas células imunes inatas é regulada pelo equilíbrio da sinalização de receptores inibitórios e ativadores, respectivamente, que residem na superfície da célula. O primeiro liga moléculas próprias expressas na superfície de células saudáveis enquanto o último liga ligantes expressos em células aberrantes. O engajamento aumentado de receptores ativadores relativo a receptores inibitórios conduz a ativação

de células NK e lise de células-alvo. O membro D do Grupo de Exterminadores Naturais (NKG2D) é um importante receptor de ativação de células NK que reconhece um número de ligantes expresso em células estressadas ou aberrantes. A expressão de superfície de vários ligantes NKG2D é geralmente baixa em células saudáveis, mas é sobrerregulada na transformação maligna ou infecção viral. Exemplos não limitativos de ligantes reconhecidos por NKG2D incluem, mas não estão limitados a, MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 e ULBP6, bem como outras moléculas expressas em células-alvo que controlam a função citolítica ou citotóxica de células NK.

[00141] A capacidade do NKG2D para reconhecer uma pluralidade de marcadores de superfície de estresse e infecção celular faz deste um componente potencialmente útil de uma abordagem de imunoterapia baseada em receptor quimérico. Contudo, o uso de NKG2D como receptor quimérico é complicado por sua relação com o parceiro DAP10. O NKG2D é uma glicoproteína transmembranar tipo II que forma homodímeros e em montagem com dois homodímeros de proteína ativadora de DNAX 10 (DAP10) produz complexos hexaméricos na superfície da membrana. Esta associação NKG2D-DAP10 é necessária tanto para a expressão de superfície de membrana de NKG2D endógeno como para transdução do sinal de ativação na ligação do ligante. Em várias modalidades, é usado um comprimento completo de NKG2D. Em uma modalidade, o comprimento completo de NKG2D inclui a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 1. De acordo com várias modalidades aqui divulgadas, são proporcionados polinucleotídeos que codificam receptores quiméricos, em que o domínio receptor extracelular é um fragmento de NKG2D ao qual faltam seus domínios nativos transmembranar ou intracelular ainda que vantajosamente retenha sua capacidade de ligar ligantes nativos de NKG2D, bem como transduzir sinais de ativação ao ligar com o ligante.

Assim, em várias modalidades, o receptor quimérico codificado pelos polipeptídeos aqui divulgados não compreende DAP10. Em várias modalidades, o fragmento de NKG2D é codificado pela SEQ ID NO. 2. Em várias modalidades, o fragmento de NKG2D é pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% homólogo com o comprimento completo do tipo selvagem de NKG2D. Em várias modalidades, o fragmento pode ter uma ou mais mutações adicionais da SEQ ID NO. 2, mas mantém ou, em algumas modalidades, tem reforçada, a função ligação ao ligante. Em várias modalidades, o fragmento NKG2D é fornecido como um dímero, trímero, ou em outro formato concatamérico, essas modalidades fornecem atividade de ligação a ligante melhorada. Em várias modalidades, a sequência que codifica o fragmento de NKG2D é opcionalmente total ou parcialmente códon otimizada. Em uma modalidade, uma sequência que codifica um fragmento de NKG2D códon otimizado compreende a sequência da SEQ ID NO. 3. Adicionalmente, em várias modalidades, são usados peptídeos sinal. As espécies ou sequência do peptídeo sinal podem variar com a construção. Todavia, em várias modalidades, é usado um peptídeo sinal derivado de CD8. Em uma modalidade, o peptídeo sinal é de CD8a e tem a sequência da SEQ ID NO. 4. Em uma modalidade, uma sequência que codifica um fragmento de NKG2D códon otimizado compreende a sequência da SEQ ID NO. 68. Em várias modalidades, o fragmento pode ter uma ou mais mutações adicionais da SEQ ID NO. 68, mas mantém a função ligação a ligante. Em várias modalidades, o fragmento pode ter uma ou mais mutações adicionais da SEQ ID NO. 68, mas melhorou a função ligação a ligante.

#### *Domínios Transmembranar, Sinalização e Combinação*

[00142] Tal como acima mencionado, a estrutura geral de receptor quimérico antígeno compreende pelo menos um domínio

transmembranar, ligante o domínio de ligação ao ligante a domínio(s) de sinalização. Em várias modalidades, contudo, um domínio transmembranar pode também servir para a função de sinalização.

[00143] Em várias modalidades, o fragmento de NKG2D mantém pelo menos uma porção de seu domínio transmembranar normal. Em várias modalidades, o domínio transmembranar compreende pelo menos uma porção de CD8, que é uma glicoproteína transmembranar normalmente expressa em ambas as células T e células NK. Em várias modalidades, o domínio transmembranar compreende CD8 $\alpha$ , enquanto em várias modalidades CD8 $\beta$  é usado. Em várias modalidades, a "dobradiça" CD8 $\alpha$  tem a sequência da SEQ ID NO. 5. Em várias modalidades, o CD8 $\alpha$  pode ser truncado ou modificado, de modo a que ele seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homólogo com o CD8 $\alpha$  que tem a sequência da SEQ ID NO. 5. Em várias modalidades, o CD8 $\beta$  tem a sequência da SEQ ID NO. 6. Em várias modalidades, o CD8 $\beta$  pode ser truncado ou modificado, de modo a que ele seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homólogo com o CD8 $\beta$  que tem a sequência da SEQ ID NO. 6. Em várias modalidades, são usados dímeros de CD8 $\alpha$  e CD8 $\beta$ .

[00144] Em várias modalidades, o domínio transmembranar compreende CD16, que serve como domínio de sinalização também. O CD16 existe em duas isoformas, a e b (também conhecidas como receptor Fc gama IIIa e IIIb, respectivamente). Estes receptores ligam normalmente à porção Fc de anticorpos IgG que por sua vez ativam células NK. Assim, em várias modalidades, o domínio transmembranar compreende CD16a, enquanto em várias modalidades é usado o CD16b. Em várias modalidades, o CD16a tem a sequência da SEQ ID NO. 7. Em várias modalidades, o CD16a pode ser truncado ou

modificado, de modo a que ele seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homólogo com o CD16a que tem a sequência da SEQ ID NO. 7. Em várias modalidades, o CD16b tem a sequência da SEQ ID NO. 8. Em várias modalidades, o CD16b pode ser truncado ou modificado, de modo a que ele seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homólogo com o CD16b que tem a sequência da SEQ ID NO. 8. Em várias modalidades, são usados dímeros CD16a e CD16b. Em várias modalidades, as modificações para o domínio transmembranar CD16 compreendem resíduos de ácido nucleico adicionais para aumentar o comprimento do domínio. Alternativamente, o CD16 pode ser encurtado. As modificações ao comprimento de CD16 podem facilitar vantajosamente interações melhoradas ligante-receptor.

[00145] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende o domínio 2B4 de Receptor Exterminador Natural (referido aqui por "2B4", e também conhecido por CD244), o qual serve como domínio de sinalização também. O 2B4 é expresso em células NK e regula a exterminação restringida a complexos não principais de histocompatibilidade (MHC) através de interações entre este receptor e seus ligantes em células-alvo. Em várias modalidades, o domínio transmembranar compreende 2B4, enquanto em várias modalidades o domínio 2B4 é um domínio de sinalização intracelular. Em várias modalidades, o 2B4 tem a sequência da SEQ ID NO. 9. Em várias modalidades, o 2B4 pode ser truncado ou modificado, de modo a que ele seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homólogo com o 2B4 que tem a sequência da SEQ ID NO. 9. Em várias modalidades, é usado o 2B4 como o único domínio de sinalização/transmembranar na construção, contudo, em várias modalidades, o 2B4 pode ser usado

com um ou mais outros domínios. Por exemplo, combinações de CD16, 4-1BB e/ou 2B4 são usadas em algumas modalidades.

[00146] Em algumas modalidades, a sinalização é conseguida através de DAP10, tal como mencionado acima. Em várias modalidades, o fragmento de NKG2D associa-se com o DAP10 para prover sinais pró-citotóxicos à célula NK. Em várias modalidades, são usados dímeros de DAP10. Em várias modalidades, o domínio transmembranar compreende DAP10. Em várias modalidades, o DAP10 tem a sequência da SEQ ID NO. 10. Em várias modalidades, o DAP10 pode ser truncado ou modificado, de modo a que ele seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homólogo com o DAP10 que tem a sequência da SEQ ID NO. 10. Similarmente, em algumas modalidades, pode ser usado o DAP12, uma vez que ele pode também transduzir tais sinais. Em várias modalidades, o DAP12 tem a sequência da SEQ ID NO. 11. Em várias modalidades, o DAP12 pode ser truncado ou modificado, de modo a que ele seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homólogo com o DAP12 que tem a sequência da SEQ ID NO. 11. Em várias modalidades, são usados heterodímeros de DAP10 e DAP12.

[00147] Em várias modalidades, é fornecida sinalização através de 4-1BB (também conhecida como CD137 e membro 9 da superfamília de receptor de fator de necrose tumoral (TNFRSF 9)). 4-1BB é uma molécula de ponto de verificação imune coestimuladora, tipicamente funcionando como molécula estimuladora para células T ativadas (por exemplo, reticulação de 4-1BB melhora a proliferação de células T e atividade citolítica). Contudo, em várias modalidades, a função de 4-1BB é vantajosamente usada em conjunto com células NK. Em várias modalidades, o 4-1BB tem a sequência da SEQ ID NO. 12. Em várias modalidades, o 4-1BB pode ser truncado ou modificado, de modo a que

ele seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homólogo com o 4-1BB que tem a sequência da SEQ ID NO. 12. Em várias modalidades, 4-1BB é o único domínio de sinalização, mas tal como discutido acima, em várias modalidades, 4-1BB funciona inesperadamente bem em combinação com um ou mais dos outros domínios transmembranar/de sinalização aqui divulgados. Por exemplo, em várias modalidades, o CD16 em conjunto com 4-1BB proporciona efeitos de estimulação sinérgica, resultando em células NK particularmente eficazes (por exemplo, citotóxicas). Em várias modalidades, o DAP10 em conjunto com 4-1BB proporciona efeitos de estimulação sinérgica, resultando em células NK particularmente eficazes (por exemplo, citotóxicas). Em várias modalidades, o DAP10 em conjunto com 4-1BB e/ou 2B4 proporciona efeitos de estimulação sinérgica, resultando em células NK particularmente eficazes (por exemplo, citotóxicas). Resultam, em várias modalidades, outras características melhoradas +tais como expressão melhorada, persistência melhorada e semelhantes.

[00148] Em várias modalidades, o domínio de sinalização compreende pelo menos uma porção do complexo receptor CD3 de células T. O complexo receptor de células T compreende múltiplas subunidades, incluindo as subunidades zeta, alfa, beta, gama, delta e épsilon. Em várias modalidades, as células NK modificadas de acordo com várias modalidades aqui divulgadas compreendem pelo menos uma dessas subunidades (ou um seu fragmento). Em várias modalidades, o domínio de sinalização compreende a subunidade CD3 zeta. Em várias modalidades, o CD3 zeta tem a sequência da SEQ ID NO. 13. Em várias modalidades, o CD3 zeta pode ser truncado ou modificado, de modo a que ele seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homólogo com o CD3 zeta que tem a sequência da SEQ ID NO. 13. Em

várias modalidades, o CD3 zeta está mutado (por exemplo, mutações, inserções ou deleções de aminoácido) de um modo em que o domínio não é mais consistente com o motivo de ativação do imunorreceptor canônico baseado em tirosina ou motivo ITAM. Assim, em várias modalidades, as células NK compreendem um receptor modificado que não contém um motivo ITAM. Em algumas modalidades, as células NK modificadas resultantes exibem citotoxicidade particularmente melhorada contra células-alvo, com efeitos secundários adversos limitados ou reduzidos. Isto resulta, em várias modalidades, das interações sinérgicas das várias porções do receptor quimérico que são usadas nessa dada modalidade. Em várias modalidades, o CD3zeta em conjunto com 4-1BB proporciona efeitos de estimulação sinérgica, resultando em células NK particularmente eficazes (por exemplo, citotóxicas). Em várias modalidades, o CD3zeta em conjunto com 2B4 proporciona efeitos de estimulação sinérgica, resultando em células NK particularmente eficazes (por exemplo, citotóxicas). Em várias modalidades, o CD3zeta em combinação com 2B4 e 4-1BB proporciona efeitos de estimulação sinérgica, resultando em células NK particularmente eficazes (por exemplo, citotóxicas). Em várias modalidades, os receptores quiméricos alavancam a dimerização do CD3zeta através de seu domínio transmembranar. Assim, em várias modalidades, o domínio transmembranar compreende o domínio transmembranar CD3zeta (ou um seu fragmento). Em algumas modalidades, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais resíduos CD3zeta extracelulares (a "porção justa-membrana") estão diretamente adjacentes ao domínio transmembranar CD3zeta. Em algumas modalidades, o domínio transmembranar CD3zeta tem a sequência da SEQ ID NO. 69. Em várias modalidades, o domínio transmembranar CD3zeta pode ser truncado ou modificado, de modo a que ele seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo

menos 95% homólogo com o domínio transmembranar CD3zeta que tem a sequência da SEQ ID NO. 69. Em várias modalidades, as modificações para o domínio transmembranar CD3zeta compreendem resíduos de ácido nucleico adicionais para aumentar o comprimento do domínio. Em várias modalidades, o domínio transmembranar CD3zeta e a porção justa-membrana CD3zeta recruta o comprimento completo da molécula CD3zeta para a sinapse. Em várias modalidades, o recrutamento de CD3zeta nativo para o receptor modificado (quando comparado com um receptor sem um domínio transmembranar CD3zeta) é aumentado de cerca de 20%, de cerca de 30%, de cerca de 40%, de cerca de 50%, ou mais, dependendo da modalidade. Em várias modalidades, o domínio transmembranar CD3zeta está acoplado a um domínio efetor compreendendo um ou mais dentre CD16, NCR1, NCR2, NCR3, 4-1BB, NKp80, FcR $\gamma$ , CD3zeta e 2B4.

[00149] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um domínio CD28. Em várias modalidades, o domínio transmembranar compreende CD28, enquanto em várias modalidades o domínio CD28 é um domínio de sinalização intracelular, enquanto em várias modalidades o domínio CD28 é um domínio de sinalização transmembranar/intracelular. Em várias modalidades, o domínio transmembranar CD28 tem a sequência da SEQ ID NO. 105. Em várias modalidades, o domínio transmembranar CD28 pode ser truncado ou modificado, de modo a que ele seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homólogo com o CD28 que tem a sequência da SEQ ID NO. 105. Em várias modalidades, o domínio de sinalização intracelular CD28 tem a sequência da SEQ ID NO. 106. Em várias modalidades, o domínio de sinalização intracelular CD28 pode ser truncado ou modificado, de modo a que ele seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homólogo com o

CD28 que tem a sequência da SEQ ID NO. 106. Em várias modalidades, é usado o CD28 como o único domínio de sinalização/transmembrar na construção, contudo, em várias modalidades, o CD28 pode ser usado com um ou mais outros domínios. Por exemplo, combinações de CD28, OX40, 4-1BB e/ou CD3zeta são usadas em algumas modalidades.

[00150] Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um domínio OX40. Em várias modalidades, o domínio OX40 é um domínio de sinalização intracelular. Em várias modalidades, o domínio de sinalização intracelular OX40 tem a sequência da SEQ ID NO. 107. Em várias modalidades, o domínio de sinalização intracelular OX40 pode ser truncado ou modificado, de modo a que ele seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homólogo com o OX40 que tem a sequência da SEQ ID NO. 107. Em várias modalidades, é usado o OX40 como o único domínio de sinalização/transmembrar na construção, contudo, em várias modalidades, o OX40 pode ser usado com um ou mais outros domínios. Por exemplo, combinações de CD28, OX40, 4-1BB e/ou CD3zeta são usadas em algumas modalidades.

[00151] Ainda em outras modalidades, a porção de sinalização do receptor quimérico compreende uma porção de um ITAM, por exemplo um hemi-tam. Em várias modalidades, estas porções não fazem a sequência canônica ITAM, mas em vez disso compreendem uma porção que ainda pode transportar o sinal requerido para a citotoxicidade de células NK. Em várias modalidades, o hemi-tam tem a sequência da SEQ ID NO. 14 (em que X pode ser qualquer resíduo). Em várias modalidades, o hemi-tam pode ser truncado ou modificado, de modo a que ele seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homólogo com o hemi-tam que tem a sequência da SEQ ID NO. 14. Em várias

modalidades, a construção de receptor quimérico compreende o hemi-tam da SEQ ID NO. 14. Em várias modalidades, podem ser usados múltiplos hemi-tams, por exemplo em uma configuração da cabeça à cauda, da cauda à cabeça, da cabeça à cabeça, ou da cauda à cauda. Em várias modalidades, a presença de pelo menos um hemi-tam confere sinalização e citotoxicidade melhoradas às células NK compreendendo um receptor quimérico que utiliza o pelo menos um hemi-tam. Tal como discutido em maior detalhe abaixo, em vários receptores quiméricos está compreendido NKp80, que é um exemplo não limitativo de um hemi-tam.

[00152] Em várias modalidades, são usadas regiões de sinalização adicionais, incluindo, por exemplo, regiões de sinalização derivadas de receptores da família de moléculas de ativação linfocítica de sinalização (SLAM). Estes receptores incluem, mas não estão limitados a 2B4 (discutido acima). Receptores da família SLAM partilham um motivo consensual que é baseado em tirosina, em suas caudas citoplasmáticas. Esse motivo é S/TxYxxL/I, que são referidos como motivos de troca do imunorreceptor baseados em tirosina (ITSM) (SEQ ID NO. 15). Estes receptores transmitem sinais de ativação através da proteína associada a SLAM (SAP, codificada pelo gene SH2D1A), que recruta a tirosina quinase Fyn. Assim, de acordo com várias modalidades, a região de sinalização compreende uma sequência de polipeptídeos (ou o ácido nucleico codificando a mesma) compreendendo um motivo ITSM. Em várias modalidades, o motivo ITSM não necessita de ser totalmente codificado, mas a região de sinalização é capaz de transmitir um sinal de ativação através de SAP (ou outro caminho semelhante). Em várias modalidades, o motivo ISTM tem a sequência da SEQ ID NO. 15 (em que X pode ser qualquer resíduo de aminoácido). Em várias modalidades, o motivo ISTM pode ser truncado ou modificado, de modo a que ele seja pelo menos 70%,

pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homólogo com o motivo ISTM que tem a sequência da SEQ ID NO. 15. Em várias modalidades, o motivo ISTM compreende a sequência da SEQ ID NO. 15.

[00153] Adicionalmente a estas variações no receptor de NKG2D, o domínio transmembranar e o domínio de sinalização (e a combinação de domínios transmembranar/de sinalização), podem ser fornecidas moléculas de coativação adicionais em várias modalidades. Por exemplo, em várias modalidades, as células NK são modificadas para expressar a interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15). Em tais modalidades, a presença da mbIL15 nas células NK funciona para melhorar ainda mais os efeitos citotóxicos das células NK por reforçar de maneira sinérgica a proliferação e longevidade das células NK. Em várias modalidades, a mbIL15 tem a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 16. Em várias modalidades, a mbIL15 pode ser truncada ou modificada, de modo a que ela seja pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a sequência da SEQ ID NO. 16. Em várias modalidades, a mbIL15 tem a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 17. Em conjunto com os receptores quiméricos aqui divulgados, tais modalidades proporcionam composições de células NK particularmente eficazes para alvejar e destruir células-alvo particulares.

#### *Construções de Receptores Quiméricos*

[00154] Em vista da descrição aqui fornecida, há uma variedade de receptores quiméricos que podem ser gerados e expressos em células NK para alvejar e destruir células-alvo particulares, tais como células doentes ou cancerosas. Exemplos não limitativos de tais receptores quiméricos são discutidos em maior detalhe abaixo.

[00155] Tal como discutido acima, porções do complexo receptor de células T, em particular CD3zeta, servem como ativadores potentes de

cascatas de sinalização imune. Da mesma forma, o receptor 4-1BB, um membro da superfamília de fator de necrose tumoral, ativa células NK na ligação com o ligante. Em várias modalidades, estes dois componentes de sinalização atuam de uma maneira sinérgica para ativar células NK na ligação de um ligante ao receptor quimérico. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD8a/4-1BB/CD3zeta, que compreende um domínio receptor extracelular de um fragmento NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma região transmembranar CD8, e um domínio efetor compreendendo os domínios de sinalização de 4-1BB e CD3zeta. Em uma modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 18. Em uma modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 108. Ainda em uma outra modalidade, o receptor quimérico NKG2D-CD8a-4-1BB-CD3zeta compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 19. Em várias modalidades, esta construção é particularmente eficaz quando as células NK expressam em simultâneo mbIL15, a mbIL15 proporciona um efeito sinérgico adicional com relação à ativação e à natureza citotóxica das células NK. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 18 (tal como, por exemplo, a SEQ ID NO: 108), mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 18. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 18 (tal como, por exemplo, a SEQ ID NO: 108), o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK.

[00156] O receptor 2B4 possui vários motivos de troca do imunorreceptor baseados em tirosina (ITSM) e tem o potencial para

transduzir sinais de ativação. Da mesma forma, a sinalização através do receptor 4-1BB, um membro da superfamília de fator de necrose tumoral, também ativa células NK na ligação com o ligante. Assim, tirando proveito da capacidade de sinalização destas moléculas para cooperar na geração de células NK citotóxicas inesperadamente eficazes, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD8a/2B4/4-1BB, que compreende um domínio receptor extracelular de um fragmento NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma região transmembranar CD8a, e um domínio efetor compreendendo os domínios de sinalização de 4-1BB e 2B4. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15.

[00157] Em várias modalidades, são usadas combinações de 2B4 com CD3zeta com células NK para gerar citotoxicidade melhorada contra células-alvo. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD8a/2B4/CD3zeta, que compreende um domínio receptor extracelular de um fragmento NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma região transmembranar CD8a, e um domínio efetor compreendendo os domínios de sinalização de CD3zeta e 2B4. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15. Tal como discutido acima, o 4-1BB, como o CD3zeta e o 2B4, pode funcionar como um potente ativador de cascatas de sinalização imune. Em várias modalidades, estes três componentes de sinalização atuam de uma maneira sinérgica para ativar células NK na ligação de um ligante ao receptor quimérico. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD8a/4-1BB/2B4/CD3zeta, que compreende um domínio receptor extracelular de um fragmento NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma região

transmembranar CD8, e um domínio efetor compreendendo os domínios de sinalização de 4-1BB, 2B4 e CD3zeta. Em uma modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 58. Ainda em uma outra modalidade, o receptor quimérico NKG2D-CD8a-4-1BB-CD3zeta compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 59. Em várias modalidades, esta construção é particularmente eficaz quando as células NK expressam em simultâneo mbIL15, a mbIL15 proporciona um efeito sinérgico adicional com relação à ativação e/ou à natureza citotóxica das células NK. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 58, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 58. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 58, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK.

[00158] Em várias modalidades alternativas, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD8a/DAP10/4-1BB, que compreende um domínio receptor extracelular de um fragmento NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma região transmembranar CD8a, e um domínio efetor compreendendo os domínios de sinalização de 4-1BB e DAP10. Em uma modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 60. Ainda em uma outra modalidade, o receptor quimérico NKG2D-CD8a-4-1BB-DAP10 compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 61. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15. Em várias modalidades, esta construção é particularmente eficaz quando as células NK expressam em simultâneo mbIL15, a

mbIL15 proporciona um efeito sinérgico adicional com relação à ativação e à natureza citotóxica das células NK. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 60, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 60. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 60, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Ademais, tal como discutido acima, o 2B4, como o DAP10 e o 4-1BB, é um potente ativador de cascatas de sinalização imune. Em várias modalidades, estes três componentes de sinalização atuam de uma maneira sinérgica para ativar células NK na ligação de um ligante ao receptor quimérico. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD8a/4-1BB/DAP10/2B4, que compreende um domínio receptor extracelular de um fragmento NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma região transmembranar CD8, e um domínio efetor compreendendo os domínios de sinalização de 4-1BB, 2B4 e DAP10, em que 4-1BB é seguido de DAP10, e DAP10 é seguido de 2B4. Em uma modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 62. Ainda em uma outra modalidade, o receptor quimérico NKG2D-CD8a-4-1BB-CD3zeta compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 63. Em várias modalidades, esta construção é particularmente eficaz quando as células NK expressam em simultâneo mbIL15, a mbIL15 proporciona um efeito sinérgico adicional com relação à ativação e à natureza citotóxica das células NK. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 62, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo

menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 62. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 62, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Em várias outras modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD8a/4-1BB/2B4/DAP10, que compreende um domínio receptor extracelular de um fragmento NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma região transmembranar CD8, e um domínio efetor compreendendo os domínios de sinalização de 4-1BB, 2B4 e DAP10, em que 4-1BB é seguido de 2B4, e 2B4 é seguido de DAP10. Em uma modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 64. Ainda em uma outra modalidade, o receptor quimérico NKG2D-CD8a-4-1BB-CD3zeta compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 65. Em várias modalidades, esta construção é particularmente eficaz quando as células NK expressam em simultâneo mbIL15, a mbIL15 proporciona um efeito sinérgico adicional com relação à ativação e à natureza citotóxica das células NK. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 64, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 64. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 64, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK.

[00159] Em várias modalidades adicionais, os domínios transmembranar e efetor (e função associada) do receptor quimérico são derivados do mesmo peptídeo. O CD16 é um potente receptor ativador expresso na superfície de células NK. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um

receptor quimérico NKG2D/CD16, que compreende um domínio receptor extracelular de um fragmento NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D e um peptídeo CD16 compreendendo tanto a região transmembranar como o domínio efetor intracelular. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 23. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 24. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 23, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 23. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 23, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15.

[00160] Em várias modalidades adicionais, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD16/4-1BB, em que o domínio de sinalização de 4-1BB atua como um segundo transdutor de ativação de sinais no domínio efetor. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15.

[00161] O CD3zeta dimeriza através de seu domínio transmembranar. Assim, em várias modalidades, são fornecidos receptores quiméricos em que um domínio transmembranar CD3zeta recruta o comprimento completo de moléculas CD3zeta para a sinapse. Em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico que compreende um fragmento NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma dobradiça CD8a, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais resíduos extracelulares CD3zeta (a "porção justa-membrana")

diretamente adjacentes a um domínio transmembranar CD3zeta, e um domínio efetor compreendendo um ou mais dentre CD16, NCR1, NCR2, NCR3, 4-1BB, NKp80, FcR $\gamma$ , CD3zeta e 2B4.

[00162] Em várias modalidades, são fornecidos receptores quiméricos em que um domínio transmembranar CD3zeta está acoplado a um domínio efetor compreendendo um ou ambos dos 4-1BB e CD16. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD3zetaTM/4-1BB, que compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 78. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 79. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 78, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 78. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 78, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15.

[00163] Em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD3zetaTM/CD16/4-1BB, que compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo CD16 seguido de 4-1BB. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 70. Ainda em outra modalidade, este receptor

quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 71. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 70, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 70. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 70, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15. Ademais, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD3zetaTM/4-1BB/CD16, que compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB seguido de CD16. Em algumas modalidades, o domínio efetor compreende ainda um ligante GS3. Em algumas modalidades, o ligante GS3 está posicionado entre 4-1BB e CD16. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 84. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 85. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 84, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 84. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 84, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15. Ademais, em várias modalidades, são

fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2Dx2/CD3zetaTM/CD16/4-1BB, que compreende o fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a um ligante GS3, um fragmento de NKG2D adicional, uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo um CD16 e 4-1BB. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 72. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 73. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 72, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 72. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 72, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15.

[00164] Em várias modalidades, são fornecidos receptores quiméricos em que um domínio transmembranar CD3zeta está acoplado a um domínio efetor compreendendo NKp80. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD3zetaTM/CD16/4-1BB/NKp80, receptor quimérico esse que compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo CD16, 4-1BB e NKp80. Em algumas modalidades, o domínio efetor compreende ainda um domínio GS3. Em algumas modalidades, o ligante GS3 está posicionado entre 4-1BB e NKp80. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 74. Ainda em outra

modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 75. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 74, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 74. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 74, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15. Ademais, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico 2xNKG2D/CD3zetaTM/ CD16/4-1BB/NKp80, que compreende o fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a um ligante GS3, um fragmento de NKG2D adicional, uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo um CD16, 4-1BB e NKp80. Em algumas modalidades, o domínio efetor compreende ainda um domínio GS3. Em algumas modalidades, o ligante GS3 está posicionado entre 4-1BB e NKp80. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 76. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 77. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 76, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 76. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 76, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção

pode opcionalmente ser coexpressa com mblL15. Ademais, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD3zeta<sup>TM</sup>/4-1BB/NKp80, que compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB e NKp80. Em algumas modalidades, o domínio efetor compreende ainda um ligante GS3. Em algumas modalidades, o ligante GS3 está posicionado entre 4-1BB e NKp80. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 82. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 83. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 82, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 82. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 82, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mblL15.

[00165] Em várias modalidades, são fornecidos receptores quiméricos em que um domínio transmembranar CD3zeta está acoplado a um domínio efetor compreendendo CD3zeta. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD3zeta<sup>TM</sup>/4-1BB/CD3zeta, que compreende um fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB e CD3zeta. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da

SEQ ID NO: 80. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 81. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 80, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 80. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 80, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15.

[00166] Em várias modalidades, são fornecidos receptores quiméricos em que um domínio transmembranar CD3zeta está acoplado a um domínio efetor compreendendo FcRγ. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD3zetaTM/4-1BB/FcRγ, que compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta e um domínio efetor compreendendo 4-1BB e FcRγ. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 86. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 87. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 86, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 86. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 86, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser

coexpressa com mbIL15.

[00167] Em várias modalidades, são fornecidos receptores quiméricos em que um domínio transmembranar CD3zeta está acoplado a um domínio efetor compreendendo CD28. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD3zeta<sup>TM</sup>/CD28/CD3zeta, que compreende um domínio receptor extracelular de fragmento de NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma dobradiça CD8a, uma região transmembranar CD3zeta, um domínio efetor intracelular compreendendo CD28 e CD3zeta. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 102. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 103. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 102, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 102. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 102, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15.

[00168] Em várias modalidades, são fornecidos receptores quiméricos em que o domínio extracelular compreende um fragmento de NKG2D acoplado a IL15. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico IL15/NKG2D/CD8a/4-1BB/CD3zeta, que compreende um domínio receptor extracelular de fragmento de NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D ligados a IL-15, uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, e um domínio efetor intracelular

compreendendo 4-1BB e CD3z. Em algumas modalidades, o domínio extracelular compreende ainda um ligante GS3. Em algumas modalidades, o ligante GS3 está posicionado entre IL15 e o domínio receptor extracelular de fragmento de NKG2D. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 88. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 89. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 88, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 88. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 88, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK.

[00169] Em várias modalidades, são fornecidos receptores quiméricos em que o domínio extracelular compreende um fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça curta de IgG4. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/IgG4/CD8a/4-1BB/CD3zeta, que compreende um domínio receptor extracelular de fragmento de NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma dobradiça curta IgG4, um domínio transmembranar CD8a, um domínio efetor intracelular compreendendo 4-1BB e CD3zeta. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 96. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 97. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 96, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%,

pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 96. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 96, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15.

[00170] Em várias modalidades, são fornecidos receptores quiméricos em que o domínio efetor compreende OX40. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD8a/OX40/CD3z, que compreende um domínio receptor extracelular de fragmento de NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a e um domínio efetor intracelular compreendendo OX40, e CD3z. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 90. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 91. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 90, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 90. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 90, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15. Em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/IgG4/CD8a/OX40/CD3zeta, que compreende um domínio receptor extracelular de fragmento de NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma dobradiça IgG4, um domínio transmembranar CD8a, um domínio efetor intracelular compreendendo

OX40 e CD3zeta. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 100. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 101. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 100, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 100. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 100, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15.

[00171] Em várias modalidades, são fornecidos receptores quiméricos compreendendo um peptídeo CD28 compreendendo tanto a região transmembranar como o domínio efetor intracelular. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD28/CD3zeta, que compreende um domínio receptor extracelular de fragmento de NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD28, e CD3zeta. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 92. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 93. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 92, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 92. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 92, o receptor quimérico mantém, ou em algumas

modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15. Em outras modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/CD28/CD3zeta/4-1BB, que compreende um domínio receptor extracelular de fragmento de NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD28, e 4-1BB e CD3zeta. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 94. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 95. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 94, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 94. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 94, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15. Em outras modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/IgG4/CD28/CD3zeta, que compreende um domínio receptor extracelular de fragmento de NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D, uma dobradiça IgG4, um domínio transmembranar/intracelular CD28, e CD3zeta. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 98. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 99. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 98, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo

menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 98. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 98, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15.

[00172] NCR1 (NKp46), NCR2 (NKp44) e NCR3 (NKp30) são receptores em células NK que transduzem sinais de ativação na ligação do ligante. Assim, em várias modalidades, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/NCR1, que compreende um domínio receptor extracelular de um fragmento NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D e um peptídeo NCR1 compreendendo tanto a região transmembranar como o domínio efetor intracelular. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 27. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 28. Em algumas modalidades, a sequência do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 30, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 27. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 27, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15.

[00173] Em várias modalidades adicionais, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/NCR1/4-1BB, em que o domínio de sinalização de 4-1BB atua como um segundo

transdutor de ativação de sinais no domínio efetor, levando a uma ativação e citotoxicidade sinergicamente melhoradas de células NK. Em várias modalidades adicionais, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/NCR2, que compreende um domínio receptor extracelular de um fragmento NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D e um peptídeo NCR2 compreendendo tanto a região transmembranar como o domínio efetor intracelular. Tal como o NCR1, em várias modalidades, estas construções são particularmente favoráveis para uso na criação de células NK que expressam o receptor quimérico, devido a seu tamanho relativamente pequeno e simplicidade na sequência. Contudo, elas mantêm a capacidade, em várias modalidades, de produzir células NK altamente eficazes, apesar da aparente simplicidade da construção. Adicionalmente, em várias modalidades, estas construções podem opcionalmente ser coexpressas com mbIL15.

[00174] Em várias modalidades adicionais, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/NCR3, que compreende um domínio receptor extracelular de um fragmento NKG2D que liga ligantes nativos de NKG2D e um peptídeo NCR3 compreendendo tanto a região transmembranar como o domínio efetor intracelular. Tal como o NCR1 e o NCR2, em várias modalidades, estas construções são particularmente favoráveis para uso na criação de células NK que expressam o receptor quimérico, devido a seu tamanho relativamente pequeno e simplicidade na sequência. Contudo, elas mantêm a capacidade, em várias modalidades, de produzir células NK altamente eficazes, apesar da aparente simplicidade da construção. Em uma modalidade, este receptor quimérico compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 29. Ainda em outra modalidade, este receptor quimérico é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 30. Em algumas modalidades, a sequência do receptor

quimérico pode variar da SEQ ID NO. 29, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 29. Em algumas modalidades, enquanto o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 29, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15.

[00175] Em várias modalidades adicionais, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/NCR2/4-1BB, em que o domínio de sinalização de 4-1BB atua como um segundo transdutor de ativação de sinais no domínio efetor, desse modo levando a um efeito sinérgico entre domínios de sinalização e células NK citotóxicas inesperadamente eficazes. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15.

[00176] Em várias modalidades adicionais, são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor quimérico NKG2D/NCR3/4-1BB, em que o domínio de sinalização de 4-1BB atua como um segundo transdutor de ativação de sinais no domínio efetor, desse modo levando a um efeito sinérgico entre domínios de sinalização e células NK citotóxicas inesperadamente eficazes. Adicionalmente, em várias modalidades, esta construção pode opcionalmente ser coexpressa com mbIL15.

[00177] Em algumas modalidades a expressão de superfície e eficácia dos receptores quiméricos aqui divulgados são melhoradas por variações em uma região espaçadora (dobradiça), que, em várias modalidades, estão localizadas no domínio extracelular entre o fragmento NKG2D e o domínio transmembranar. Em algumas modalidades, as regiões de dobradiça podem ser incluídas entre outras

porções do receptor quimérico (por exemplo, entre domínios intracelular e transmembranar, ou entre múltiplos domínios intracelulares). Em algumas modalidades, domínios que servem certos fins tal como divulgados em qualquer parte deste documento, podem servir funções adicionais. Por exemplo, em várias modalidades, CD8a é reaproveitado para servir como região de dobradiça (codificada, em várias modalidades, pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 5). Ainda em uma outra modalidade, a região de dobradiça compreende uma forma truncada de terminal N de CD8a e/ou uma forma truncada de terminal C de CD8a. Dependendo da modalidade, estes truncamentos podem ser pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 90% homólogos à dobradiça codificada pela SEQ ID NO. 5. Em várias modalidades adicionais, a dobradiça compreende extensões de resíduos de Glicina e Serina (aqui denominados "ligantes GS") onde GS<sub>n</sub> representa a sequência (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub> (SEQ ID NO. 42). Em uma modalidade, a dobradiça compreende ambos CD8a e GS<sub>3</sub>, e é codificada pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 32, por exemplo, onde n=3. Em modalidades adicionais, o valor de n pode ser igual a 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou maior dependendo da modalidade. Em várias modalidades, a dobradiça pode também ser estruturada como GS<sub>n</sub>/CD8a. Alternativamente, o ligante GS pode compreender a totalidade da região de dobradiça. Em uma dessas modalidades, a região de dobradiça é codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 33. Em outra dessas modalidades, a região de dobradiça é codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 34. Em várias modalidades, IgG4 é reaproveitado como região de dobradiça (codificada, em várias modalidades, pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 104). Ainda em uma outra modalidade, a região de dobradiça compreende uma forma truncada de terminal N

de IgG4 e/ou uma forma truncada de terminal C de IgG4. Dependendo da modalidade, estes truncamentos podem ser pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 90% homólogos à dobradiça codificada pela SEQ ID NO. 104.

[00178] Em várias modalidades, as construções de receptor quimérico utilizam um domínio de sinalização intracelular 2B4. Em várias modalidades, este domínio é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 35. Em algumas modalidades, o domínio 2B4 é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 36. Em algumas modalidades, a sequência do domínio intracelular 2B4 usada em um receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 36, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 36. Em várias modalidades, enquanto o domínio de sinalização do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 36, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK. Da mesma maneira, em várias modalidades, é usado um domínio intracelular NKp80 em várias modalidades. Em algumas modalidades, o domínio NKp80 é o único domínio de sinalização intracelular, enquanto em algumas modalidades, esse domínio é usado em conjunto com um ou mais domínios adicionais. Em várias modalidades, o NKp80 é codificado pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 37. Em algumas modalidades, o domínio NKp80 é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 38. Em algumas modalidades, a sequência do domínio intracelular NKp80 usado em um receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 38, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos

95% homóloga com a SEQ ID NO. 38. Em várias modalidades, enquanto o domínio de sinalização do receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 38, o receptor quimérico mantém, ou em algumas modalidades, tem melhorada, a função de ativação e/ou citotóxica das células NK.

[00179] Em várias modalidades, o receptor quimérico usa uma porção de um receptor beta-adrenérgico como domínio transmembranar. Em várias modalidades, a porção compreende uma porção do domínio extracelular beta-adrenérgico. Em várias modalidades, a porção é uma porção do domínio transmembranar do receptor beta-adrenérgico. Em várias modalidades, é usada uma combinação de um domínio extracelular e um domínio transmembranar do receptor beta adrenérgico. Dependendo da modalidade, as porções são do receptor beta-1 e/ou beta-2 adrenérgico. Em várias modalidades, é usada uma porção da região extracelular de terminal N do receptor beta-2 adrenérgico. Em várias modalidades, essa porção tem a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 39. Em algumas modalidades, o domínio beta-2 adrenérgico extracelular é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 40. Em algumas modalidades, a sequência do domínio beta-2 adrenérgico extracelular usado em um receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 39, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 39. Em várias modalidades, é usada a primeira hélice transmembranar do receptor beta-2 adrenérgico, opcionalmente em conjunto com o domínio beta-2 adrenérgico extracelular. Em várias modalidades, a primeira hélice transmembranar do receptor beta-2 adrenérgico tem a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 41. Em algumas modalidades, a primeira hélice transmembranar do receptor beta-2 adrenérgico é codificada pela sequência de ácido

nucleico da SEQ ID NO. 42. Em algumas modalidades, a sequência da primeira hélice transmembranar do receptor beta-2 adrenérgico usada em um receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 41, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 41.

[00180] Em uma modalidade, o receptor quimérico compreende CD8, NKG2D truncado, CD8a, domínio transmembranar, um domínio intracelular CD16 e 4-1BB como molécula coestimuladora. Em várias modalidades, uma tal construção é codificada pela SEQ ID NO. 25. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 25, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 25. Em várias modalidades, regiões de dobradiça que circundam CD8 são aumentadas por via de adição de ligantes GS (aqui divulgados), tais como GS3, como exemplo não limitativo. Em tais modalidades, a construção é codificada pelo ácido nucleico da SEQ ID NO. 43. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 43, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 43. Em várias modalidades, regiões de dobradiça que circundam CD8 são aumentadas por via de adição de ligantes GS (aqui divulgados) mais longos, tais como GS12, como exemplo não limitativo. Em várias modalidades, regiões de dobradiça são reduzidas por meio de truncamento do CD8. Por exemplo, em várias modalidades, a região de terminal N do CD8a é truncada em pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, ou pelo menos 50%. Em várias modalidades, a dobradiça CD8 é substituída por um ligante GS. Por exemplo, em várias modalidades, a região de dobradiça compreende um ligante GS3, desse

modo a construção compreende NKG2D-GS3-CD16-4-1BB. Em uma modalidade, uma tal construção é codificada pelo ácido nucleico da SEQ ID NO. 44. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 44, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 44. Em várias modalidades, não são usados nem o CD8 nem o GS<sub>n</sub>. Em uma modalidade, uma tal construção é codificada pelo ácido nucleico da SEQ ID NO. 45. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 45, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 45.

[00181] Tal como discutido acima, em várias modalidades, são utilizadas sequências códon otimizadas. Por exemplo, em várias modalidades, a códon otimização (completa ou parcial) é realizada no domínio NKG2D de um receptor quimérico. Em várias modalidades, contudo, a códon otimização não é realizada. Em várias modalidades, é fornecida uma construção de receptor quimérico com um domínio NKG2D extracelular que não é otimizado, uma dobradiça CD8a e um domínio de sinalização 4-1BB. Em várias modalidades, é fornecida uma construção de receptor quimérico com um domínio NKG2D extracelular que não é otimizado, uma dobradiça CD8a e domínio transmembranar, e um domínio de sinalização 4-1BB. Em várias modalidades, é fornecida uma construção de receptor quimérico com um domínio NKG2D extracelular que não é otimizado, uma dobradiça CD8a e domínio transmembranar, um domínio de sinalização 4-1BB e um domínio de sinalização 2B4. Em várias modalidades, uma tal construção tem a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 46. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 46, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo

menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 46.

[00182] Em várias modalidades, é fornecida uma construção de receptor quimérico com um domínio NKG2D extracelular que não é otimizado, um domínio transmembranar derivado de beta-adrenérgico e um domínio de sinalização 4-1BB. Em várias modalidades, é fornecida uma construção de receptor quimérico com um domínio NKG2D extracelular que não é otimizado, um domínio transmembranar derivado de beta-adrenérgico feito da região extracelular do receptor beta-2 adrenérgico e da primeira hélice transmembranar do receptor beta-2 adrenérgico e um domínio de sinalização 4-1BB. Em várias modalidades, é fornecida uma construção de receptor quimérico com um domínio NKG2D extracelular que não é otimizado, um domínio transmembranar derivado de beta-adrenérgico feito da região extracelular do receptor beta-2 adrenérgico e da primeira hélice transmembranar do receptor beta-2 adrenérgico, um domínio de sinalização 4-1BB e um domínio de sinalização 2B4. Em várias modalidades, uma tal construção tem a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 47. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 47, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 47.

[00183] Em várias modalidades, é fornecida uma construção de receptor quimérico com um domínio NKG2D extracelular que não é otimizado, uma dobradiça CD8a e um domínio de sinalização 2B4. Em várias modalidades, é fornecida uma construção de receptor quimérico com um domínio NKG2D extracelular que não é otimizado, uma dobradiça CD8a e domínio transmembranar, e ambos os domínios de sinalização 2B4 e 4-1BB. Em várias modalidades, é fornecida uma construção de receptor quimérico com um domínio NKG2D extracelular

que não é otimizado, uma dobradiça CD8a e domínio transmembranar, um domínio de sinalização 4-1BB e um domínio de sinalização 2B4, bem como um domínio NKp80. Em várias modalidades, um ligante GS, tal como um ligante GS3 liga os domínios 2B4 e NKp80. Em várias modalidades, uma tal construção tem a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 48. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 48, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 48.

[00184] Em várias modalidades, é fornecida uma construção de receptor quimérico com um domínio NKG2D extracelular que não é otimizado, uma dobradiça CD8a e um domínio de sinalização NKp80. Em várias modalidades, é fornecida uma construção de receptor quimérico com um domínio NKG2D extracelular que não é otimizado, uma dobradiça CD8a e domínio transmembranar, e um domínio de sinalização NKp80. Em várias modalidades, é fornecida uma construção de receptor quimérico com um domínio NKG2D extracelular que não é otimizado, uma dobradiça CD8a e domínio transmembranar, um domínio de sinalização 4-1BB e um domínio de NKp80. Em várias modalidades, um ligante GS, tal como um ligante GS3 unindo os domínios 4-1BB e NKp80. Em várias modalidades, uma tal construção tem a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 49. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 49, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 49.

[00185] Em várias modalidades, um domínio transmembranar CD8 está acoplado com um domínio intracelular 2B4. Em várias modalidades, um domínio transmembranar CD8 é substituído por um domínio 2B4 que é transmembranar e intracelular. Em várias

modalidades, o domínio transmembranar CD8 é substituído por 2B4 e 4-1BB é expresso em uma configuração proximal.

[00186] Em várias modalidades, um domínio de sinalização intracelular CD16 está acoplado a uma subunidade CD3zeta ou gama que são expressas exogenamente em *trans* para os receptores quiméricos aqui descritos. Tal como discutido acima, tais construções podem resultar em transdução de sinal inesperadamente melhorada, e portanto em um aumento inesperado nos efeitos citotóxicos das células NK.

[00187] Em várias modalidades, os receptores quiméricos são configurados para dimerizar, tal como discutido aqui em detalhes adicionais. Em várias modalidades, um receptor NKG2D truncado de acordo com várias modalidades aqui divulgadas é opcionalmente dimerizado. A dimerização pode compreender homodímeros ou heterodímeros, dependendo da modalidade. Em várias modalidades, a dimerização resulta em uma mudança de avidéz do receptor quimérico (e conseqüentemente das células NK que expressam o receptor) para melhor reconhecimento do ligante com um equilíbrio de coordenadas em efeitos tóxicos adversos reduzidos (ou ausentes). Ainda em outras modalidades, o domínio receptor extracelular compreende ainda um peptídeo sinal CD8a. Em várias modalidades, os receptores quiméricos utilizam dímeros internos, ou repetições de uma ou mais subunidades componentes. Por exemplo, em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um domínio extracelular NKG2D acoplado a um segundo domínio extracelular NKG2D, e uma região transmembranar/de sinalização (ou uma região transmembranar separada juntamente com uma região de sinalização separada). Em várias modalidades, um ou mais dos domínios extracelulares NKG2D são códon otimizados. Em várias modalidades, os dois domínios extracelulares NKG2D são separados por um ligante, por exemplo, um

ligante GSn. Em uma modalidade, é usado um ligante GS3. Em várias modalidades, o domínio transmembranar compreende uma região extracelular do receptor beta-adrenérgico. Em várias modalidades, o domínio transmembranar compreende uma região extracelular do receptor beta-2 adrenérgico e compreende ainda o primeiro domínio transmembranar do receptor beta-2 adrenérgico. Em várias modalidades, a região de sinalização compreende 4-1BB. Em várias modalidades, a região de sinalização compreende NKp80. Em várias modalidades, a região de sinalização compreende um domínio transmembranar-intracelular CD16. Em várias modalidades, a região de sinalização compreende 4-1BB em conjunto com um domínio transmembranar-intracelular NKp80 ou CD16. Em várias modalidades, o receptor quimérico tem a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 50. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 50, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 50. Em várias modalidades, o receptor quimérico tem a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 51. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 51, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 51. Em várias modalidades, o receptor quimérico tem a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 52. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 52, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 52. Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende uma região de dobradiça. Em várias modalidades, CD8a é reaproveitado para servir como região de dobradiça (codificada, em

várias modalidades, pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 5). Em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um domínio transmembranar CD8a. Em várias modalidades, a região de sinalização compreende 4-1BB em conjunto com 2B4 e CD3zeta. Em algumas modalidades, o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a um ligante GS3, um fragmento adicional de NKG2D, uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a e um domínio efetor compreendendo 4-1BB e CD3zeta. Em várias modalidades, o receptor quimérico tem a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 66. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 66, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 50. Em várias modalidades, o receptor quimérico receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 67. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 66, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 50.

[00188] Em várias modalidades, os receptores quiméricos são configurados para serem biespecíficos, tal como discutido aqui em detalhes adicionais. Em várias modalidades, um receptor NKG2D truncado de acordo com várias modalidades aqui divulgadas é biespecífico devido a um segundo peptídeo que liga, por exemplo, ligantes não NKG2D. Em várias modalidades, a biespecificidade resulta em uma mudança no alvejamento do receptor quimérico (e consequentemente das células NK que expressam o receptor) para melhor reconhecimento de células-alvo com um equilíbrio de coordenadas em efeitos tóxicos adversos reduzidos (ou ausentes), Ainda em outras modalidades, o domínio receptor extracelular

compreende ainda um peptídeo sinal CD8a. Por exemplo, em várias modalidades, o receptor quimérico compreende um domínio extracelular NKG2D acoplado a um segundo domínio extracelular que liga outros ligantes (não NKG2D), e uma região transmembranar/de sinalização (ou uma região transmembranar separada juntamente com uma região de sinalização separada). Em várias modalidades, os dois domínios extracelulares são separados por um ligante, por exemplo, um ligante GSn. Em uma modalidade, é usado um ligante GS3.

[00189] De acordo com várias modalidades aqui divulgadas, estão previstos receptores quiméricos adicionais que utilizam domínios NKG2D códon otimizados (opcionalmente, estas construções podem também ser replicadas com domínios não otimizados ou parcialmente otimizados). Por exemplo, em várias modalidades, um domínio extracelular códon otimizado está acoplado a uma dobradiça e a pelo menos dois domínios transmembranares/de sinalização. Em várias modalidades, os múltiplos domínios de sinalização proporcionam eficácia citotóxica melhorada das células NK porque são postas em movimento múltiplas cascatas de sinal não redundantes. Embora em algumas modalidades, estes múltiplos caminhos possam convergir em uma única molécula de sinalização (por exemplo, IFN $\gamma$ ), o efeito citotóxico global aumenta inesperadamente devido à magnitude global de moléculas de sinalização que ativam uma extremidade final citotóxica. Como exemplo não limitativo, em várias modalidades, um NKG2D está acoplado a uma dobradiça CD8a seguida de um domínio de sinalização transmembranar/intracelular CD16 e um domínio de sinalização 4-1BB. Em várias modalidades, esta construção compreende ainda domínios de sinalização 2B4. Em várias modalidades, um tal receptor quimérico tem a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 53. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 53, mas se mantém, dependendo

da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 53. Em modalidades adicionais, a construção NKG2D-CD8a-CD16IC/TM compreende ainda um domínio de sinalização NKp80. Em várias modalidades, uma tal construção compreende ainda um ligante GS3 entre os domínios 4-1BB e NKp80. Em várias modalidades, um tal receptor quimérico tem a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 54. Em várias modalidades, o receptor quimérico pode variar da SEQ ID NO. 54, mas se mantém, dependendo da modalidade, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% homóloga com a SEQ ID NO. 54.

[00190] Ainda em modalidades adicionais, certos componentes de um receptor quimérico podem ser substituídos por uma ou mais subunidades adicionais que resultam em eficácia melhorada (por exemplo, ativação ou citotoxicidade de células NK). Por exemplo, em uma modalidade, um domínio de sinalização intracelular CD16 pode ser substituído por uma repetição quad de DAP10 (por exemplo, 4xDAP10). Em uma modalidade adicional, um domínio de sinalização intracelular CD16 pode ser substituído por uma subunidade Zap70. Certas modalidades dessas, resultam em citotoxicidade de células NK inesperadamente melhorada.

[00191] Em várias modalidades adicionais, o domínio efetor compreende uma ou mais sequências hemi-ITAM de consenso para reforçar a transdução de sinalização de ativação na ligação ao ligante. Em modalidades adicionais, a inclusão de um ligante GS entre os domínios de sinalização de 4-1BB, CD16, NCR1, NCR2 e/ou NCR3 melhora a transdução de sinal. Além disso, em várias modalidades, um dos ou ambos os CD3 $\zeta$  e FcR $\gamma$  são expressos adicionalmente juntamente com os receptores quiméricos aqui descritos (quer na

mesma construção quer em construção separada), o que resulta em transdução de sinal inesperadamente melhorada, e, portanto, em um aumento inesperado nos efeitos citotóxicos das células NK. Dependendo da modalidade, a expressão modificada de um ou mais dos CD3 $\zeta$  e FcR $\gamma$  suplementa a expressão endógena destas moléculas por células NK, desse modo melhorando ainda mais a sinalização e a potência citotóxica final das células NK.

[00192] Opcionalmente, dependendo da modalidade, qualquer dos polinucleotídeos aqui divulgados, pode também codificar truncamentos e/ou variantes de uma ou mais das subunidades constituintes de um receptor quimérico, mantendo, porém, sua capacidade de direcionar células NK para células-alvo e em várias modalidades melhorar inesperadamente a citotoxicidade após a ligação. Adicionalmente, qualquer dos polinucleotídeos aqui divulgados pode também incluir opcionalmente sequências de nucleotídeos códon otimizadas que codificam as várias subunidades constituintes de um receptor quimérico. Tal como aqui são usados, aos termos "fragmento" e "truncado" devem ser atribuídos seus significados comuns e devem ser também incluídas as variantes de deleção de proteínas com terminal N e C.

[00193] Os polinucleotídeos que codificam receptores quiméricos aqui descritos podem ser inseridos em vetores para conseguir expressão de proteína recombinante em células NK. Em uma modalidade, o polinucleotídeo está ligado de modo operacional a pelo menos um elemento regulador para a expressão do receptor quimérico. Em modalidades específicas, elementos reguladores transcricionais heterólogos, tais como, por exemplo um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES) ou elemento intensificador, aos peptídeos aqui divulgados são utilizados para direcionar a transcrição do receptor quimérico. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende um

ou mais locais de clivagem de protease citosólica. Em algumas modalidades, o local de clivagem é reconhecido e clivado por uma protease citosólica. Em algumas modalidades, este local de clivagem é selecionado do grupo compreendendo um local de clivagem T2A, um local de clivagem P2A, um local de clivagem E2A, e um local de clivagem F2A. Dependendo da modalidade, as várias partes constituintes de um receptor quimérico podem ser entregues a uma célula NK em um único vetor, ou alternativamente em múltiplos vetores. Em algumas modalidades, uma construção de receptor quimérico é entregue em um único vetor, enquanto outro fator que melhora a eficácia do receptor quimérico, tal como a mbIL15, é entregue em um vetor separado. Em várias modalidades, um receptor quimérico e um fator que melhora a eficácia do receptor quimérico (por exemplo, a mbIL15), são entregues em um único vetor. Independentemente da quantidade de vetores usados, qualquer polinucleotídeo pode opcionalmente incluir uma sequência de etiquetas, permitindo a identificação da presença de células NK que expressam a construção. Por exemplo, em várias modalidades, é usada uma etiqueta FLAG (DYKDDDDK, SEQ ID NO. 55). Também estão disponíveis outras sequências de etiquetas, tais como uma etiqueta de poli-histidina (His-tag) (HHHHHH, SEQ ID NO. 56), HA-tag ou myc-tag (EQKLISEEDL; SEQ ID NO: 57). Alternativamente, é usada proteína verde fluorescente ou outro meio fluorescente. Podem também ser usadas combinações de tipos de etiqueta, para reconhecer individualmente subcomponentes de um receptor quimérico.

[00194] Em várias modalidades, o polinucleotídeo que codifica o receptor quimérico é um mRNA que pode ser introduzido nas células NK por eletroporação. Em outra modalidade, o vetor é um vírus, preferencialmente um retrovírus, que pode ser introduzido em células NK por transdução. Em várias modalidades, o vetor é um Vírus de

Célula Estaminal de Murino (MSCV). Em modalidades adicionais, podem ser usados outros vetores, por exemplo, podem ser usados lentivírus, adenovírus, vírus adeno-associado e semelhantes. Em várias modalidades, são usados retrovírus não derivados de HIV. O vetor escolhido vai depender de uma variedade de fatores incluindo, sem limitação, a força dos elementos reguladores transcricionais e a célula a ser usada para expressar uma proteína. O vetor pode ser um plasmídeo, fagomídeo, cosmídeo, vetor viral, fago, cromossomo artificial e semelhantes. Em modalidades adicionais, os vetores podem ser vetores de integração epissomal, não homologamente ou homologamente, que podem ser introduzidos nas células apropriadas por quaisquer meios adequados (transformação, transfecção, conjugação, fusão de protoplastos, eletroporação, precipitação com fosfato de cálcio, microinjeção direta, etc.) para os transformar. São usadas outras abordagens para induzir expressão de receptores quiméricos em células NK em várias modalidades, incluindo, por exemplo, a região promotora precoce de SV40, o promotor contido na repetição de terminal de comprimento 3' do vírus sarcoma Rous, o promotor de herpes timidina quinase, as sequências reguladoras do gene metalotioneína, um promotor de adenovírus (ADV), um promotor de citomegalovírus (CMV), o promotor do vírus papiloma bovino (BPV), o promotor do parovírus B19p6, o promotor de betalactamase, o promotor de tac, a região de promotor de nopalina sintetase ou o promotor do vírus do mosaico da couve flor 35S RNA, o promotor de ribulose bisfosfato carboxilase, o promotor de Gal 4, o promotor de ADC (álcool desidrogenase), o promotor de PGK (fosfoglicerol quinase), o promotor de MND sintético contendo a região U3 de um MoMuLV LTR modificado com o intensificador de vírus sarcoma mieloproliferativo e o promotor de fosfatase alcalina.

[00195] Células exterminadoras naturais podem ser modificadas

para expressar os receptores quiméricos aqui divulgados. As construções de expressão de receptor quimérico podem ser introduzidas nas células NK usando qualquer técnica conhecida de um perito na técnica. Em uma modalidade, os receptores quiméricos são expressos transitoriamente nas células NK. Em outra modalidade, os receptores quiméricos são expressos de modo estável nas células NK. Em uma modalidade adicional, as células NK são células autólogas. Ainda em uma outra modalidade, as células NK são células derivadas de um doador (allogênicas).

[00196] São ainda proporcionados aqui métodos de tratamento de um sujeito que tem câncer ou uma doença infecciosa compreendendo administrar ao sujeito uma composição compreendendo células NK modificadas para expressar um receptor quimérico como aqui divulgado, o receptor quimérico concebido para alvejar um marcador ou ligante expresso diferentemente nas células ou tecidos danificados ou doentes (por exemplo, expresso em um grau diferente quando comparado com células ou tecido normal). Tal como aqui são usados, aos termos "expressa", "expresso" e "expressão" é dado seu significado comum e devem referir-se a permitir ou causar a informação em uma sequência de gene ou polinucleotídeo para se manifestar, por exemplo, produzindo uma proteína por ativação das funções celulares envolvidas na transcrição e tradução de um gene correspondente ou sequência de DNA. O próprio produto da expressão, por exemplo, a proteína resultante, pode também ser referida como sendo "expressa" pela célula. Um produto da expressão pode ser caracterizado como intracelular, extracelular ou transmembranar. Ao termo "intracelular" deve ser atribuído seu significado comum e ele deve referir-se ao interior de uma célula. Ao termo "extracelular" deve ser atribuído seu significado comum e ele deve referir-se ao exterior de uma célula. Ao termo "transmembranar" deve ser atribuído seu significado comum e ele deve

referir-se a pelo menos uma porção de um polipeptídeo que está integrada em uma membrana celular. Ao termo "citoplasmático" deve ser atribuído seu significado comum e ele deve referir-se a residir dentro da membrana celular, fora do núcleo. Tal como aqui são usados, aos termos "tratar," "tratando," e "tratamento" no contexto de administração de uma terapia a um sujeito devem ser atribuídos seus significados comuns e eles devem referir-se aos efeitos benéficos que um sujeito obtém de uma terapia. Em certas modalidades, o tratamento de um sujeito com a(s) célula(s) geneticamente modificada(s) aqui descritas alcança um, dois, três, quatro ou mais dos seguintes efeitos, incluindo, por exemplo: (i) redução ou melhoria da severidade da doença ou sintoma com ela associado; (ii) redução da duração de um sintoma associado com uma doença; (iii) proteção contra a progressão de uma doença ou sintoma associado com ela; (iv) regressão de uma doença ou sintoma com ela associado; (v) proteção contra o desenvolvimento ou surgimento de um sintoma associado com uma doença; (vi) proteção contra a reincidência de um sintoma associado com uma doença; (vii) redução da hospitalização de um sujeito; (viii) redução da duração da hospitalização; (ix) um aumento da sobrevivência de um sujeito com uma doença; (x) uma redução na quantidade de sintomas associados com uma doença; (xi) uma intensificação, melhoria, suplementação, complementação ou aumento do(s) efeito(s) profilático(s) ou terapêutico(s) de outra terapia. A administração pode ser feita por uma variedade de vias, incluindo, sem limitação, intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intramuscular, intra-hepática, intraperitoneal e/ou entrega local em um tecido afetado. Doses de células NK podem ser prontamente determinadas para um dado sujeito com base em sua massa corporal, tipo e estado da doença, e agressividade desejada para o tratamento, mas variam, dependendo das modalidades, desde cerca de  $10^5$  células por kg até cerca de  $10^{12}$  células por kg (por exemplo,  $10^5$

-  $10^7$ ,  $10^7$ -  $10^{10}$ ,  $10^{10}$ -  $10^{12}$  e sobreposições destas gamas). Em uma modalidade, é usado um regime de dose escalonada. Em várias modalidades, é administrada uma gama de células NK, por exemplo, entre cerca de  $1 \times 10^6$  células/kg a cerca de  $1 \times 10^8$  células/kg. Dependendo da modalidade, podem ser tratados vários tipos de câncer ou doença infecciosa. Várias modalidades aqui previstas incluem tratamento ou prevenção dos seguintes exemplos não limitativos de cânceres incluindo, mas não estando limitado a, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), carcinoma adrenocortical, sarcoma de Kaposi, linfoma, câncer gastrointestinal, câncer do apêndice, câncer do sistema nervoso central, carcinoma basocelular, câncer do ducto biliar, câncer da bexiga, câncer dos ossos, tumores cerebrais (incluindo mas não estando limitado a astrocitomas, tumores da medula espinhal, glioma do tronco encefálico, craniofaringioma, ependimoblastoma, ependimoma, meduloblastoma, meduloepitelioma), câncer da mama, tumores brônquicos, linfoma de Burkitt, câncer cervical, câncer do cólon, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia mieloide crônica (CML), distúrbios mieloproliferativos crônicos, carcinoma ductal, câncer endometrial, câncer do esôfago, câncer gástrico, linfoma de Hodgkin, linfoma de não-Hodgkin, leucemia de células cabeludas, câncer de células renais, leucemia, câncer da boca, câncer nasofaríngeo, câncer do fígado, câncer do pulmão (incluindo mas não limitado a, câncer do pulmão de células não pequenas, (NSCLC) e câncer do pulmão de células pequenas), câncer pancreático, câncer do intestino, linfoma, melanoma, câncer ocular, câncer do ovário, câncer pancreático, câncer da próstata, câncer da pituitária, câncer uterino e câncer vaginal.

[00197] Ademais, várias modalidades aqui previstas incluem tratamento ou prevenção dos seguintes exemplos não limitativos de doenças infecciosas incluindo, mas não limitado a, infecções de origem

bacteriana podem incluir, por exemplo, infecções com bactérias de um ou mais dos seguintes gêneros: *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia* e *Chlamydophila*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Vibrio*, e *Yersinia*, e mutantes ou combinações destas. Em várias modalidades, são proporcionados métodos para tratar uma variedade de infecções virais, tais como as causadas por um ou mais vírus, tais como o adenovírus, vírus de Coxsackie, vírus de Epstein-Barr, vírus da hepatite A, vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, vírus do herpes simplex, tipo 1, vírus do herpes simplex, tipo 2, citomegalovírus, vírus do ebola, herpesvírus humano, tipo 8, HIV, vírus da gripe, vírus do sarampo, vírus da caxumba, papilomavírus humano, vírus parainfluenza, poliovírus, vírus da raiva, vírus sincicial respiratório, vírus da rubéola e vírus varicela-zoster.

[00198] Em algumas modalidades, são também aqui proporcionadas sequências de ácido nucleico e aminoácido que têm homologia de pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% (e gamas entre estes) quando comparadas com as respectivas sequências de ácido nucleico e aminoácido das SEQ ID NOS. 1-68 e que também exibem uma ou mais das funções quando comparadas com as respectivas SEQ ID NOS. 1-68: incluindo mas não limitado a, (i) proliferação melhorada, (ii) ativação melhorada, (iii) atividade citotóxica melhorada contra células que apresentam ligantes aos quais células NK abrigando receptores codificados pelas sequências de ácido nucleico e aminoácido se ligam, (iv) identificação melhorada do tumor ou sítios infectados, (v) reduzidos efeitos citotóxicos fora do alvo, (vi) secreção melhorada de citocinas e quimiocinas imunoestimuladoras (incluindo,

mas não limitado a IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-22, CCL3, CCL4, e CCL5), (vii) capacidade melhorada de estimular respostas imunes inatas e adaptativas adicionais, e (viii) combinações destas.

[00199] Adicionalmente, em várias modalidades, são proporcionadas sequências de aminoácido que correspondem a qualquer dos ácidos nucleicos aqui divulgados, enquanto representam a degenerescência do código do ácido nucleico. Além disso, essas sequências (quer de ácido nucleico quer de aminoácido) que variam daquelas expressamente divulgadas aqui, mas têm similaridade ou equivalência funcional estão também contempladas no escopo da presente descrição. O exposto acima inclui mutantes, truncamentos, substituições ou outros tipos de modificações.

[00200] Estão aqui previstos, de acordo com várias modalidades, polinucleotídeos que codificam receptores quiméricos, compreendendo um domínio receptor extracelular, em que o domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo 2 de Exterminadores Naturais (NKG2D), em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D, um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular. Em várias modalidades, o fragmento de NKG2D é codificado por um polinucleotídeo compreendendo a sequência SEQ ID NO. 2 ou 3 ou 68, ou um seu equivalente funcional. Em várias modalidades, o polinucleotídeo codifica um domínio efetor compreendendo CD16. Em várias modalidades, o polinucleotídeo codifica um domínio efetor compreendendo NCR1. Em várias modalidades, o polinucleotídeo codifica um domínio efetor compreendendo NCR2. Em várias modalidades, o polinucleotídeo codifica um domínio efetor compreendendo NCR3. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo codifica uma porção adicional de domínio efetor compreendendo 4-1BB.

Em várias modalidades, o polinucleotídeo codifica um receptor quimérico feito de NKG2D e CD16. Em várias modalidades, o polinucleotídeo codifica um receptor quimérico feito de NKG2D e NCR1. Em várias modalidades, o polinucleotídeo codifica um receptor quimérico feito de NKG2D e NCR2. Em modalidades adicionais, o polinucleotídeo codifica um receptor quimérico feito de NKG2D acoplado a CD16 e opcionalmente 4-1BB. Em várias modalidades, CD16 é substituído por NCR1, e em algumas modalidades, por NCR2, ou mesmo NCR3, dependendo da modalidade. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende ainda um ligante GS entre, por exemplo, 4-1BB e um dentre CD16, NCR1, NCR2, ou NCR3.

[00201] Em várias modalidades, o domínio receptor extracelular compreende ainda uma região de dobradiça. Em várias modalidades, a região de dobradiça compreende CD8a. Contudo, em modalidades adicionais, a região de dobradiça compreende ainda um ou mais ligantes que, em algumas modalidades, compreendem GS9, CD8a/GS3, CD8a truncado, GS3 e semelhantes.

[00202] Em várias modalidades, o domínio receptor extracelular compreende ainda um peptídeo sinal CD8a. Em várias modalidades, o domínio efetor compreende uma ou mais sequências hemi-ITAM. Em várias modalidades, o receptor quimérico não compreende proteína ativadora de DNAX 10 (DAP10). Em várias modalidades, o receptor quimérico não compreende um motivo ITAM, mas em vez disso utiliza uma região de sinalização alternativa, tal como um ITSM, hemi-tam ou outra região de coestimulação.

[00203] Em uma modalidade, é proporcionado um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular, em que o domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D), em que o peptídeo que

liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D, uma região transmembranar, em que a região transmembranar compreende CD8a e um domínio efetor, em que o domínio efetor compreende 4-1BB e CD3 zeta, em que o polinucleotídeo é coexpresso com uma construção adicional codificando interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15).

[00204] É também proporcionado, em várias modalidades, um polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico compreendendo um domínio receptor extracelular, em que o domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D), em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D, uma região transmembranar, em que a região transmembranar compreende CD8a, e um domínio efetor, em que o domínio efetor compreende 4-1BB e o domínio intracelular de 2B4 ou DAP10. O polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico tal como aqui descrito compreende um segundo peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D. Em várias modalidades, os ligantes nativos de NKG2D incluem, mas não estão limitados a, MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 ou ULBP6. Em várias modalidades, a porção do receptor quimérico que liga ligantes nativos de NKG2D tem pelo menos 80% de homologia com a SEQ ID NO: 1, 2, 3 ou 68.

[00205] Em várias modalidades, o polinucleotídeo proporcionado é um mRNA. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo está ligado de modo operacional a pelo menos um elemento regulador para a expressão do receptor quimérico. Tal como são aqui usados, aos termos "ácido nucleico", "nucleotídeo," e "polinucleotídeo" devem ser atribuídos seus significados comuns e devem incluir desoxirribonucleotídeos, ácidos desoxirribonucleicos, ribonucleotídeos e ácidos ribonucleicos e suas formas poliméricas, e inclui formas de cadeia simples ou dupla. Ácidos nucleicos incluem ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente,

tais como ácido desoxirribonucleico ("DNA") e ácido ribonucleico ("RNA") bem como ácidos nucleicos análogos. Análogos de ácido nucleico incluem aqueles que incluem bases que não ocorrem naturalmente, nucleotídeos que engajam em ligações com outros nucleotídeos que não a ligação fosfodiéster que ocorre naturalmente ou que incluem bases conectadas através de ligações que não as ligações fosfodiéster. Assim, análogos de ácido nucleico incluem, por exemplo e sem limitação, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforotriésteres, fosforamidatos, boranofosfatos, metilfosfonatos, quirometilfosfonatos, 2-O-metil-ribonucleotídeos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) e semelhantes. Tal como aqui é usado, ao termo "ligado de modo operacional," por exemplo no contexto de uma sequência reguladora de ácido nucleico estando "ligada de modo operacional" a uma sequência heteróloga de ácido nucleico, deve ser atribuído seu significado comum e deve significar que a sequência reguladora de ácido nucleico está colocada em uma relação funcional com a sequência heteróloga de ácido nucleico. No contexto de um IRES, "ligado de modo operacional a" se refere a uma ligação funcional entre uma sequência de ácido nucleico contendo um sítio interno de entrada do ribossomo e uma iniciação de uma sequência de codificação heteróloga em meio de uma sequência de mRNA resultando na tradução da sequência de codificação heteróloga. Tal como é aqui usado, ao termo "vetor" deve ser atribuído seu significado comum e ele deve referir-se a um veículo através do qual uma sequência DNA ou RNA (por exemplo, um gene estranho) pode ser introduzida em uma célula geneticamente modificada, de modo a transformar a célula geneticamente modificada e promover a expressão (por exemplo, transcrição e/ou tradução) da sequência introduzida. Vetores incluem vírus, plasmídeos, fagos, etc. Ao termo "receptor quimérico", tal como é aqui usado, deve ser atribuído seu significado comum e ele deve referir-

se a um receptor de superfície de célula compreendendo pelo menos dois domínios polipeptídeos não encontrados naturalmente juntos em uma única proteína. O termo "complexo de receptores quiméricos" tal como é aqui usado se refere a um primeiro polipeptídeo, que pode compreender pelo menos dois domínios de polipeptídeos em uma combinação que não é naturalmente encontrada em conjunto em uma única proteína, primeiro polipeptídeo este que está associado com um segundo polipeptídeo, por exemplo, um polipeptídeo adaptador, uma molécula de sinalização, ou uma molécula estimuladora. Termos adicionais relativos à geração e uso de receptores quiméricos tal como aqui divulgados são prontamente entendidos por um perito na técnica e podem também ser encontrados na Publicação Internacional WO 2014/117121 e na Patente dos EUA N.º 7,994,298, cada um dos quais incorporado em sua totalidade neste documento por referência.

[00206] De acordo com várias modalidades, é fornecido adicionalmente um vetor compreendendo o polinucleotídeo que codifica qualquer dos polinucleotídeos aqui previstos, em que os polinucleotídeos estão opcionalmente ligados de modo operacional a pelo menos um elemento regulador para expressão de um receptor quimérico. Em várias modalidades, o vetor é um retrovírus.

[00207] São aqui adicionalmente fornecidas células exterminadoras naturais modificadas compreendendo o polinucleotídeo, vetor ou receptores quiméricos tal como aqui divulgados. Em várias modalidades, estas células NK são adequadas para uso no tratamento ou prevenção da doença, tal como, por exemplo, câncer e/ou doença infecciosa.

## EXEMPLOS

### *Métodos*

[00208] Os seguintes métodos e materiais experimentais foram usados nos exemplos experimentais não limitativos abaixo divulgados.

*Linhas de Células e Condições de Cultura*

[00209] A linha de células de leucemia aguda linfoblástica REH, a linha de células de osteossarcoma humano U-2 OS e as células de fibroblasto de rim embrionário humano 293T (HEK 293T) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, Virgínia). As células REH foram mantidas e crescidas no Roswell Park Memorial Institute série 1640 (RPMI-1640; Gibco, Carlsbad, Califórnia) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS; Hyclone, Logan, Utah) e 1% de penicilina-estreptomicina. Ambas as células HEK 293T e U-2 OS foram mantidas e crescidas no Eagles Medium modificado por Dulbecco (DMEM; Hyclone) suplementadas com 10% de FBS e 1% de penicilina-estreptomicina. Todas as células de mamíferos foram incubadas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

*Plasmídeos de DNA*

[00210] Um plasmídeo de DNA contendo o receptor quimérico NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  foi feito como anteriormente descrito (ver Chang et al. Cancer Research, Vol. 73(6): 2013). Foi usada a união por sobreposição da reação em cadeia da polimerase de extensão (SOE-PCR) para fundir os domínios individuais que formam a construção NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$ . Essa construção foi então inserida no vetor retroviral do Vírus de Células Estaminais de Murino (MSCV) (Figura 3A). As construções para NKG2D-CD16 e NKG2D-CD16-41BB foram códon otimizadas e inseridas no vetor MSCV (Figura 3B) por GenScript (Nanjing, China). As sequências das construções foram verificadas por sequenciamento de DNA.

*Expansão de Células NK Humanas*

[00211] As células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) foram obtidas por centrifugação de densidade Ficoll de amostras de sangue de doadores adultos saudáveis. Para expandir as células NK, foram cultivadas PBMC com K562 geneticamente

modificado com ligação à membrana IL-15 e ligante 4-1BB (K562-mb15-41BBL). As células foram cultivadas em Meio de Crescimento de Células Estaminais (SCGM; Cell Genix, Freiburg, Alemanha) suplementada com 40IU de IL-2/mL a cada dois dias.

[00212] Após 7 dias de cultura, as células NK foram esgotadas de células T usando anti-CD3 Dynabeads (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia). As células NK foram então cultivadas em SCGM suplementado com 40-200 IU de IL-2/mL, a cada dois dias.

#### *Produção de Retrovírus e Transdução de Células NK*

[00213] A produção do retrovírus foi realizada por transfecção transitória de células HEK 293T com plasmídeos de empacotamento retroviral. As células HEK 293T foram primeiro semeadas em uma concentração de  $2,5 \times 10^6$  células em 12 mL de DMEM 18 horas antes da transfecção. As células foram então transfectadas com 3,5 µg de vetor MSCV contendo os respectivos receptores quiméricos NKG2D (construções não limitativas são ilustradas esquematicamente nas Figuras 1B-1C e 2A-2B), 3,5 µg de pEQ-PAM3, e 3,0 µg de pRDF. Para controle, foi usado o vetor MSCV vazio contendo GFP. Foi usado o Reagente de Transfecção X-tremeGENE 9 DNA (Roche, Basel, Suíça) para a transfecção. O DMEM foi substituído com RPMI-1640 condicionado 24 horas após a transfecção.

[00214] A transdução do transgene de receptor quimérico NKG2D em células NK foi feita 18 horas após a mudança de meio. As células NK foram primeiro suspensas em uma concentração de  $0,25 \times 10^6$  células em 2 mL de RPMI-1640 condicionado. As células foram seguidamente semeadas em tubos revestidos RetroNectin (TaKaRa, Otsu, Japão). O RPMI-1640 contendo o retrovírus (sobrenadante do vírus) foi colhido das culturas de células HEK 293T e foi adicionado às culturas meio condicionado fresco. O sobrenadante viral foi suplementado com 200 IU de IL-2/mL e foram dispensados 3 mL do

sobrenadante viral em cada tubo revestido RetroNectin (contendo as células NK semeadas). De acordo com certas modalidades de produção de células NK, foram transduzidas seis vezes células NK semeadas, uma vez a cada 12 horas com meio viral fresco. As células NK transduzidas foram então colhidas 48 horas após a última transdução, e cultivadas em SCGM com a adição de 200 IU de IL-2/mL a cada dois dias. As células NK transduzidas foram usadas para experimentos 14 a 28 dias após a expansão.

*Detecção da Expressão de Receptor Quimérico por Citometria de Fluxo*

[00215] As células NK transduzidas foram lavadas uma vez com solução salina tamponada com fosfato contendo albumina, e foram adicionados 2 µL de soro de coelho. As células foram então coradas com anticorpo anti-humano NKG2D conjugado com clorofila peridina (PerCP) (clone 149810; R&D Systems, Minneapolis, EUA) durante 10 minutos na escuridão. Para os controles, as células NK transduzidas foram coradas com o respectivo anticorpo isotipo IgG conjugado com PerCP. Todas as células NK foram lavadas outra vez e fixadas com 300 µL 0,5% de formaldeído antes da análise usando o citômetro de fluxo Accuri C6 (BD, Franklin Lakes, Nova Jérсия). Os dados foram analisados usando um teste-t pareado.

*Ensaio de Citotoxicidade*

[00216] Células REH foram coradas com calceína AM vermelho-laranja (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts). Foram semeadas células REH em uma placa de fundo redondo de 96 poços (CoStar, Corning, Nova Iorque). Foram então adicionadas células NK transduzidas em vários rácios efetor : alvo (E:T). As culturas de células foram incubadas durante quatro horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Foram contadas as células-alvo viáveis coradas usando o citômetro de fluxo Accuri C6. Foram semeadas células U-2 OS em uma placa branca de fundo plano de 96 poços (Costar) e incubadas durante quatro horas.

Células NK transduzidas foram então adicionadas de acordo com diferentes rácios E:T. As culturas de células foram então incubadas durante mais quatro horas. Antes da análise, foi adicionado às células o substrato Bright-Glo (Promega, Madison, Wisconsin). Foi medida a intensidade de luminescência das células-alvo viáveis usando o Leitor de Fluorescência FLx800 (Bio Tek, Winooski, Vermont). Diferenças entre a intensidade de luminescência e o controle foram convertidas para percentagem de citotoxicidade.

*Ensaio de Produção de Interferon gama (IFN $\gamma$ )*

[00217] Para determinar a quantidade de IFN $\gamma$  produzido pelas células NK, foram primeiro cultivadas células-alvo e efector com (E:T de 1:1) ou sem REH em uma placa de fundo redondo de 96 poços. As células foram incubadas durante uma hora antes da adição de GolgiPlug (brefeldin A; BD Biosciences). Após mais 5 horas de cultura, as células foram marcadas com anticorpo anti-humano CD56 conjugado com ficoeritrina (PE) (clone MY31, BD Biosciences). As células foram permeabilizadas usando um reagente de permeabilização proprietária e incubadas durante 40 minutos na escuridão. As células foram então lavadas com um tampão de lavagem proprietário. Foi detectado IFN $\gamma$  intracelular com anticorpo IFN $\gamma$  conjugado com alofocianina (APC) (clone 25723.11; BD Biosciences) durante 45 minutos. As células foram então fixadas e analisadas usando o citômetro de fluxo Accuri C6.

*Exemplo 1 – Construções de NKG2D Contendo CD3-zeta*

[00218] Tal como aqui divulgado, são proporcionadas várias construções compreendendo NKG2D e/ou variantes de NKG2D acopladas com vários domínios transmembranares e/ou de sinalização. O presente experimento foi conduzido para avaliar a expressão e a atividade citotóxica de construções compreendendo domínios de sinalização CD3-zeta. Duas construções CD3-zeta foram preparadas e testadas de acordo com os métodos e materiais acima descritos.

Dependendo da construção, os métodos usados podem ser prontamente ajustados para representar variações requeridas para gerar, expressar e testar uma construção. As duas construções foram NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  e NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$ . Para referência, a Figura 1A representa esquematicamente um NKG2D endógeno. Em células NK, interações iônicas entre a região transmembranar do NKG2D permitem associação com sua proteína adaptadora DAP10 (Wu et al., 1999). Na ligação com o ligante, os sinais de NKG2D são transduzidos através do motivo de sinalização, YxNM, encontrado na DAP10. O CD3 $\zeta$  transduz sinais através de seu motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM; Lanier, 2008). As duas construções experimentais estão ilustradas esquematicamente nas Figuras 1B e 1C, respectivamente. A Figura 1B mostra NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$ , com sinalização ocorrendo através de ambos os motivos YxNM e ITAM. A Figura 1C mostra a construção NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$ , que utiliza uma região de dobradiça CD8a como domínio transmembranar e 4-1BB e CD3 $\zeta$  como domínios de sinalização.

[00219] Foi primeiro avaliada a capacidade das células NK de expressarem eficazmente estas construções. Foram transduzidas células NK expandidas de PBMC de doadores adultos saudáveis com um dos dois receptores quiméricos. Células NK transduzidas da simulação foram usadas como controle (transduzidas com vetor MSCV vazio contendo apenas GFP). A presença e relativa abundância dos receptores quiméricos foram determinadas através da coloração de células NK com um anticorpo anti-NKG2D conjugado com Per-CP. A Figura 4A mostra dados de citometria de fluxo representativos, relacionados com a percentagem de células NK positivas para NKG2D após a transdução com a Simulação (painel do lado esquerdo), as construções NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  (painel central) ou NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$  (painel do lado direito). Células transduzidas da simulação

mostraram ausência de expressão de NKG2D com o anticorpo usado (que não mostra coloração acima de um anticorpo não reativo compatível com o isotipo, apesar da expressão de NKG2D naturalmente elevada em células NK ativadas), enquanto um pouco menos de 60% de células transduzidas com a construção NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  exibiram expressão de NKG2D acima do controle de anticorpo não reativo compatível com o isotipo, e mais de 80% de células NK transduzidas com o NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$ . Dados agrupados para a percentagem de células NK positivas para NKG2D de todos os doadores são mostrados na Figura 4B. Ambas as construções NKG2D modificadas resultam em ganho substancial em expressão de NKG2D comparada com a Simulação, embora não haja uma diferença significativa entre a percentagem de expressão das duas construções. A Figura 4C representa dados de expressão baseados em Intensidade Média de Fluorescência (MFI), que representam, dentro da população que expressa a construção de NKG2D, o grau ao qual essa célula expressa a construção (por exemplo, múltiplas cópias da construção por célula resultariam em um MFI maior). Através desta medida, a expressão da NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$  é significativamente maior do que a da construção NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$ .

[00220] Coletivamente, estes dados demonstram que, de acordo com várias modalidades aqui divulgadas, construções modificadas podem ser expressas em células NK com sucesso. Em várias modalidades, pode ser conseguida expressão melhorada da construção por transdução repetida das células NK com uma construção particular. Em várias modalidades, os componentes das construções podem ser entregues a uma célula em um único vetor, ou alternativamente usando múltiplos vetores. Dependendo da modalidade, a própria construção pode resultar em expressão melhorada, por exemplo, uma construção linear ou da cabeça à cauda pode resultar em expressão aumentada

devido a um menor grau de montagem em célula que uma múltipla construção de subunidade requer.

[00221] Para além da expressão bem-sucedida de construções NKG2D em células NK, é necessária uma sinalização eficaz das células NK para atuar em células-alvo. Para avaliar a potência das duas populações de células NK transduzidas, foram realizados ensaios de citotoxicidade usando duas linhas de células que são sensíveis à atividade de células NK, a REH (células de suspensão) e U-2 OS (células aderentes). Nas Figuras 5A-5C são mostrados dados resumindo a percentagem de citotoxicidade dos diferentes grupos de células NK contra células REH e em doadores independentes com dois rácios E:T (as barras de erro representam o desvio padrão; todos os experimentos são dados em triplicados;  $n = 3$  ( $P < 0,001$ )). Tal como representado nas Figuras 5A-5C, as células NK expressando qualquer receptor quimérico NKG2D (NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  mostrado com uma seta identificada com (a) e NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$  mostrado com uma seta identificada com (b)) tiveram uma citotoxicidade significativamente mais elevada contra REH para todos os três doadores quando comparada com células NK da simulação (mostradas com uma seta identificada com (c)). A percentagem de citotoxicidade média das células NK expressando NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  foi  $91,8\% \pm 5,8\%$  (rácio E:T 1:1) e  $83,9\% \pm 5,6\%$  (rácio E:T 1:2). As células NK transduzidas com NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$  mostraram potências semelhantes -  $87,4\% \pm 6,1\%$  com um rácio E:T de 1:1 e  $76,2\% \pm 4,8\%$  com um rácio E:T de 1:2. Células NK expressando receptor quimérico também mostraram citotoxicidade elevada contra U-2 OS quando comparadas com células NK transduzidas da simulação (Ver Figuras 6A-6C, a Figura 6A representa NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  mostrado com uma seta identificada com (a), a Figura 6B representa NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$  mostrado com uma seta identificada com (b) e a Figura 6C representa células NK da simulação

mostradas com uma seta identificada com (c)).

[00222] Estes dados proporcionam a evidência de que as células NK podem não só ser modificadas para expressar construções de receptores quiméricos, mas essas células que expressam os receptores quiméricos são capazes de ser ativadas e de gerar com sucesso efeitos citotóxicos melhorados contra células-alvo. É importante evidenciar que esses dados também mostram que há apenas uma ligeira diminuição na potência das células quando estão na presença de uma maior quantidade de células-alvo (duplicada neste experimento). Isto sugere que os efeitos citotóxicos desejados das células NK modificadas podem ainda ser realizados, mesmo quando as células NK estão presentes em menores quantidades relativamente a células-alvo, tal como seria provavelmente o caso em utilização clínica. Ademais, estes dados indicam que, de acordo com algumas modalidades, uma menor densidade ou grau de expressão de receptor quimérico em uma dada célula NK não resulta necessariamente em efeitos citotóxicos reduzidos de modo coordenado, e pode estar associado com uma eficácia inesperada das células NK em vista de sua menor expressão de construção. Adicionalmente, estes dados representam a citotoxicidade melhorada inesperadamente que é conseguida de acordo com várias modalidades. Embora as células NK não modificadas sejam citotóxicas e expressem uma quantidade significativa de NKG2D na ativação, é inesperado que as células modificadas aqui divulgadas possam empurrar os efeitos citotóxicos significativamente para além do que pode ser considerado um teto já elevado (por exemplo, citotoxicidade de células NK nativas).

[00223] Além dos dados de citotoxicidade, foi examinado o mecanismo através do qual as células NK exercem estes efeitos, por avaliação da produção de interferon-gama (IFN $\gamma$ ) pelas células NK que expressam as várias construções NKG2D. O IFN $\gamma$  é uma citocina chave

produzida e libertada pelas células NK (tipicamente durante uma resposta imune inata) que recruta macrófagos e tem efeitos imunoestimuladores. A Figura 7A mostra a quantidade relativa de produção de IFN $\gamma$  (medida por MFI) em Simulação (painel do lado esquerdo), nas células NK que expressam NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  (painel central), e nas células NK que expressam NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$  (painel do lado direito) com ou sem estimulação por células REH. As células NK foram coloridas por anticorpo anti-IFN $\gamma$  conjugado com APC para IFN $\gamma$  intracelular. Os dados foram analisados por teste t pareado. Estes dados mostram que cada um dos três grupos de células NK foi observado com tendo um nível semelhante de produção de IFN $\gamma$  sem estimulação, com um aumento observado após estimulação por células REH. Tal como previsto em várias modalidades, as células NK modificadas que expressam construções NKG2D podem originar produção robusta de citocina. A presença de uma célula-alvo (aqui, células REH) nas quais as respostas das células NK modificadas colocam em movimento a cascata bioquímica que leva à produção de IFN $\gamma$  e finalmente a efeitos citotóxicos. Como mostrado na Figura 7A, as células NK que expressam NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$  mostram uma produção robusta de IFN $\gamma$  na presença de células REH estimuladoras. Curiosamente, as células NK que expressam NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  não mostraram um grau semelhante de resposta. Isto é ainda demonstrado na Figura 7B, onde são avaliados níveis de IFN $\gamma$  entre grupos diferentes de células NK após estimulação com células REH (foram representados valores medianos; os dados foram analisados por teste t não pareado). Todos os experimentos de IFN $\gamma$  foram realizados em triplicados, com três doadores independentes, n = 9. A Figura 7B mostra que a produção de IFN $\gamma$  por células NK que expressam NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  não foi significativamente diferente das células NK transduzidas da simulação. Em contraste, as células NK que expressam NKG2D-41BB-CD3 $\zeta$

mostram um significativo aumento na produção de IFN $\gamma$  quando comparadas com células NK transduzidas da simulação. Estes dados são interessantes porque eles demonstram que, tal como aqui discutido, a sinalização por um receptor quimérico em resposta à ligação ao ligante é uma etapa essencial na geração de efeitos citotóxicos contra a célula-alvo de interesse. Contudo, não há um único caminho através do qual as várias construções sinalizam, uma vez que as células NK transduzidas com dois diferentes receptores quiméricos exibem citotoxicidade relativamente semelhante, mas sem níveis paralelos de produção de IFN $\gamma$ . Assim, de acordo com algumas modalidades, são proporcionadas construções que alcançam efeitos citotóxicos através de uma produção elevada de IFN $\gamma$ , ou outra citocina imunoestimuladora, quando comparada com células NK normais. Contudo, em várias modalidades, o aumento de produção de IFN $\gamma$  não é necessariamente conseguido ou detectado, em vez disso pode ser explorado outro caminho imunoestimulador por uma dada construção quimérica para alcançar efeitos citotóxicos elevados.

*Exemplo 2 – Construções de NKG2D Contendo CD16 e CD16-4-1BB*

[00224] Foram geradas construções adicionais para avaliar a expressão, a citotoxicidade e a produção de citocina. Como aqui previsto, várias modalidades se referem a construções compreendendo um NKG2D truncado (em algumas modalidades, códon otimizado), que utiliza um domínio transmembranar e/ou de sinalização CD16. As construções geradas para avaliação neste experimento são esquematicamente mostradas nas Figuras 2A-2B, que mostram a estrutura dos receptores quiméricos A) NKG2D-CD16 e B) NKG2D-CD16-4-1BB. Ambos os receptores quiméricos contam com a região transmembranar de CD16 para se associar com CD3 $\zeta$  ou FcR $\gamma$ . Os plasmídeos usados para gerar essas construções são mostrados na Figura 3B. Como acima discutido, em várias modalidades, as

construções utilizadas baseiam-se na expressão endógena de CD3 $\zeta$  ou FcR $\gamma$ , contudo, em várias modalidades, o plasmídeo codificando o receptor quimérico (ou um plasmídeo separado) está configurado para elevar a expressão de CD3 $\zeta$  e/ou FcR $\gamma$  pela célula NK, desse modo melhorando a potência das células.

[00225] Tal como acima, foram avaliados os níveis de expressão das construções. A Figura 8A mostra dados de citometria de fluxo representativos para a simulação (painel do lado esquerdo), células NK que expressam NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  (painel central), e células NK que expressam NKG2D-CD16 (foram realizados Experimentos usando células de três doadores independentes representados por diferentes símbolos. Os dados foram analisados por teste t pareado). A Figura 8B mostra dados resumidos referentes à percentagem de células que expressam NKG2D (e conseqüentemente as construções). Como esperado, células NK transfectadas na simulação mostram baixos níveis de expressão de NKG2D com o anticorpo usado. Em contraste, ambas as construções modificadas exibem expressão significativamente melhorada, com células NK transduzidas de NKG2D-CD16 expressando 35,8%  $\pm$  6,9%, maior expressão quando comparadas com células NK transduzidas da simulação. Adicionalmente, como avaliado por MFI (Figura 8C), as células NK transduzidas de NKG2D-CD16 também exibem aumento de expressão da construção. Estes dados são importantes para demonstrar que as construções podem ser introduzidas eficazmente em células NK e são expressas.

[00226] Havendo estabelecido a expressão das construções, foi avaliada sua capacidade para exibir efeitos citotóxicos. Como discutido acima, as células NK desses três doadores foram testadas quanto a efeitos citotóxicos contra células REH e células U-2 OS, cada uma com três rácios E:T (todos os experimentos foram feitos em triplicado, n=3).

Curiosamente, a expressão melhorada da construção de NKG2D-CD16 quando comparada com células NK da simulação não resultou em aumento de citotoxicidade (ver Figura 9A-9C, as barras de erro representam desvios padrão). Tal como no exemplo anterior, as células NK que expressam NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  (mostradas com uma seta identificada com (a)) exibiram um aumento de citotoxicidade. Com relação à citotoxicidade contra células U-2 OS, NKG2D-CD16 (mostrado com uma seta identificada com (b)) exibiu um aumento de citotoxicidade quando comparado com células NK da simulação (mostradas com uma seta identificada com (c)) (ver Figuras 10A-10C). Estes dados indicam que o grau de impacto citotóxico em um dado tipo de célula-alvo pode variar com a construção NK usada. Em algumas modalidades, uma construção particular pode não ser tão eficaz, contudo, em várias modalidades, combinações de populações de células NK podem ser usadas e exibir efeitos sinérgicos. Por outras palavras, uma população de células NK, com uma porção expressando NKG2D-CD16 e uma porção expressando NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$  (ou outra combinação de qualquer das construções aqui divulgadas), pode exibir citotoxicidade inesperadamente melhorada quando comparada com qualquer subpopulação individual.

[00227] A seguir foi medida a produção de Interferon- $\gamma$ , para confirmar o mecanismo de ação das células NK transfectadas. As células NK que expressam as várias construções foram estimuladas tanto por células REH, como não, e foi medida a produção de IFN $\gamma$ . Estes dados são mostrados na Figura 11 (foram analisados dados por teste t pareado). Todos os grupos de células NK tinham nível semelhante de IFN $\gamma$  sem estimulação e um aumento após incubação com células REH. As células NK que expressam NKG2D-CD16 exibiram um aumento na produção de IFN $\gamma$  de  $634 \pm 211$  MFI, que foi maior do que o aumento exibido pelas células NK transduzidas da simulação ( $423$

$\pm 70$  MFI). Contudo, o aumento foi menor do que o observado para células NK que expressam NKG2D-DAP10-CD3 $\zeta$ , que aumentaram  $2041 \pm 411$  MFI. Em linha com os dados, de acordo com várias modalidades, a produção de IFN $\gamma$  está correlacionada com os efeitos citotóxicos que as células NK que expressam certas construções exibem.

[00228] De acordo com várias modalidades aqui divulgadas, podem ser usadas múltiplas regiões de sinalização. Experimentos adicionais foram realizados para avaliar a expressão de um NKG2D-CD16-41BB em células NK expandidas (os experimentos foram realizados usando células de um doador). Os dados da expressão são mostrados nas Figuras 12A-12B. A Figura 12A mostra dados de citometria de fluxo em bruto que demonstram que a adição da região de sinalização 4-1BB não prejudica significativamente a expressão da construção por células NK, quando comparadas com a construção NKG2D-CD16. Isto também está refletido no histograma resumido da Figura 12B que mostra a quantidade relativa de receptores NKG2D na superfície de cada um dos grupos de células NK testados. O NKG2D-CD16-41BB mostra MFI ligeiramente reduzido quando comparado com NKG2D-CD16, mas ambas as construções mostram elevada expressão versus simulação.

[00229] Foram avaliados os efeitos citotóxicos como acima descrito, usando ambas as células REH e U-2 OS como alvos. As Figuras 13A-13B mostram os dados resultantes (as barras de erro representam desvios padrão; todos os experimentos foram realizados em triplicados,  $n = 3$ ). A Figura 13A mostra os efeitos citotóxicos das construções contra células REH. De modo semelhante ao experimento acima, as células que expressam NKG2D-CD16 mostradas com uma seta identificada com (b)) não mostraram efeitos citotóxicos significativamente elevados quando comparados com células NK da simulação mostradas com uma seta identificada com (a). Em contraste, as células NK expressando

NKG2D-CD16-41BB (mostradas com uma seta identificada com (c)) mostraram citotoxicidade melhorada contra células REH. Com respeito à eficácia contra células U-2 OS, as células expressando NKG2D-CD16 e NKG2D-CD16-41BB mostraram citotoxicidade melhorada, com as células expressando NKG2D-CD16-41BB exibindo um efeito citotóxico mais robusto. Isto demonstra que, de acordo com várias modalidades, o uso de uma combinação de domínios de sinalização pode resultar em melhoramentos inesperados na eficácia de uma célula NK transduzida. Assim, tal como descrito acima, várias modalidades utilizam dois ou mais domínios transmembranares/de sinalização que funcionam sinergicamente juntos para resultar em citotoxicidade melhorada contra células-alvo.

### *Exemplo 3 – Construções Adicionais de NKG2D*

[00230] Foram geradas construções adicionais com variados domínios extracelulares, domínios transmembranares e domínios efetores intracelulares para avaliar sua expressão e citotoxicidade. As 12 construções geradas para avaliação neste experimento são esquematicamente mostradas na Figura 14. Algumas destas variantes de receptores quiméricos contam com uma região transmembranar CD16 para associar com CD3 $\zeta$  ou FcR $\gamma$ . Como acima discutido, em várias modalidades, as construções utilizadas baseiam-se na expressão endógena de CD3 $\zeta$  ou FcR $\gamma$ , contudo, em várias modalidades, o plasmídeo codificando o receptor quimérico (ou um plasmídeo separado) está configurado para elevar a expressão de CD3 $\zeta$  e/ou FcR $\gamma$  pela célula NK, desse modo melhorando a potência das células. Tal como acima, foram avaliados os níveis de expressão das construções. Células NK transfectadas na simulação mostram baixos níveis de expressão de NKG2D tal como avaliado pelo MFI (Figura 16A). Em contraste, células NK transduzidas com as construções de variantes NKG2D acima descritas mostraram níveis de variação da expressão de

NKG2D, com construções de variantes modificadas 4 e 9 exibindo expressão significativamente melhorada em células NK. A Figura 16B mostra dados de citometria de fluxo representativos para as construções das variantes NKG2D 1, 4, 8, 9 após transdução nas células NK de dois doadores. Relativamente às células NK transduzidas da simulação, as células NK transduzidas das Variantes 8 e 9 mostraram expressão particularmente forte do receptor quimérico. A expressão da construção da variante persistiu nas células NK de dois doadores 7 dias a seguir à transdução, com as Variantes 8 e 9 mostrando níveis particularmente elevados tal como avaliado por MFI (Figura 16C). Estes dados são importantes para demonstrar que as construções podem ser introduzidas eficazmente em células NK e são expressas. Havendo estabelecido a expressão das construções, também foi avaliada sua capacidade para entregar efeitos citotóxicos em células NK transduzidas. A citotoxicidade das construções de variantes NKG2D 4, 8 e 9 foi avaliada 14 dias após transdução em células NK com um rácio E:T de 1:1 (Figura 17).

[00231] Foram geradas outras construções de variantes que estão esquematicamente mostradas na Figura 15, as quais mostram a estrutura de receptores quiméricos compreendendo vários domínios extracelulares, domínios transmembranares e domínios efetores intracelulares. Alguns destes receptores quiméricos variantes contam com um domínio efetor compreendendo CD3zeta e/ou outro domínio de sinalização para transduzir a sinalização na ligação com o ligante, enquanto outros receptores quiméricos variantes compreendem um domínio transmembranar CD3zeta que recruta o comprimento completo da molécula de CD3zeta para a sinapse através da dimerização. Tal como acima, foram avaliados os níveis de expressão das construções. Tal como avaliado por MFI (Figuras 18A-B), as células NK transduzidas com construções modificadas exibem aumento de expressão do

receptor quimérico relativamente às células transduzidas da simulação. Foram avaliados os efeitos citotóxicos tal como descrito acima usando um rácio efetor:alvo de 1:1. Como é mostrado nas Figuras 19A-B, as células NK transduzidas com construções modificadas (particularmente a variante 18) têm citotoxicidade melhorada relativamente ao controle da simulação.

[00232] Como a variante 18 exibiu expressão robusta em células NK que foi acompanhada por efeitos citotóxicos melhorados, foram geradas uma série de construções de variantes NKG2D compreendendo um domínio transmembranar CD3zeta. Estas variantes são denominadas "NK39" e são mostradas esquematicamente na Figura 15. Catorze dias após a transfecção em células NK de doador (com 4 dias de cultura em condições de baixa IL-2), a citotoxicidade das células NK transduzidas foi avaliada. A Figura 21 mostra os efeitos citotóxicos das construções contra células REH cultivadas com rácios E:T de 1:1 e 1:2. Todas as células NK expressando construções NK39 modificadas mostraram efeitos citotóxicos significativamente elevados quando comparados com células NK de controle com um rácio E:T de 1:1. Quando avaliadas a um rácio E:T de 1:2, as construções quiméricas 16-7, 39-1, 39-2, 39-3 e 39-5 melhoraram todos os efeitos citotóxicos de suas respectivas células NK transduzidas relativamente ao controle da simulação. Como a expressão exógena de receptores de ativação pode levar à anergia de células NK e à morte das células, as construções modificadas foram transduzidas em células NK de dois doadores e a sobrevivência foi avaliada após 21 dias. Como é mostrado nas Figuras 23A-B, as células transduzidas de NK39-5 e NK39-10 mostram melhor sobrevivência do que a NK16 em dois doadores testados.

#### *Exemplo 4 – Avaliação das Construções de NKG2D NK45*

[00233] São esquematicamente mostradas na Figura 22, construções adicionais com variados domínios extracelulares,

dobradiças, domínios transmembranares e domínios efetores intracelulares de acordo com modalidades aqui divulgadas. A expressão, citotoxicidade, persistência e produção de citocina mediadas por estas 7 construções foram avaliadas neste Exemplo relativamente a três das construções NK39 descritas no Exemplo 3 (NK39-5, NK39-6, NK39-10) bem como uma versão de NK16 que expressa bicistronicamente interleucina ligada à membrana 15 (NK26-8). De acordo com várias modalidades aqui divulgadas, podem ser usadas múltiplas regiões de sinalização. Alguns destes receptores quiméricos variantes contam com um domínio efetor compreendendo CD3zeta e/ou outro domínio de sinalização (por exemplo, OX40, CD28 e/ou domínios coestimuladores 4-1BB) para transduzir a sinalização na ligação com o ligante, enquanto outros receptores quiméricos variantes compreendem um domínio transmembranar CD3zeta que recruta o comprimento completo da molécula de CD3zeta para a sinapse através da dimerização. Tal como aqui divulgado, estas construções estão ainda configuradas para coexpressar IL15 ligada à membrana.

[00234] Tal como acima, foi primeiro avaliada a capacidade das células NK de expressarem eficazmente estas construções. As células NK expandidas a partir do PBMC de quatro doadores foram transduzidas com as construções variantes (ou um vetor de controle MSCV vazio contendo apenas GFP) e foi avaliada a expressão de NKG2D por MFI após 3 dias. Tal como mostrado na FIGURA 24, as células NK transfectadas da simulação apresentam níveis relativamente baixos de expressão de NKG2D. Em contraste, as construções variantes modificadas exibiram expressão significativamente aumentada, com NK45-4 (NKG2D-OX40-CD3 $\zeta$ ) apresentando expressão surpreendentemente robusta em todos os doadores. OX40 é expresso em células NK ativadas, mas sua regra não foi bem estabelecida. Um receptor quimérico variante com um domínio efetor

contendo um domínio CD28 coestimulador (NK45-2; NKG2D-CD28-CD3 $\zeta$ ) também demonstrou expressão robusta 3 dias após a transdução.

[00235] Havendo estabelecido a expressão das construções variantes, sua capacidade para exercer efeitos citotóxicos foi avaliada tal como acima usando células REH e HL60 como alvos. A potência das células NK de quatro doadores foi examinada contra células REH (FIGURA 25A) e células HL60 (FIGURA 25B) com rácios E:T de 1:1 14 dias após transdução. Como mostrado nas FIGURAS 25A-B, as construções modificadas exercem uma citotoxicidade melhorada contra as células REH e HL60 em todos os quatro doadores quando comparadas com células NK da simulação. Adicionalmente a seu perfil de expressão pronunciado, as células que expressam NK45-4 (NKG2D-OX40-CD3 $\zeta$ ) também exibiram citotoxicidade surpreendentemente elevada relativamente ao controle da simulação e às outras construções testadas. Células NK que expressam NK45-1 e NK45-2 também demonstraram citotoxicidade pronunciada nestes ensaios. Estes dados demonstram que, de acordo com várias modalidades, o uso de uma combinação de domínios de sinalização (particularmente um domínio coestimulador OX40) pode resultar em melhoramentos inesperados na eficácia de uma célula NK transduzida. As FIGURAS 28A-B representam a atividade citotóxica contra células U2OS das células NK transduzidas com várias das construções variantes em diferentes rácios E:T (1:2 e 1:4) e avaliadas em um período de tempo mais extenso. Surpreendentemente, as células NK transduzidas com a construção 45-4 aparentam manter a atividade citotóxica por todo o período de tempo. Vantajosamente, estes experimentos indicam que, de acordo com várias modalidades aqui divulgadas, as construções variantes de NKG2D proporcionam citotoxicidade inesperadamente melhorada em um período de tempo prolongado, que, dependendo da modalidade,

pode variar de 2-3 dias, 3-5 dias, 5-7 dias, 7-8 dias, 8-10 dias, 10-14 dias, 14-21 dias ou 21-50 dias (e qualquer gama entre estas listadas, incluindo os pontos extremos). Em várias modalidades, são mesmo conseguidas durações mais longas de efeitos citotóxicos.

[00236] Além dos dados de citotoxicidade, foi examinado o mecanismo através do qual as células NK exercem estes efeitos, por avaliação de sua produção de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e GM-CSF a seguir à estimulação com células REH. Como mostrado nas FIGURAS 26A-C, a expressão de cada uma das construções variantes resultou em secreção intensificada de citocina relativamente à produção de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e GM-CSF exibida pelas células NK de controle expressando GFP. O receptor quimérico NK45-1 mediou consistentemente a elevada produção de citocina, o que é surpreendente porque esta construção expressa a níveis substancialmente mais baixos do que NK26-8 (dos quais ela difere apenas com relação à região de dobradiça). Assim, estes dados demonstram a importância inesperada das regiões dobradiça aqui divulgadas para mediar a produção robusta de citocina em resposta à estimulação. Adicionalmente, as células NK que expressam NKG2D-OX40-CD3 $\zeta$  também mostraram uma produção elevada de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e GM-CSF.

[00237] Como a expressão exógena de receptores de ativação pode levar à anergia de células NK e à morte das células, as construções modificadas foram transduzidas em células NK de dois doadores e a contagem total de células foi avaliada 7, 14 e 21 dias após transdução. Surpreendentemente, a expressão inesperadamente robusta de NK45-4 não surge às custas de uma reduzida persistência de células NK em cultura, uma vez que a contagem total de células permanece em níveis comparáveis às células de controle expressando GFP (FIGURAS 27A e 27B). Da mesma maneira, outras células NK expressando construções variantes em níveis elevados continuaram a proliferar nos 2 doadores

durante pelo menos 3 semanas após transdução. Em termos globais, estes dados demonstram que, de acordo com várias modalidades aqui divulgadas, construções modificadas podem ser expressas com sucesso a altos níveis de células NK e mediar efeitos citotóxicos, e ainda, que esta expressão melhorada não surge em detrimento de uma reduzida proliferação e/ou sobrevivência de células NK.

[00238] Está contemplado que podem ser feitas várias combinações ou subcombinações das características e aspectos específicos das modalidades acima divulgadas e ainda se enquadrarem em uma ou mais das invenções. Ademais, a descrição aqui inclusa de qualquer componente, aspecto, método, propriedade, característica, qualidade, atributo, elemento ou semelhantes, em conexão com uma modalidade, pode ser usado em todas as outras modalidades aqui estabelecidas. Assim, deve ser entendido que várias características e aspectos das modalidades divulgadas podem ser combinados com ou substituídos uns pelos outros para formar modos variados das invenções divulgadas. Ou seja, pretende-se que o escopo das presentes invenções aqui divulgadas não deve estar limitado pelas modalidades particulares divulgadas descritas acima. Além disso, enquanto a invenção é suscetível de várias modificações, e formas alternativas, foram mostrados exemplos específicos da mesma nos desenhos e estão aqui descritos em detalhe. Deve ser entendido, contudo, que a invenção não está limitada às formas ou métodos particulares divulgados, mas pelo contrário, a invenção destina-se a abranger todas as modificações, equivalentes e alternativas enquadrados no espírito e escopo das várias modalidades descritas e reivindicações anexas. Quaisquer métodos aqui divulgados não necessitam ser realizados na ordem recitada. Os métodos aqui divulgados incluem certas ações tomadas por um clínico; contudo, eles podem também incluir qualquer instrução de terceira parte para essas ações, seja expressamente ou por implicação. Por exemplo,

ações como "administrar uma população de células NK expandidas" inclui "instruir a administração de uma população de células NK expandidas." Adicionalmente, onde características ou aspectos da descrição são descritos em termos de grupos Markush, os peritos na técnica reconhecerão que a descrição é também desse modo descrita em termos de qualquer membro ou subgrupo de membros do grupo Markush.

[00239] As faixas aqui divulgadas também englobam qualquer e todas as sobreposições, subgamas e suas combinações. Linguagem como "até", "pelo menos", "maior que", "menor que", "entre", e semelhantes inclui o número recitado. Números precedidos de um termo como "cerca de" ou "aproximadamente" incluem os números recitados. Por exemplo, "cerca de 90%" inclui "90%." Em algumas modalidades, pelo menos 95% homólogo inclui 96%, 97%, 98%, 99% e 100% homólogo à sequência de referência. Adicionalmente. Quando uma sequência é divulgada como "compreendendo" um nucleotídeo ou sequência de aminoácido, uma tal referência deve também incluir, a menos que de outro modo indicado, que a sequência "compreende", "consiste em" ou "consiste essencialmente em" a sequência recitada.

## REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um domínio receptor extracelular,

em que o referido domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D),

em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D,

em que o fragmento de NKG2D é codificado por um polinucleotídeo compreendendo a SEQ ID NO. 2; e

(b) um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular,

em que o domínio de sinalização intracelular compreende CD3zeta, e

em que o CD3zeta é codificado por um polinucleotídeo compreendendo a SEQ ID NO. 13.

2. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região transmembranar do domínio efetor compreende um domínio transmembranar CD8a.

3. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região transmembranar do domínio efetor compreende ainda uma região de dobradiça CD8a.

4. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a região de dobradiça CD8a é codificada por um polinucleotídeo compreendendo a SEQ ID NO. 5.

5. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização intracelular compreende ainda 4-1BB.

6. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 5,

caracterizado pelo fato de que o 4-1BB é codificado por um polinucleotídeo compreendendo a SEQ ID NO. 12.

7. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a CD8a, 4-1BB e CD3z.

8. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 18.

9. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 108.

10. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende a sequência de amino ácido da SEQ ID NO. 19.

11. Método para tratamento de câncer, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um sujeito que tem um câncer uma composição compreendendo uma célula Exterminadora Natural (NK) expressando o receptor quimérico codificado pelo polinucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que as referidas células NK são células autólogas isoladas de um paciente que tem um câncer ou uma doença infecciosa.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que as referidas células NK são células alogênicas isoladas de um doador.

14. Uso de um polinucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que é para fabricação de um medicamento para aumentar a citotoxicidade das células NK em um mamífero que disso tenha necessidade.

15. Uso de um polinucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que fabricação de um medicamento para o tratamento ou a prevenção de câncer ou de uma doença infecciosa em um mamífero que disso tenha necessidade.

16. Polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico expresso por uma célula, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um domínio receptor extracelular,

em que o referido domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D),

em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D,

em que o fragmento de NKG2D é codificado por um polinucleotídeo compreendendo a SEQ ID NO. 2, e

(b) um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular,

em que o domínio de sinalização intracelular compreende CD3zeta,

em que o CD3zeta é codificado por um polinucleotídeo compreendendo a SEQ ID NO. 13 e

em que a célula compreende ainda uma interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15).

17. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a região transmembranar do domínio efetor compreende um domínio transmembranar CD8a.

18. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a região transmembranar do domínio efetor compreende ainda uma região de dobradiça CD8a.

19. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 18,

caracterizado pelo fato de que a região de dobradiça CD8a é codificada por um polinucleotídeo compreendendo a SEQ ID NO. 5.

20. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o mbIL15 é codificado por um polinucleotídeo compreendendo a SEQ ID NO. 16.

21. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a mbIL15 é expressa bicistronicamente no mesmo polinucleotídeo que o receptor quimérico.

22. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a mbIL15 compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 17

23. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o domínio efetor compreende ainda um domínio OX-40.

24. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, o domínio OX-40, o CD3zeta.

25. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 90 acoplada à mbIL15 codificada pela SEQ ID NO. 16.

26. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 91 acoplada à mbIL15 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 17.

27. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça IgG4, um domínio transmembranar CD8a, o domínio OX-40, o CD3zeta.

28. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 100 acoplada à mbIL15 codificada pela SEQ ID NO. 16.

29. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 101 acoplada à mbIL15 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 17.

30. Método para tratamento de câncer, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um sujeito que tem um câncer uma composição compreendendo uma célula Exterminadora Natural (NK) expressando o receptor quimérico codificado pelo polinucleotídeo, onforme definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 29.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que as referidas células NK são células autólogas isoladas de um paciente que tem um câncer.

32. Método, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que as referidas células NK são células alogênicas isoladas de um doador.

33. Uso de um polinucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 ou 29, caracterizado pelo fato de que é para fabricação de um medicamento para aumentar a citotoxicidade das células NK em um mamífero que disso tenha necessidade.

34. Uso de um polinucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 ou 29, caracterizado pelo fato de que é para fabricação de um medicamento para o tratamento ou a prevenção de câncer ou de uma doença infecciosa em um mamífero que disso tenha necessidade.

35. Polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico

caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) um domínio receptor extracelular,
  - em que o referido domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D),
  - em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D,
  - em que o fragmento de NKG2D é codificado por um polinucleotídeo compreendendo: (i) um fragmento da SEQ ID NO: 1, (ii) a SEQ ID NO. 2 ou (iii) a SEQ ID NO. 3; e
- (b) um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular.

36. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o domínio efetor compreende CD16.

37. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o domínio efetor compreende um Receptor de Disparo de Citotoxicidade Natural 1 (NCR1).

38. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o domínio efetor compreende um Receptor de Disparo de Citotoxicidade Natural 2 (NCR2) ou um Receptor de Disparo de Citotoxicidade Natural 3 (NCR3).

39. Polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35, 36, 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que o domínio efetor compreende ainda 4-1BB.

40. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a CD16.

41. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 23.

42. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 24.

43. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a NCR1.

44. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 27.

45. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 28.

46. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende pelo menos uma porção da sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 21.

47. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a NCR3.

48. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 29.

49. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 30.

50. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB.

51. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o

fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, a um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB.

52. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 25.

53. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 26.

54. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado ao NCR1 e 4-1BB.

55. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido NCR1 da SEQ ID NO: 20.

56. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a CD8a, 4-1BB e CD3z.

57. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 18.

58. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 19.

59. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado ao NCR3 e 4-1BB, e em que o NCR3 compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 22.

60. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende um ou mais dentre o domínio transmembranar/intracelular NCR1 da SEQ ID

NO: 20 ou o domínio transmembranar/intracelular NCR3 da SEQ ID NO: 22.

61. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o domínio efetor compreende um GS de ligação entre 4-1BB e um dos CD16, NCR1, NCR3, 2B4 ou NKp80.

62. Polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 61, caracterizado pelo fato de que o domínio de receptor quimérico compreende uma região de dobradiça.

63. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a região de dobradiça é codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 5.

64. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a região de dobradiça é codificada por um fragmento da sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 5.

65. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a região de dobradiça compreende um motivo repetitivo de glicina-serina que tem a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 31.

66. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a região de dobradiça compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 32.

67. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a região de dobradiça compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 33.

68. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a região de dobradiça é codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 34.

69. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a região de dobradiça compreende uma porção do receptor beta-adrenérgico.

70. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que a região de dobradiça é codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 40.

71. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que a região de dobradiça é codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 42.

72. Polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 71, caracterizado pelo fato de que o domínio receptor extracelular compreende ainda um peptídeo sinal CD8a, caracterizado pelo fato de que o peptídeo sinal compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO. 4.

73. Polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 72, caracterizado pelo fato de que o domínio efetor compreende uma ou mais sequências hemi-ITAM.

74. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que a hemi-ITAM compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 14.

75. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que a hemi-ITAM compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 37.

76. Polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 75, caracterizado pelo fato de que o domínio efetor compreende uma ou mais sequências ITSM.

77. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 76, caracterizado pelo fato de que a ITSM compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 15.

78. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 76, caracterizado pelo fato de que a ITSM compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO. 35

79. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 76,

caracterizado pelo fato de que o domínio efetor compreende um domínio 2B4.

80. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a um GS3 de ligação, uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB.

81. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 43.

82. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a um GS3 de ligação, um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB.

83. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 82, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 44.

84. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB.

85. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 45.

86. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB e 2B4.

87. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 86, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 46.

88. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a um domínio extracelular beta-adrenérgico, um domínio transmembranar beta-adrenérgico, 4-1BB e 2B4.

89. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 88, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 47.

90. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB, 2B4, um GS3 de ligação e NKp80.

91. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 90, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 48.

92. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB, um GS3 de ligação e NKp80.

93. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 49.

94. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a um GS3 de ligação, um fragmento adicional de NKG2D, um domínio extracelular beta-adrenérgico, um domínio transmembranar beta-adrenérgico, 4-1BB, um GS3 de ligação adicional e NKp80.

95. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela

sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 50.

96. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a um GS3 de ligação, um fragmento adicional de NKG2D, uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar CD8a, 4-1BB, um GS3 de ligação adicional e NKp80.

97. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 96, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 51.

98. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D que é códon otimizado acoplado a um GS3 de ligação, um fragmento adicional de NKG2D, uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD16 e 4-1BB.

99. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 52.

100. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD16, 4-1BB e 2B4.

101. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 53.

102. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico compreende o fragmento de NKG2D acoplado a uma dobradiça CD8a, um domínio transmembranar/intracelular CD16, 4-1BB, um GS3 de ligação e NKp80.

103. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico é codificado pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 54.

104. Polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 103, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico não compreende uma proteína ativadora de DNAX 10 (DAP10).

105. Polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 104, caracterizado pelo fato de que o receptor quimérico não compreende um motivo ITAM.

106. Polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um domínio receptor extracelular, em que o referido domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D), em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D,

(b) uma região transmembranar, em que a referida região transmembranar compreende CD8a, e

(c) um domínio efetor, em que o referido domínio efetor compreende 4-1BB e CD3 zeta,

em que o polinucleotídeo é coexpresso com uma construção adicional que codifica uma interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15).

107. Polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um domínio receptor extracelular, em que o referido domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D), em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento

de NKG2D,

(b) uma região transmembranar, em que a referida região transmembranar compreende CD8a, e

(c) um domínio efetor, em que o referido domínio efetor compreende 4-1BB e o domínio intracelular de 2B4 ou DAP10.

108. Polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 ou 107, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo é coexpresso com uma construção adicional que codifica uma interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15).

109. Polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um domínio receptor extracelular, em que o referido domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D), em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D, em que o fragmento de NKG2D é codificado por um polinucleotídeo compreendendo: (i) um fragmento da sequência de SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência de SEQ ID NO. 2, (iii) a sequência de SEQ ID NO. 3 ou (iv) a sequência de SEQ ID NO. 68,

(b) uma região transmembranar, em que a referida região transmembranar compreende uma região transmembranar CD3zeta, e

(c) um domínio efetor.

110. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 109, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo é coexpresso com interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15).

111. Polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um domínio receptor extracelular,

em que o referido domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do

Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D),

em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D,

em que o fragmento de NKG2D é codificado por um polinucleotídeo compreendendo: (i) um fragmento da sequência de SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência de SEQ ID NO. 2, (iii) a sequência de SEQ ID NO. 3, (iv) ou a sequência de SEQ ID NO. 68; e

(b) um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular.

112. Polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 111, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo está operacionalmente ligado a pelo menos um elemento regulador para a expressão do receptor quimérico.

113. Vetor compreendendo o polinucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 35 a 112, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo está operacionalmente ligado a pelo menos um elemento regulador para a expressão do receptor quimérico.

114. Vetor, de acordo com a reivindicação 113, caracterizado pelo fato de que o vetor é um retrovírus.

115. Célula exterminadora natural geneticamente modificada caracterizada pelo fato de que compreende o polinucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 35 a 112.

116. Célula exterminadora natural geneticamente modificada isolada, de acordo com a reivindicação 115, caracterizado pelo fato de que é uma célula autóloga isolada de um paciente.

117. Célula exterminadora natural geneticamente modificada isolada, de acordo com a reivindicação 115, caracterizado pelo fato de que é uma célula alogênica isolada de um doador.

118. Método para aumentar a citotoxicidade de células NK

em um mamífero que disso tenha necessidade, o referido método compreendendo administrar ao referido mamífero células NK, caracterizado pelo fato de que as referidas células NK expressam um receptor quimérico codificado por um polinucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 35 a 112.

119. Método, de acordo com a reivindicação 118, caracterizado pelo fato de que as referidas células NK são células autólogas isoladas de um paciente.

120. Método, de acordo com a reivindicação 118, caracterizado pelo fato de que as referidas células NK são células alogênicas isoladas de um doador.

121. Método para tratamento ou prevenção de câncer ou de uma doença infecciosa em um mamífero que disso tenha necessidade, o referido método compreendendo administrar ao referido mamífero uma quantidade terapeuticamente eficaz de células NK, caracterizado pelo fato de que as referidas células NK expressam um receptor quimérico codificado por um polinucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 35 a 112.

122. Método, de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo fato de que as referidas células NK são células autólogas isoladas de um paciente que tem um câncer ou uma doença infecciosa.

123. Método, de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo fato de que as referidas células NK são células alogênicas isoladas de um doador.

124. Uso de um polinucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 35 a 112, caracterizado pelo fato de que é para fabricação de um medicamento para aumentar a citotoxicidade das células NK em um mamífero que disso tenha necessidade.

125. Uso de um polinucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 35 a 112, caracterizado pelo fato de que é para fabricação de um medicamento para o tratamento ou a prevenção de câncer ou de uma doença infecciosa em um mamífero que disso tenha necessidade.

126. Uso de um vetor, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 114 ou 115, caracterizado pelo fato de que é para fabricação de um medicamento para aumentar a citotoxicidade das células NK em um mamífero que disso tenha necessidade.

127. Uso de um vetor, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 114 ou 115, caracterizado pelo fato de que é para fabricação de um medicamento para o tratamento ou a prevenção de câncer ou de uma doença infecciosa em um mamífero que disso tenha necessidade.

128. Uso de uma célula exterminadora natural geneticamente modificada isolada, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 115, 116 ou 117, caracterizado pelo fato de que é para aumentar a citotoxicidade das células NK em um mamífero que disso tenha necessidade.

129. Uso de uma célula exterminadora natural geneticamente modificada isolada, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 116 ou 117, caracterizado pelo fato de que é para o tratamento ou a prevenção de câncer ou de uma doença infecciosa em um mamífero que disso tenha necessidade.

130. Polinucleotídeo que codifica um receptor quimérico caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um domínio receptor extracelular,

em que o referido domínio receptor extracelular compreende um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D),

em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D,

em que o fragmento de NKG2D é codificado por um polinucleotídeo compreendendo: (i) um fragmento da SEQ ID NO: 1, (ii) a SEQ ID NO. 2, (iii) a SEQ ID NO. 3; ou (iv) a SEQ ID NO. 68; e

(b) um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular.

131. Célula transgênica caracterizada pelo fato de que compreende:

a) uma célula imune compreendendo um receptor quimérico, o receptor quimérico compreendendo:

(a) um domínio receptor extracelular compreendendo um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D), em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D; e

(ii) um domínio efetor compreendendo uma região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular, em que o domínio de sinalização intracelular compreende CD3zeta;

b) uma interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15).

132. Método para tratamento de câncer, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um sujeito que tem um câncer uma composição compreendendo uma célula Exterminadora Natural (NK) expressando:

a) uma célula imune compreendendo um receptor quimérico, o receptor quimérico compreendendo:

(a) um domínio receptor extracelular compreendendo um peptídeo que liga ligantes nativos de membro D do Grupo de Exterminadores Naturais 2 (NKG2D), em que o peptídeo que liga ligantes nativos de NKG2D é um fragmento de NKG2D; e

(ii) um domínio efetor compreendendo uma

região transmembranar e um domínio de sinalização intracelular, em que o domínio de sinalização intracelular compreende CD3zeta;

b) uma interleucina ligada à membrana 15 (mbIL15).

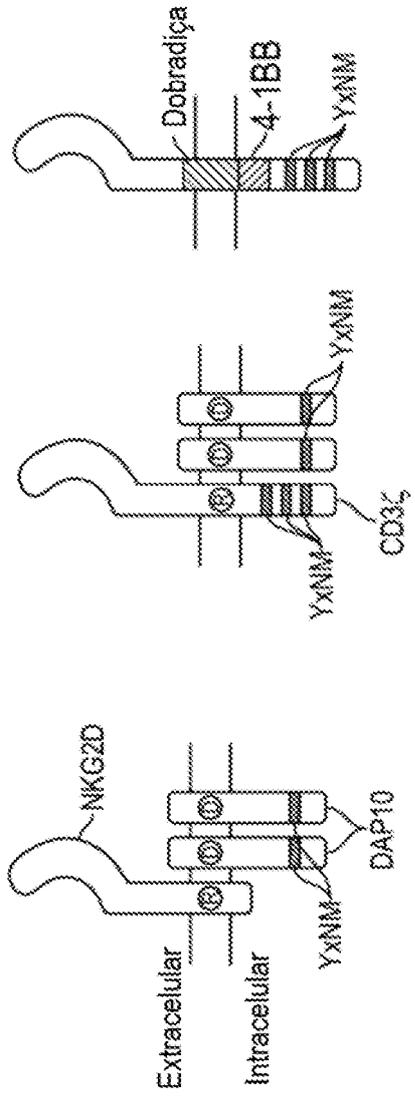


FIG. 1C

FIG. 1B

FIG. 1A

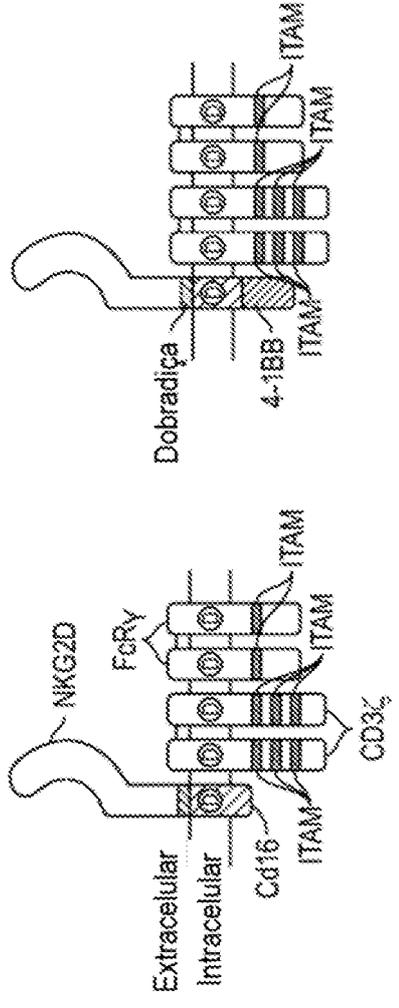


FIG. 2B

FIG. 2A

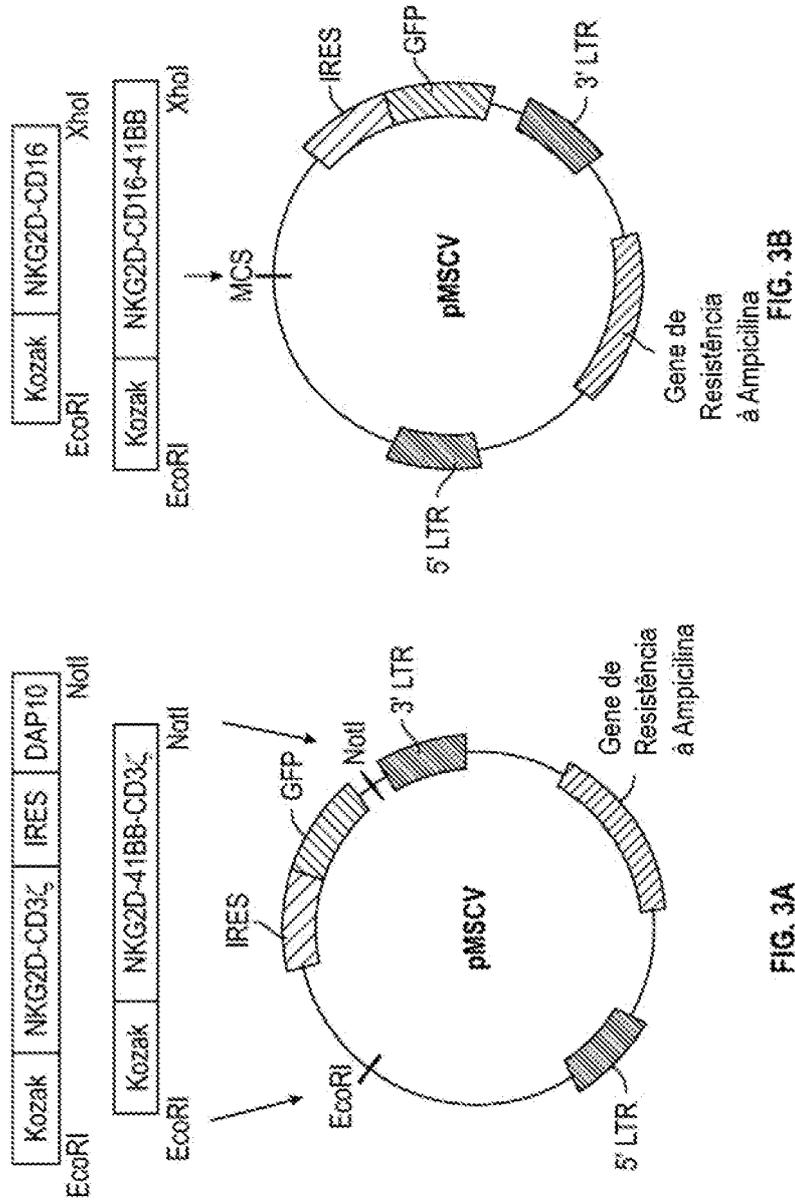


FIG. 3A

FIG. 3B

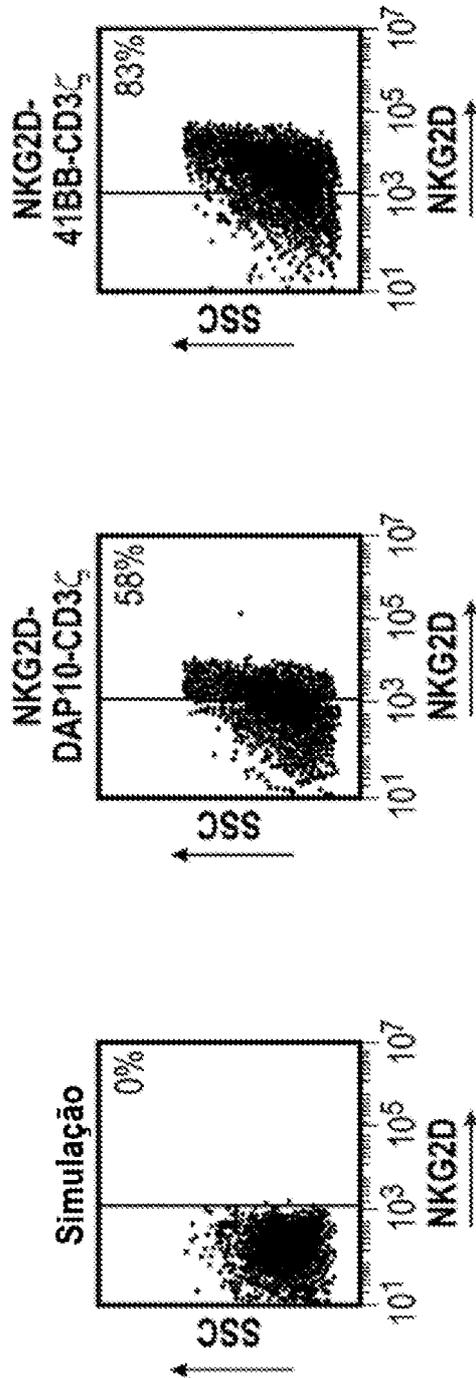


FIG. 4A

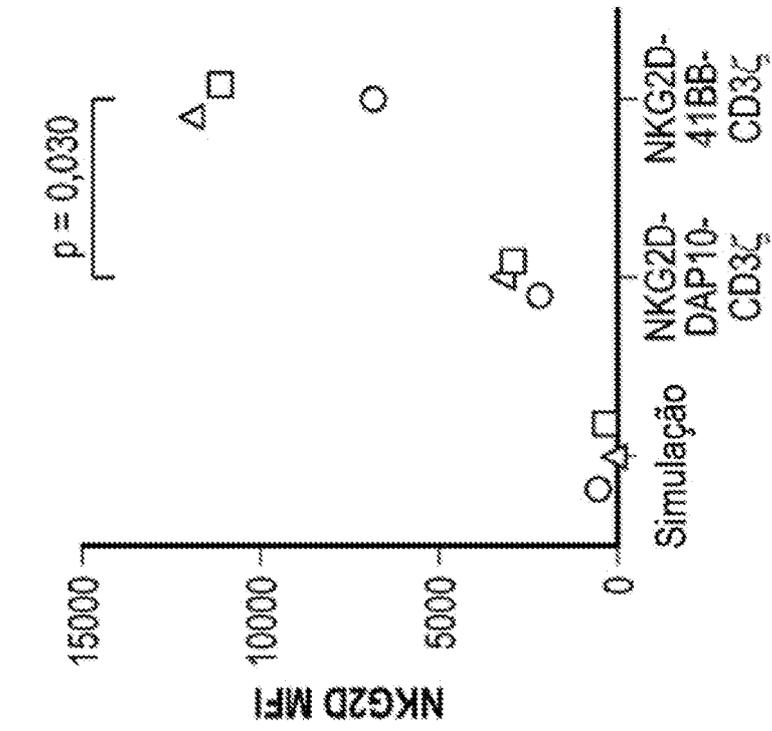


FIG. 4C

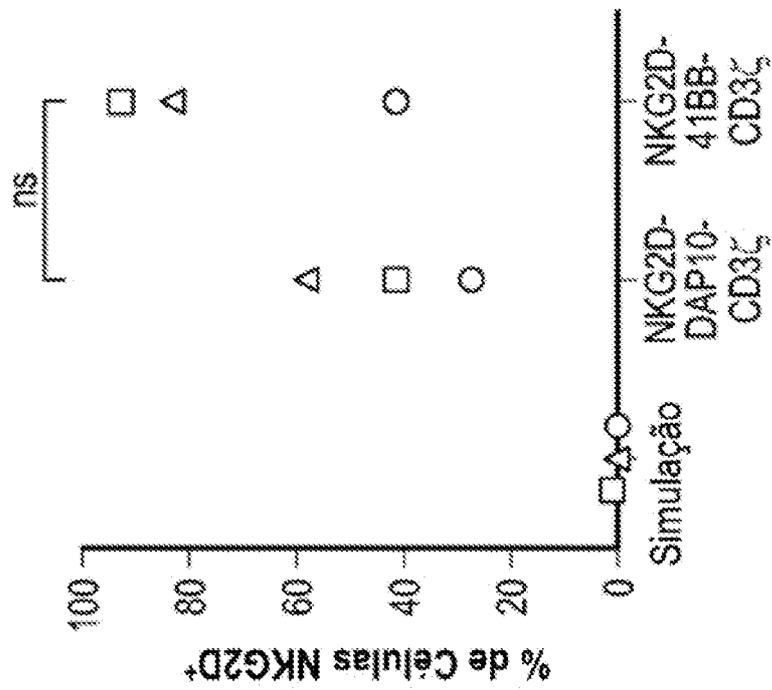


FIG. 4B

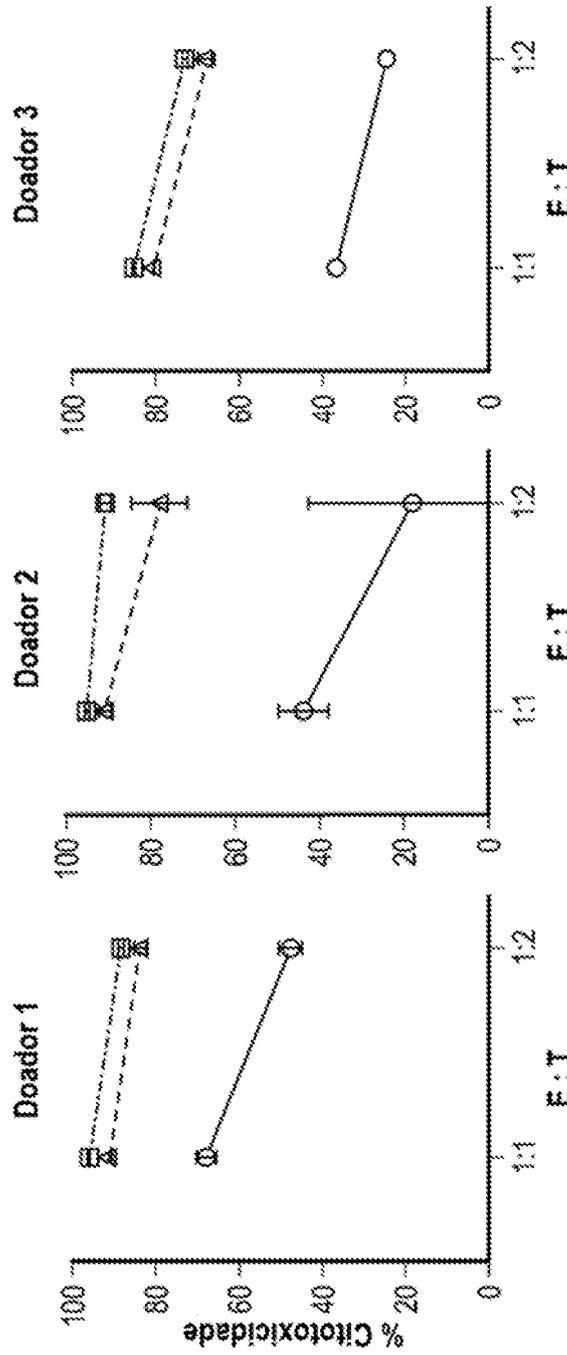
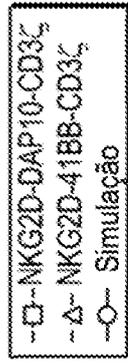


FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 5C

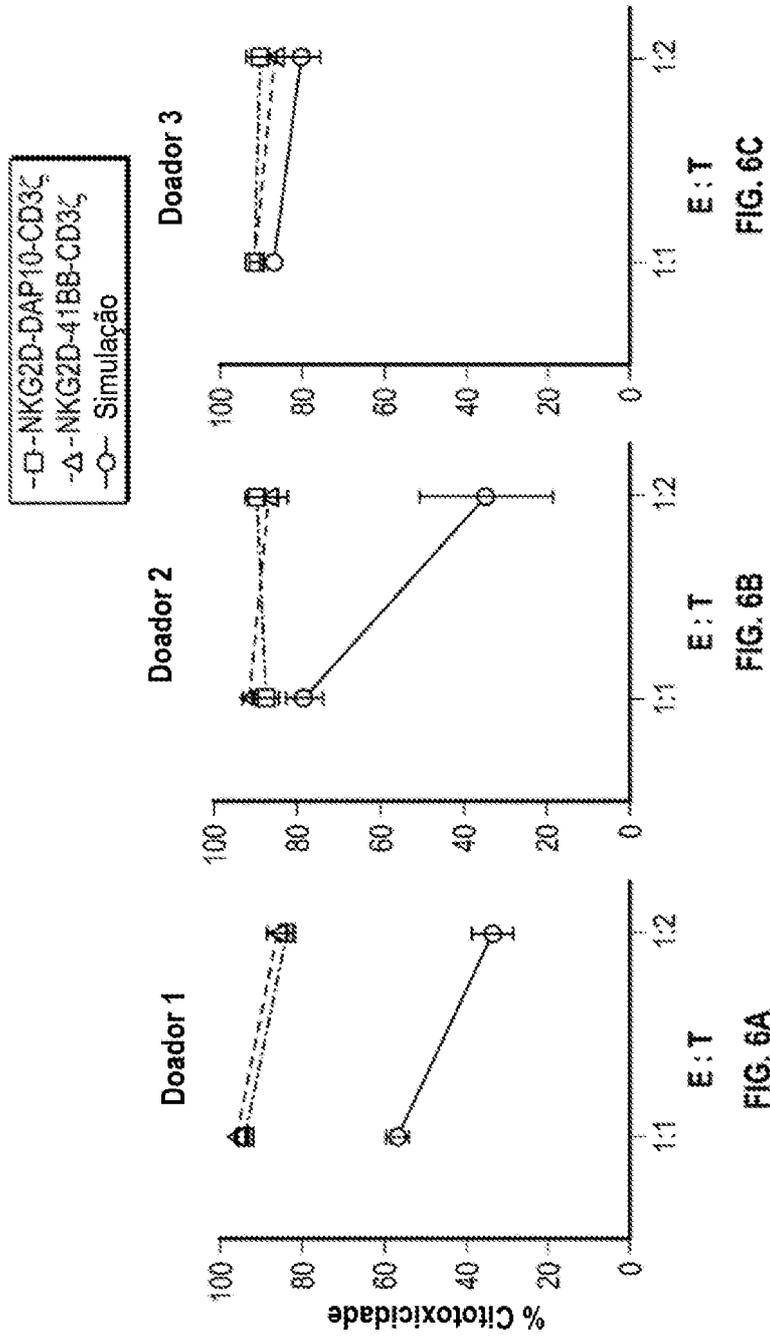


FIG. 6C

FIG. 6B

FIG. 6A

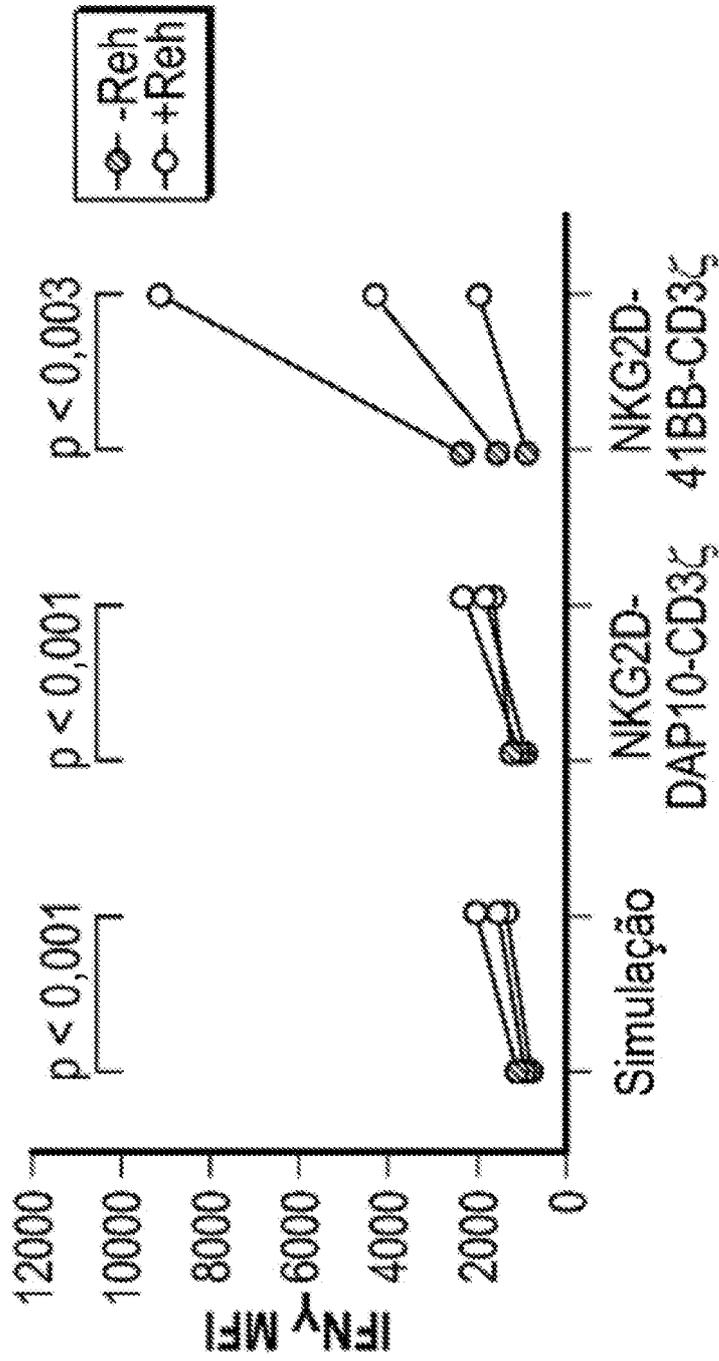


FIG. 7A

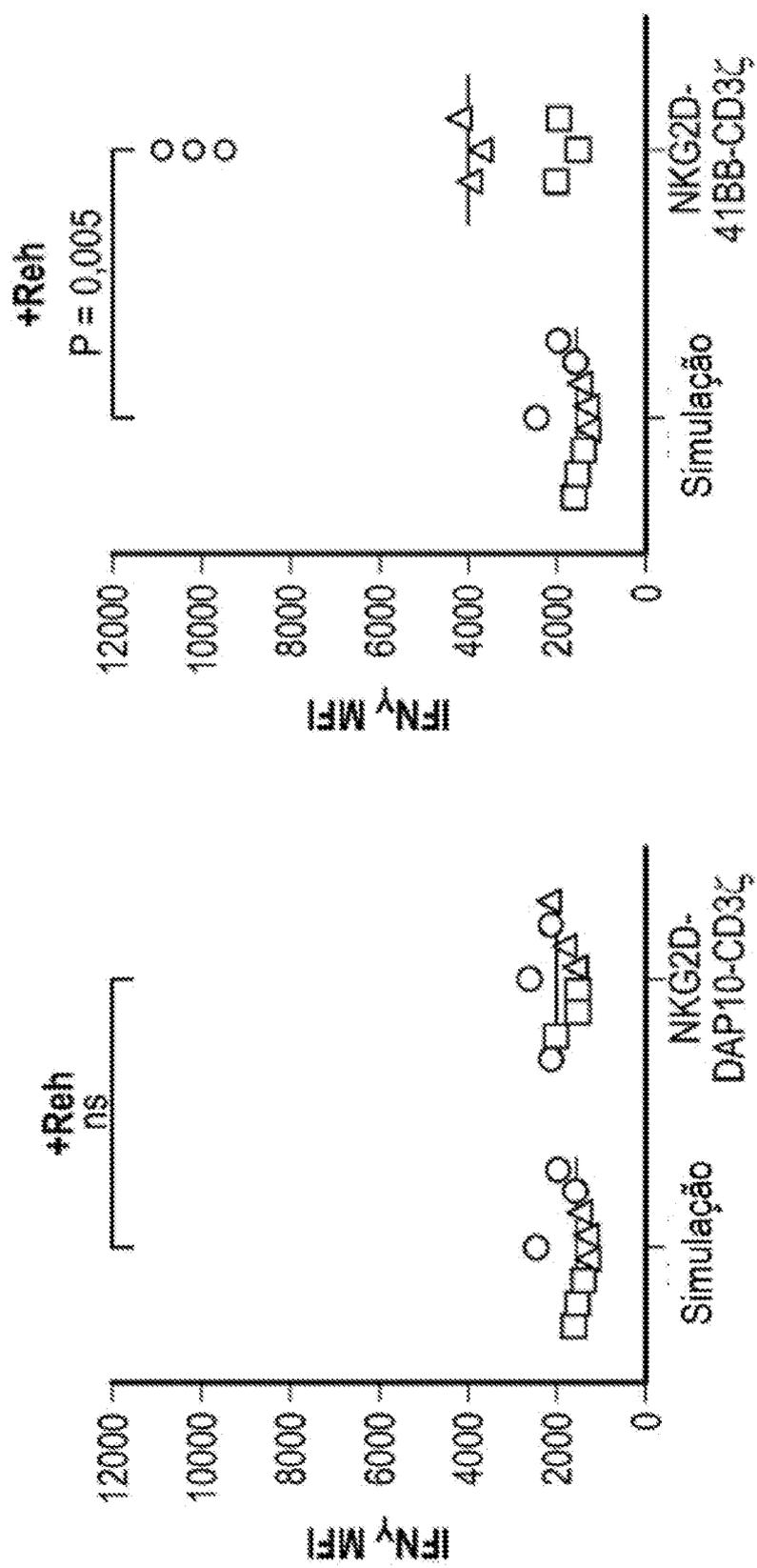


FIG. 7B

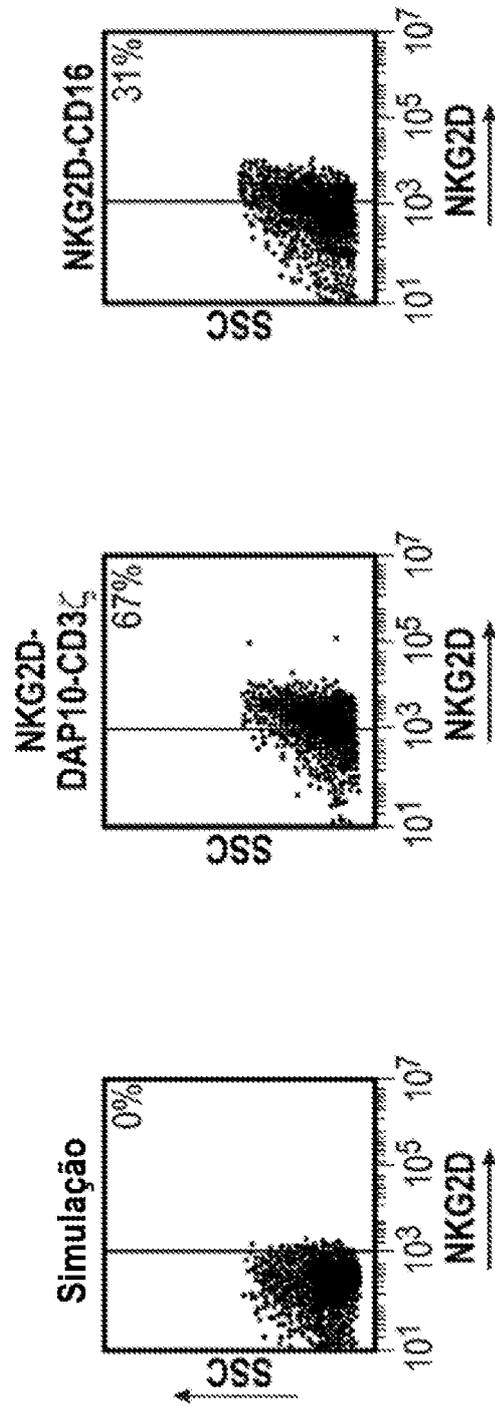


FIG. 8A

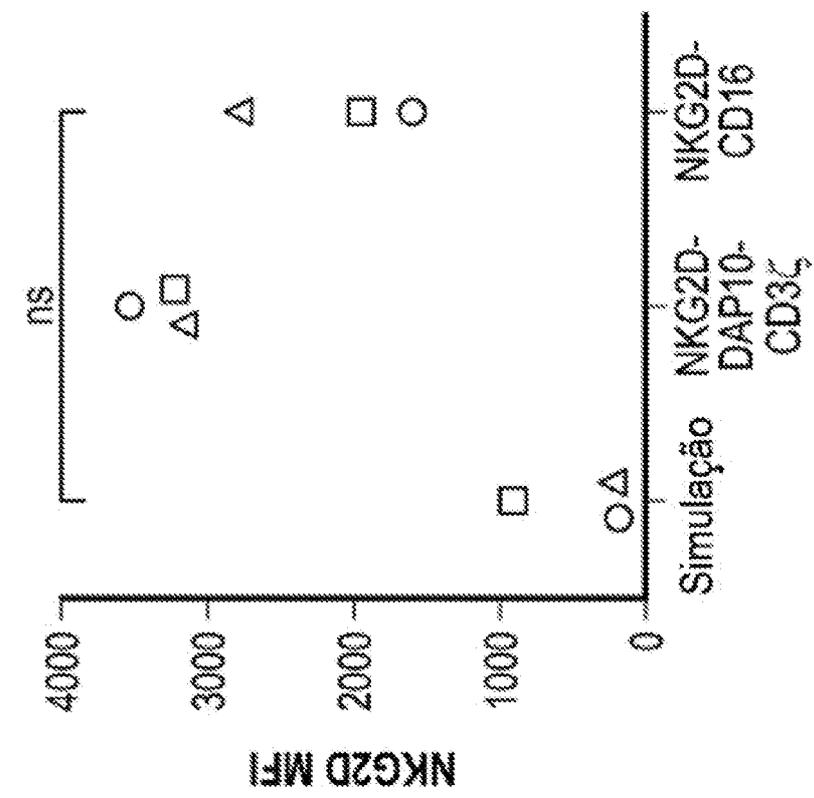


FIG. 8C

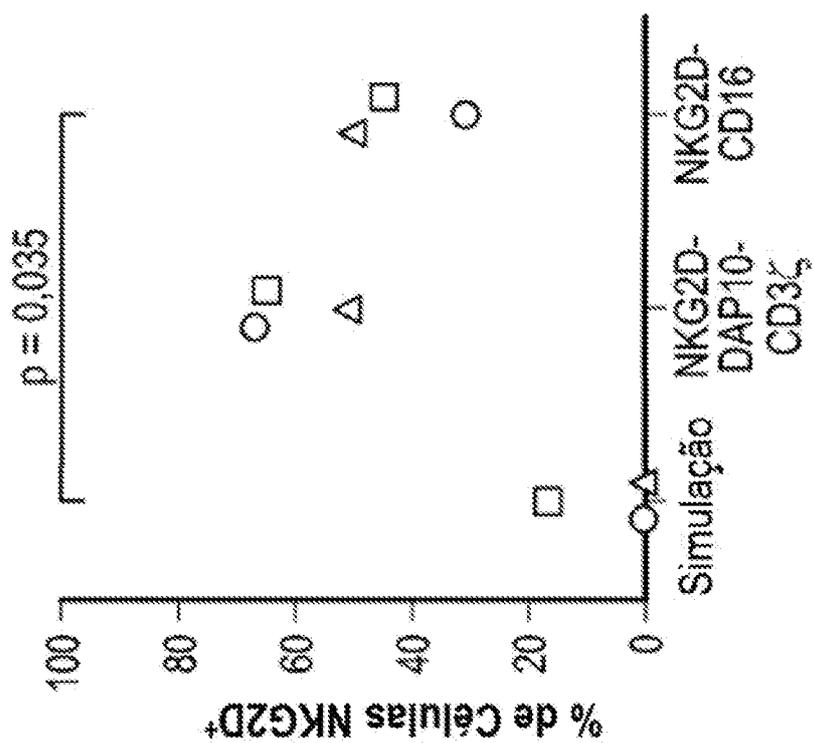


FIG. 8B

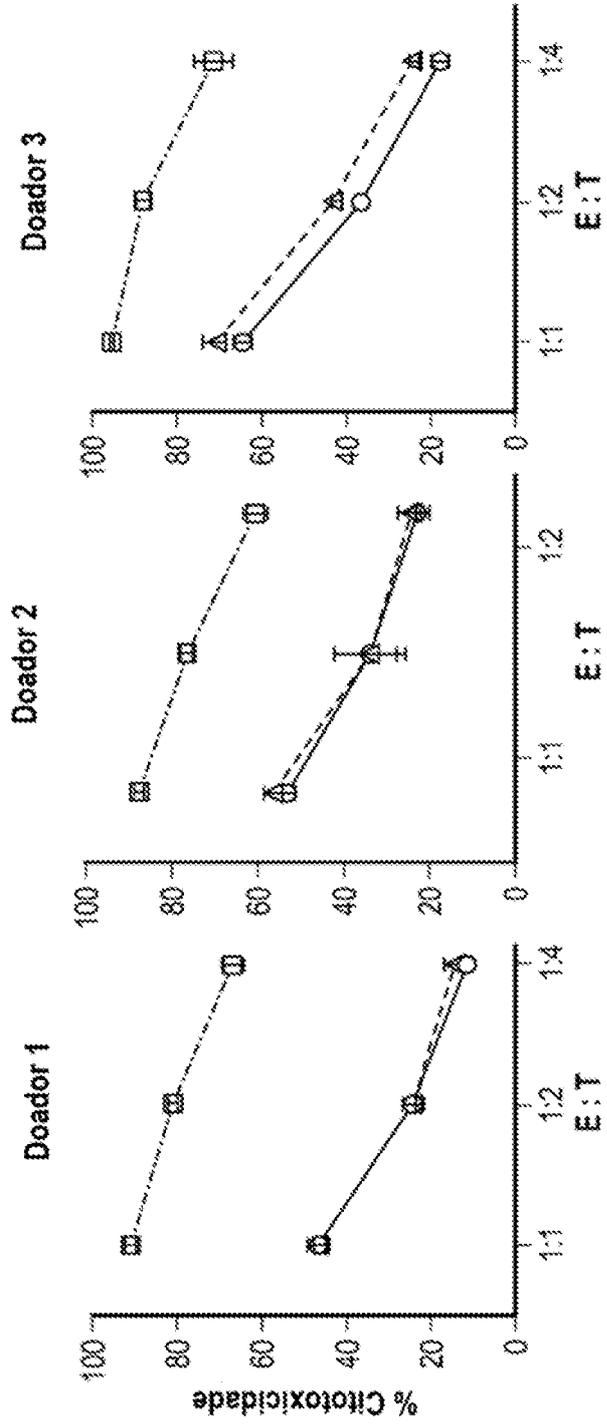
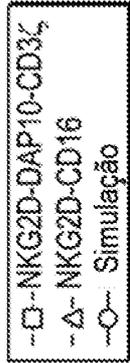


FIG. 9C

FIG. 9B

FIG. 9A

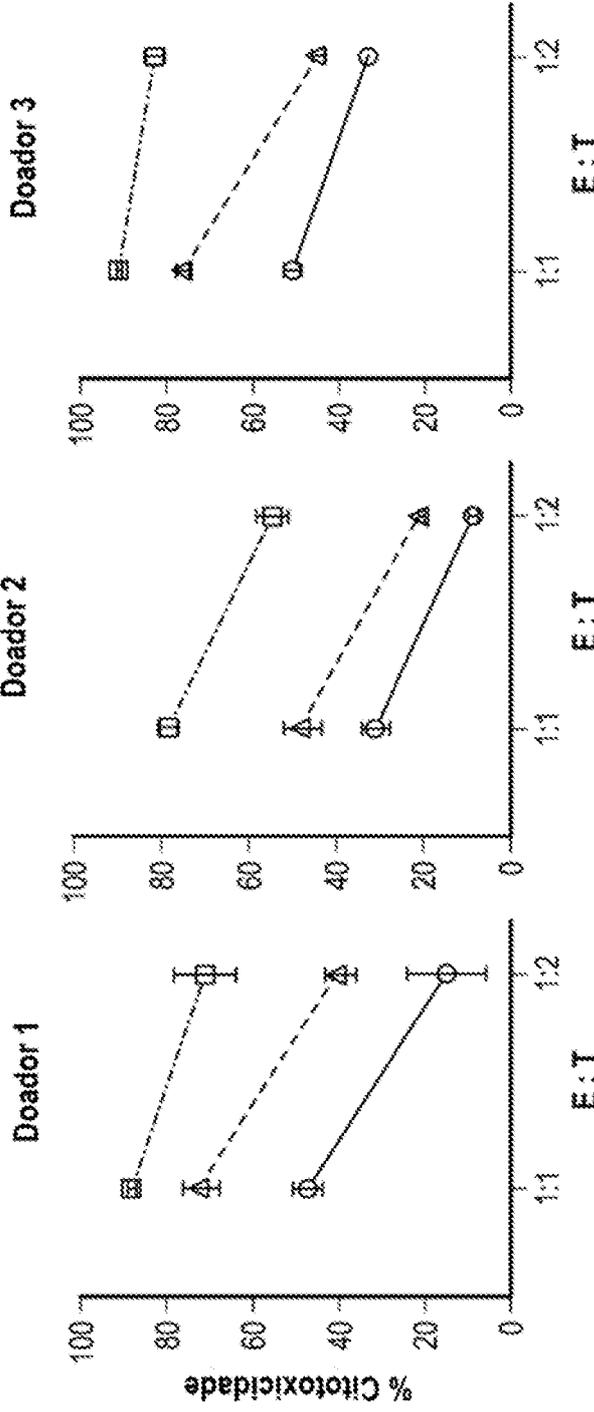
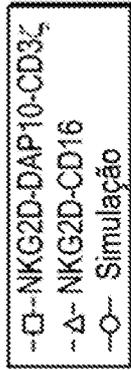


FIG. 10A

FIG. 10B

FIG. 10C

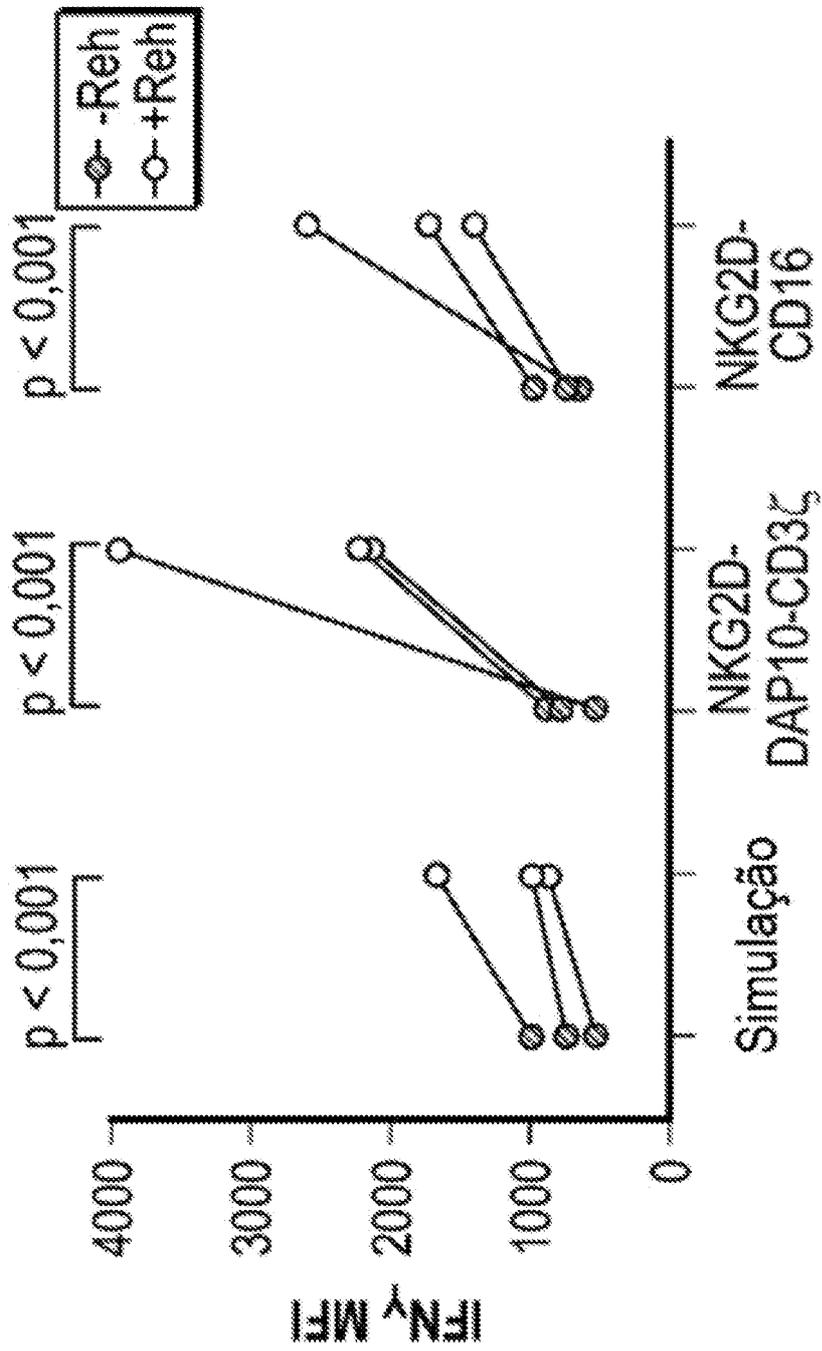


FIG. 11

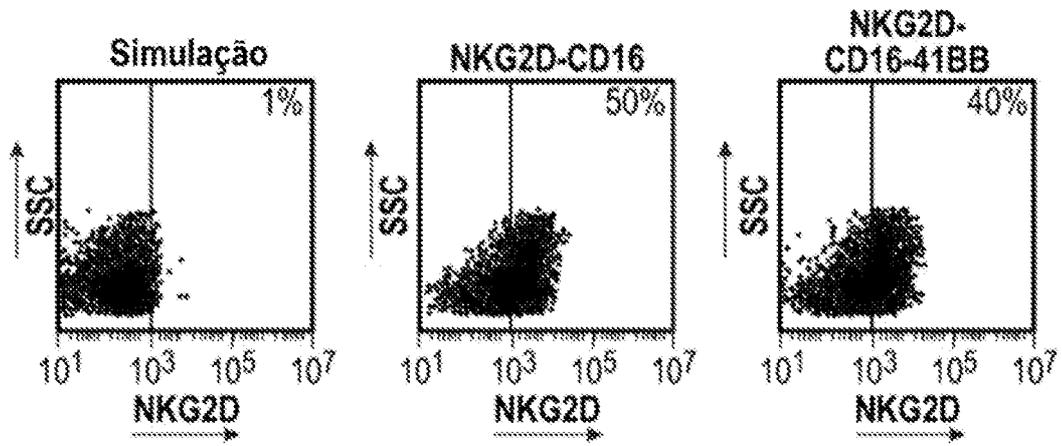


FIG. 12A

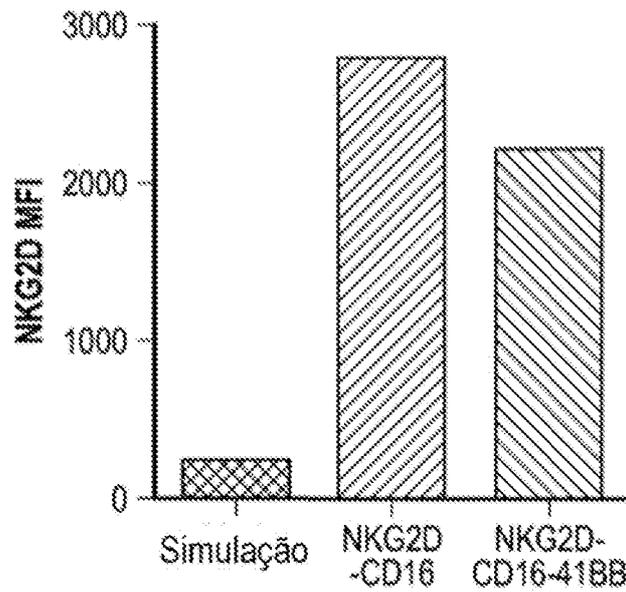


FIG. 12B

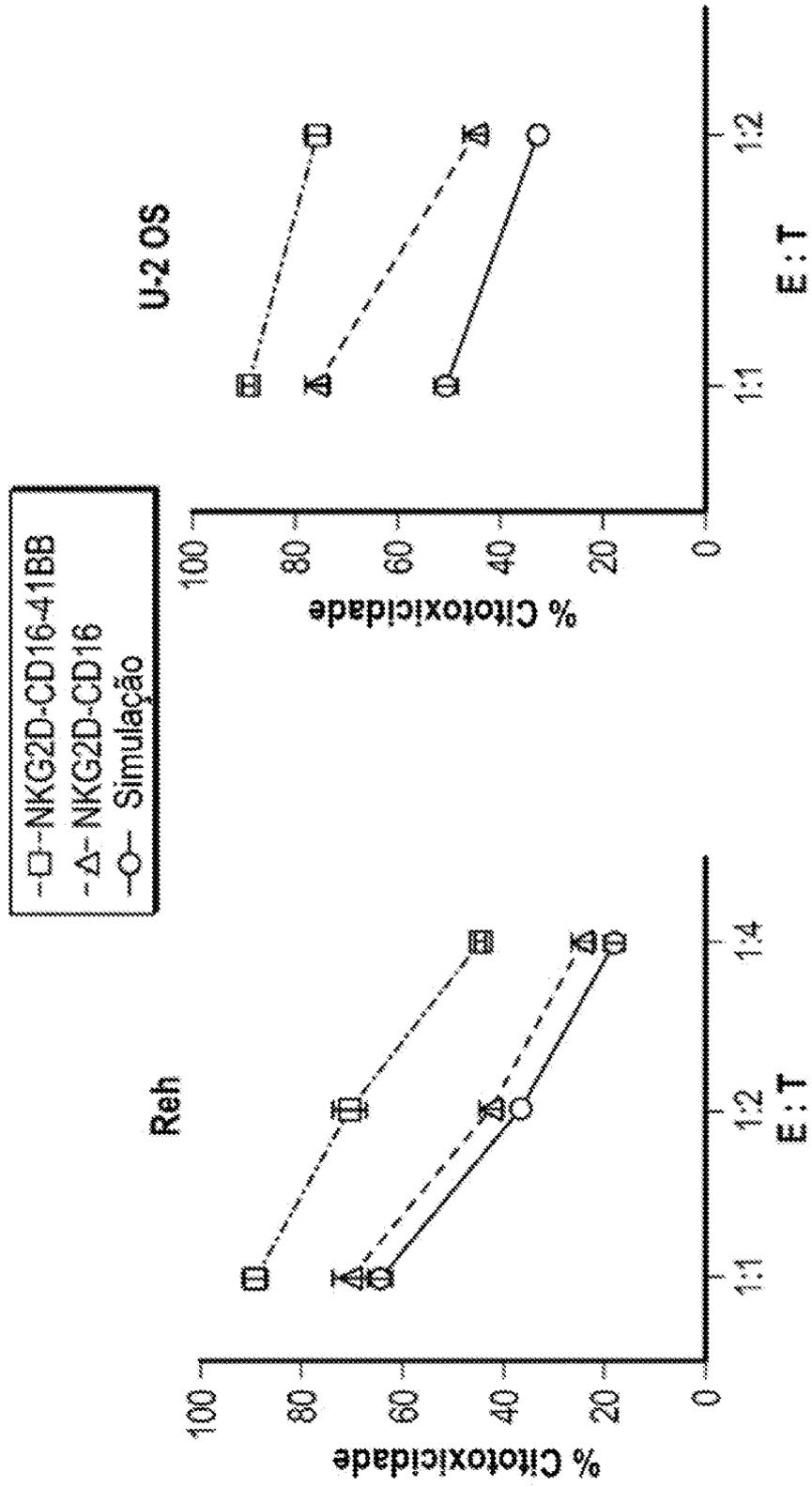


FIG. 13B

FIG. 13A

<b>NK15</b>	NKG2D EC (Códon Otimizado)	CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD16 TM/IC	4-1BB
<b>Variante 1</b>	NKG2D EC (Códon Otimizado)	GS <sub>3</sub> CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD16 TM/IC	4-1BB
<b>Variante 2</b>	NKG2D EC (Códon Otimizado)	GS <sub>3</sub> CD16 TM/IC	4-1BB	
<b>Variante 3</b>	NKG2D EC (Códon Otimizado)	CD16 TM/IC	4-1BB	
<b>Variante 4</b>	NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD8 $\alpha$ TM	4-1BB 2B4
<b>Variante 5</b>	NKG2D EC	ADRB2 EC	ADRB2 TM	4-1BB 2B4
<b>Variante 6</b>	NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD8 $\alpha$ TM	4-1BB 2B4 GS <sub>3</sub> NKp80
<b>Variante 7</b>	NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD8 $\alpha$ TM	4-1BB GS <sub>3</sub> NKp80
<b>Variante 8</b>	NKG2D EC (Códon Otimizado)	GS <sub>3</sub> NKG2D EC	ADRB2 EC	ADRB2 TM 4-1BB GS <sub>3</sub> NKp80
<b>Variante 9</b>	NKG2D EC (Códon Otimizado)	GS <sub>3</sub> NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD8 $\alpha$ TM 4-1BB GS <sub>3</sub> NKp80
<b>Variante 10</b>	NKG2D EC (Códon Otimizado)	GS <sub>3</sub> NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD16 TM/IC 4-1BB
<b>Variante 11</b>	NKG2D EC (Códon Otimizado)	CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD16 TM/IC	4-1BB 2B4
<b>Variante 12</b>	NKG2D EC (Códon Otimizado)	CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD16 TM/IC	4-1BB GS <sub>3</sub> NKp80

FIG. 14

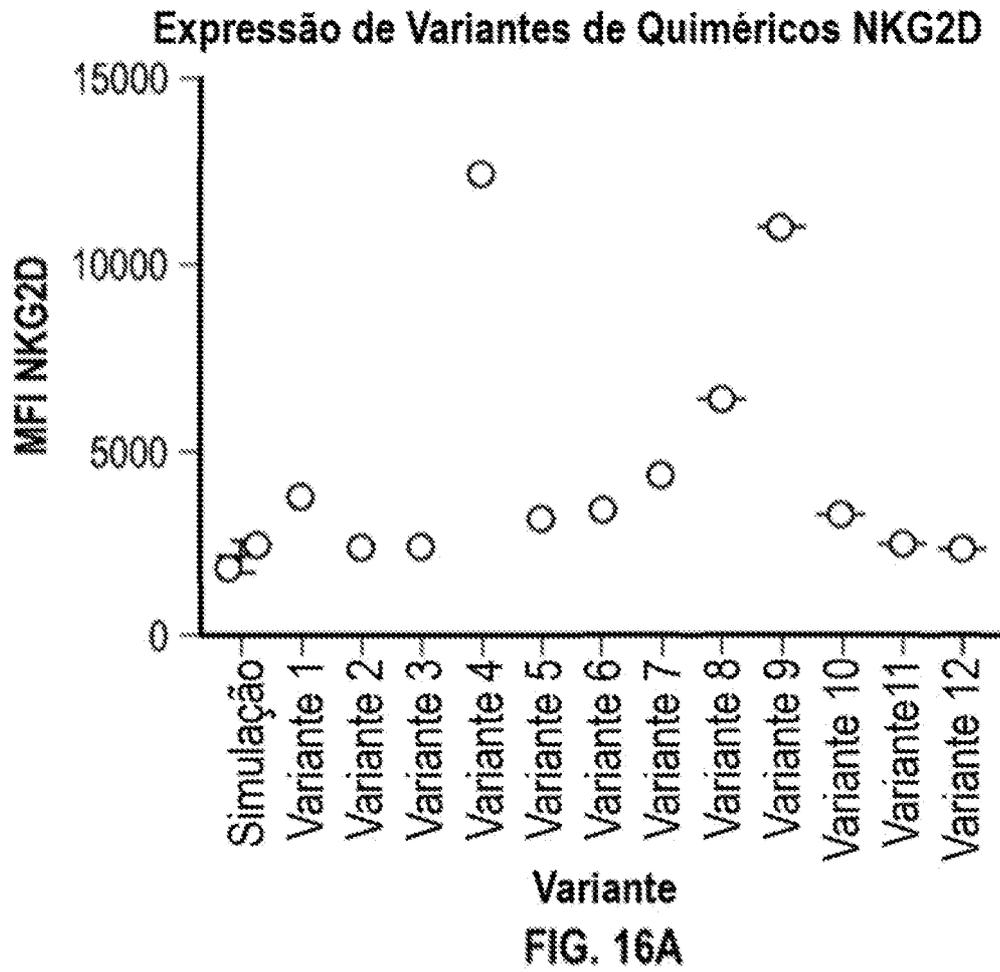
NK16	NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad	CD8 $\alpha$ TM	4-1BB	CD3 $\zeta$ ITAM
Variante 13	NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad	CD8 $\alpha$ TM	4-1BB 2B4	CD3 $\zeta$ ITAM
Variante 14	NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad	CD8 $\alpha$ TM	4-1BB	DAP10 IC
Variante 15	NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad	CD8 $\alpha$ TM	4-1BB	DAP10 IC 2B4
Variante 16	NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad	CD8 $\alpha$ TM	4-1BB 2B4	DAP10 IC
Variante 17	NKG2D EC (Códon Otimizado)	GS <sub>3</sub> NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad	CD8 $\alpha$ TM	4-1BB CD3 $\zeta$ ITAM
Variante 18 (NK39)	NKG2D EC (Códon Otimizado)	CD8 $\alpha$ Dobrad	CD3 $\zeta$ TM	CD16 IC	4-1BB
NK39_1	NKG2D EC (Códon Otimizado)	GS <sub>3</sub> NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad	CD3 $\zeta$ TM	CD16 IC 4-1BB 2A mL-15
NK39_2	NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad	CD3 $\zeta$ TM	CD16 IC	4-1BB GS <sub>3</sub> NKp80 2A mL-15

FIG. 15

NK39_3	NKG2D EC (Códon Otimizado)	GS <sub>3</sub>	NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD3 $\zeta$ TM	CD16 IC	4-1BB	GS <sub>3</sub>	NKp80	mIL-15
NK39_4	NKG2D EC (Códon Otimizado)		CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD3 $\zeta$ TM	4-1BB	2A	mIL-15			
NK39_5	NKG2D EC (Códon Otimizado)		CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD3 $\zeta$ TM	4-1BB	CD3Zeta	2A	mIL-15		
NK39_6	NKG2D EC (Códon Otimizado)		CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD3 $\zeta$ TM	4-1BB	GS <sub>3</sub>	NKp80	2A	mIL-15	
NK39_7	NKG2D EC (Códon Otimizado)		CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD3 $\zeta$ TM	4-1BB	GS <sub>3</sub>	CD16 IC	2A	mIL-15	
NK39_8	NKG2D EC		CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD3 $\zeta$ TM	4-1BB	FC Gama	2A	mIL-15		
NK39_9	IL-15	GS <sub>3</sub>	NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD8 $\alpha$ TM	4-1BB	Cd3 $\zeta$ ITAM			
NK39_10	NKG2D EC (Códon Otimizado)		CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD3 $\zeta$ TM	CD16 IC	4-1BB	2A	mIL-15		
NK16_7	NKG2D EC (Códon Otimizado)	GS <sub>3</sub>	NKG2D EC	CD8 $\alpha$ Dobrad.	CD8 $\alpha$ TM	4-1BB	Cd3 $\zeta$ ITAM	2A	mIL-15	

FIG. 15

(Continuação)



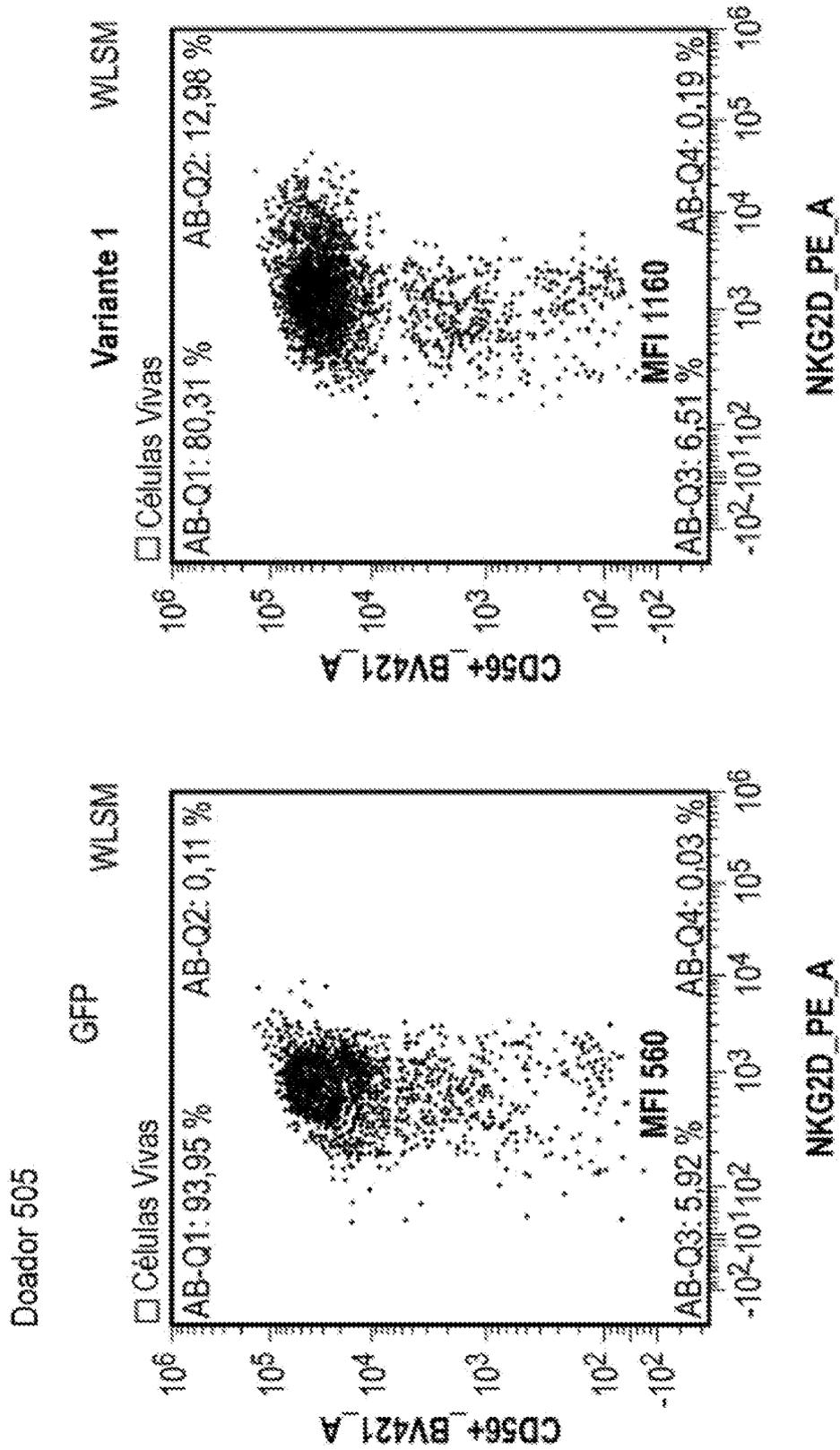


FIG. 16B

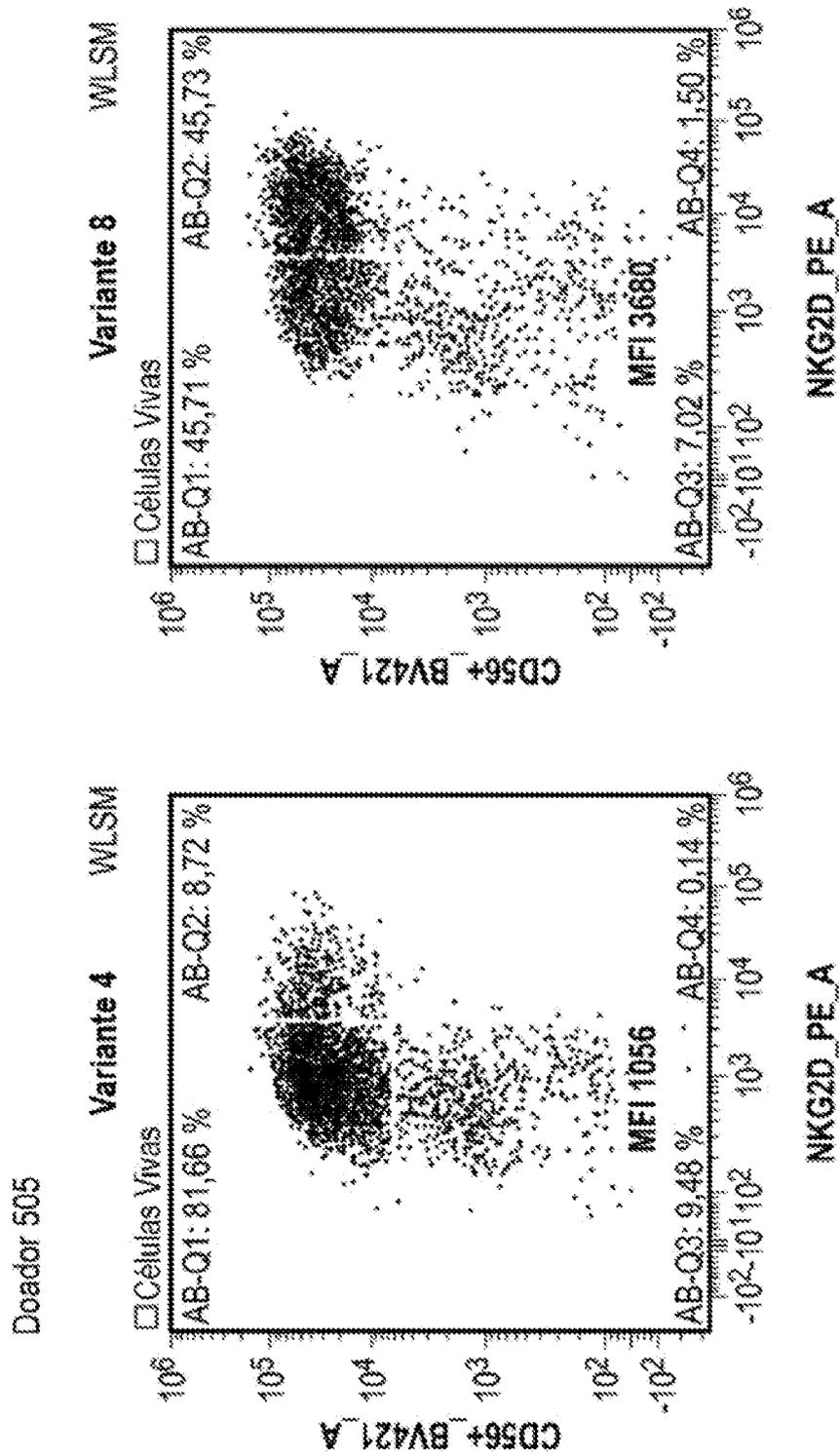


FIG. 16B  
(Continuação)

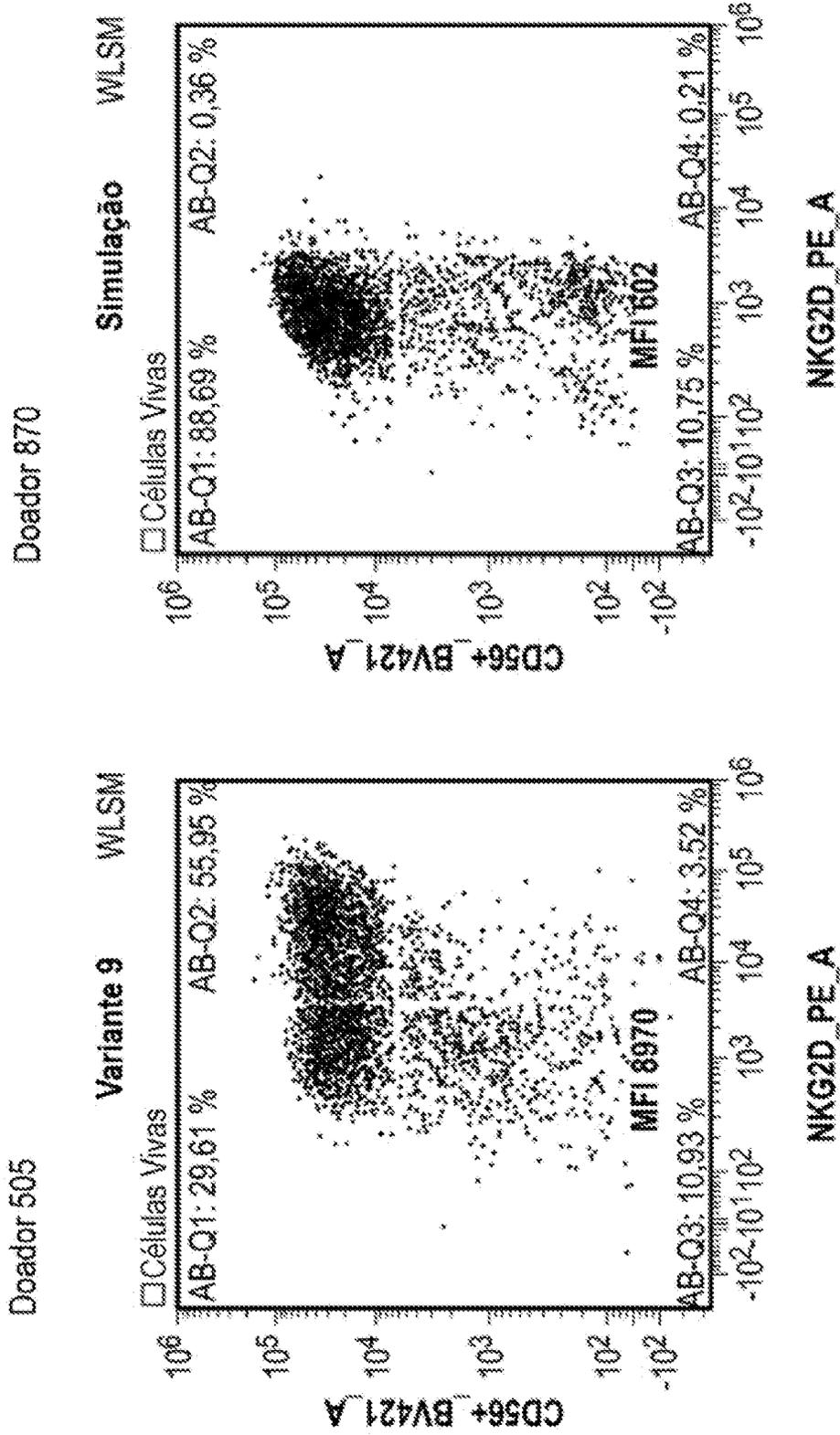


FIG. 16B  
(Continuação)

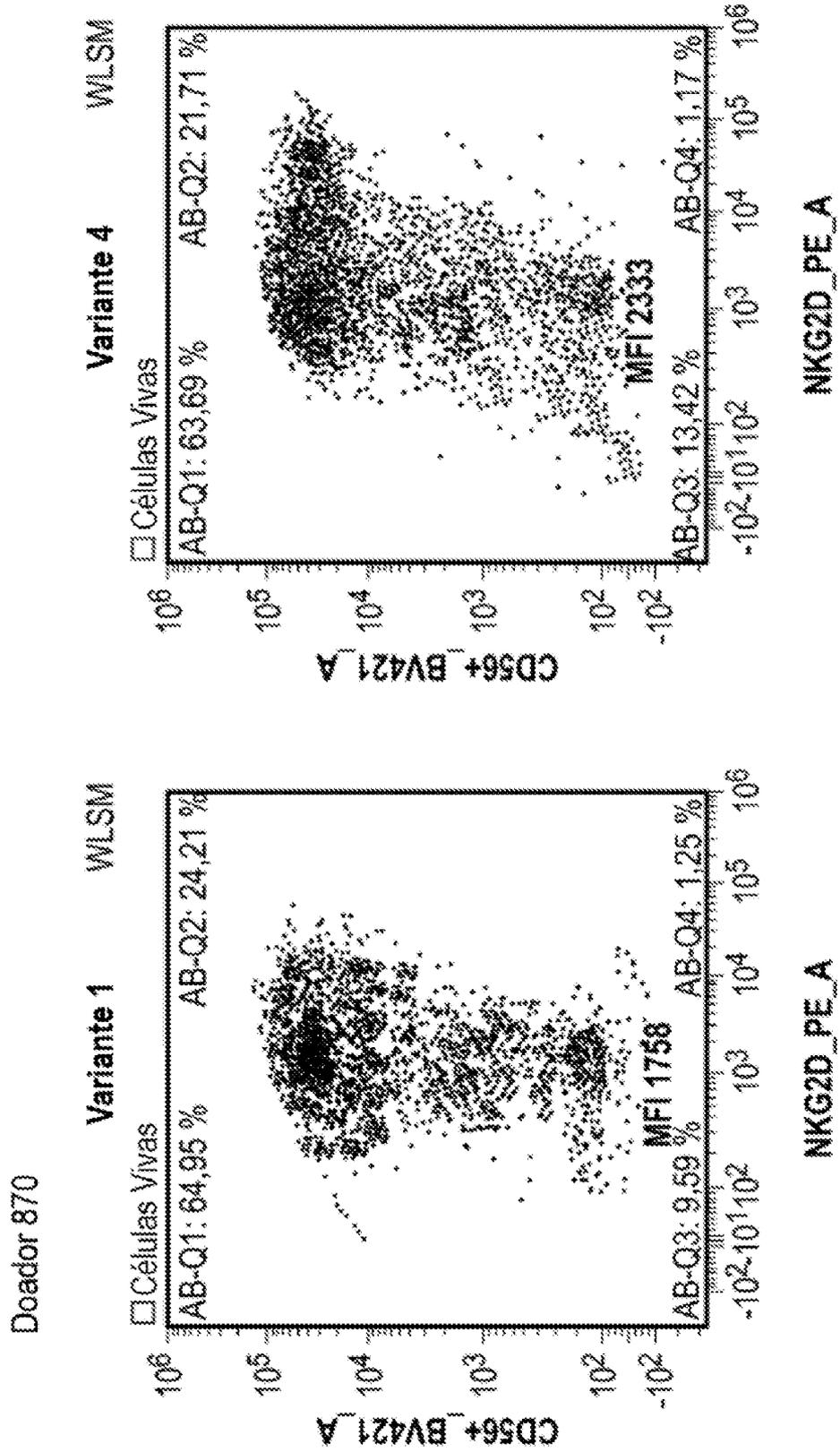


FIG. 16B  
(Continuação)

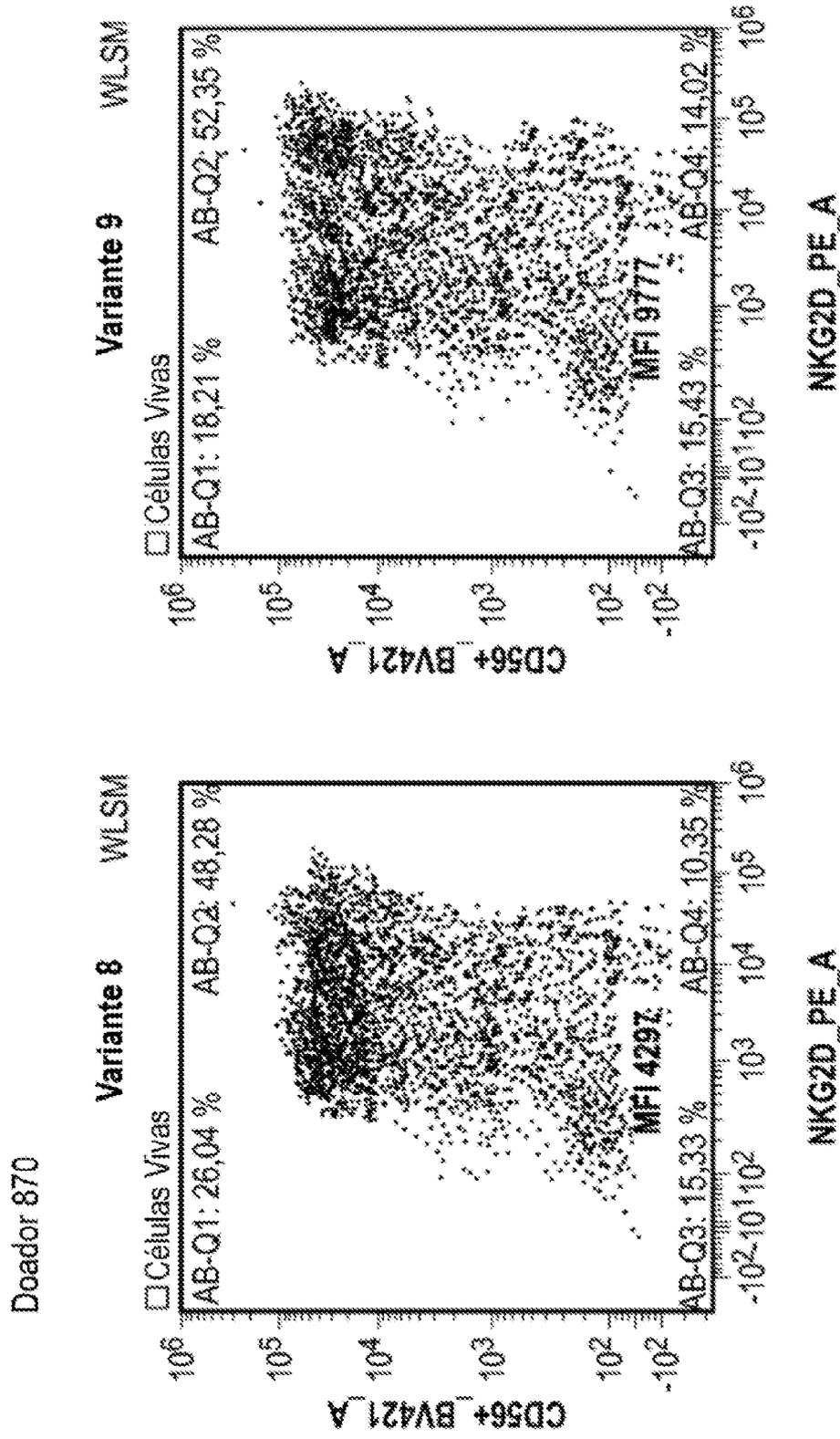
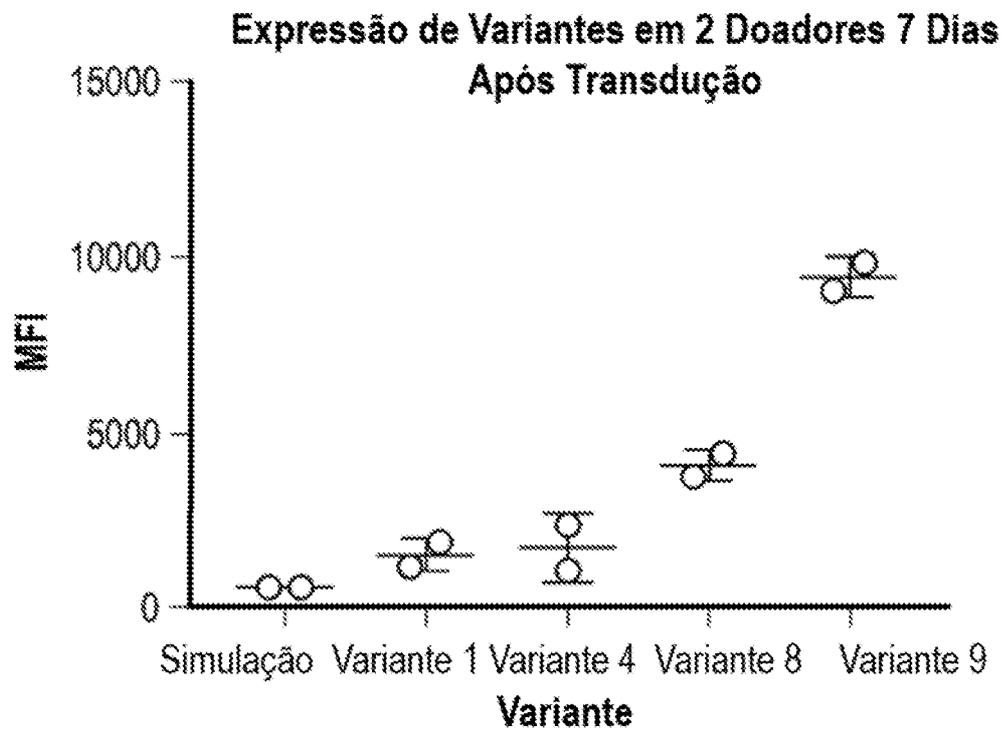
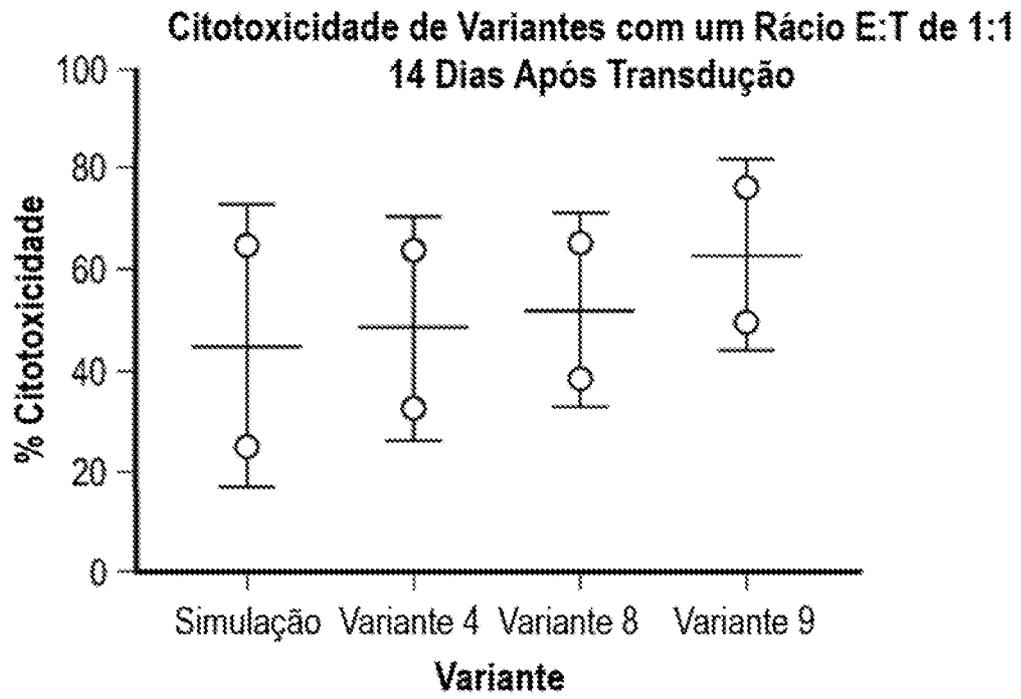


FIG. 16B  
(Continuação)

**FIG. 16C**

**FIG. 17**

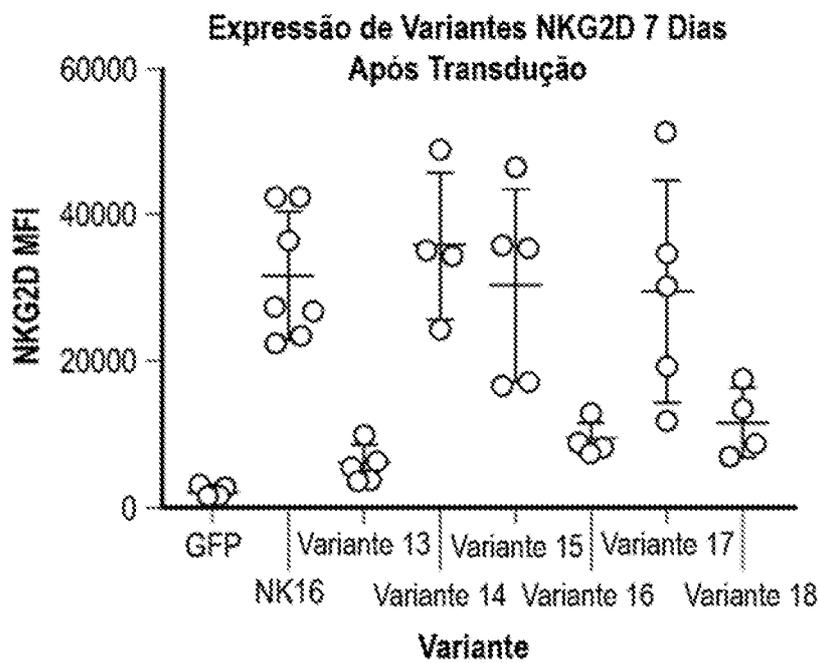


FIG. 18A

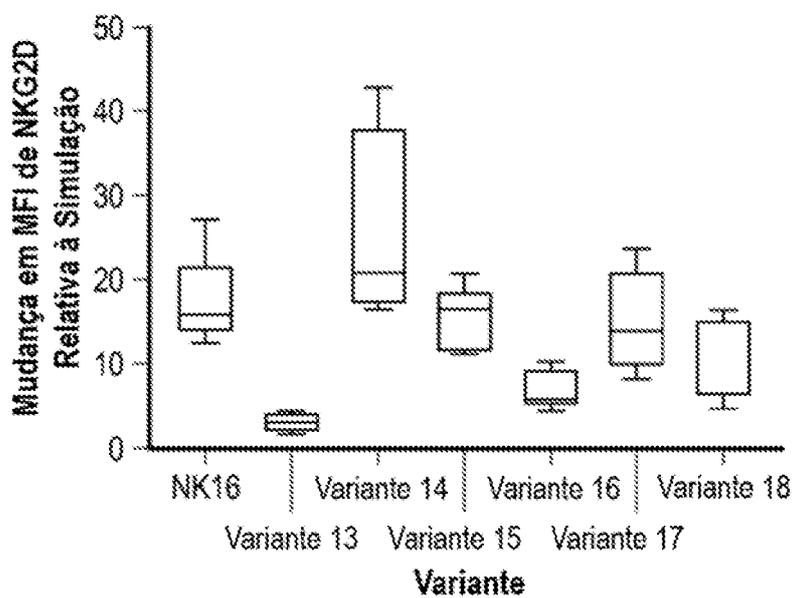


FIG. 18B

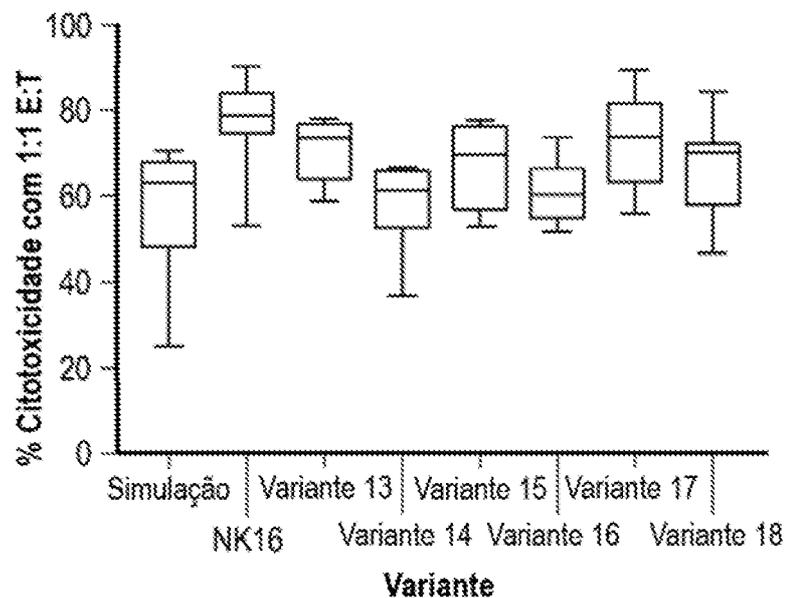


FIG. 19A

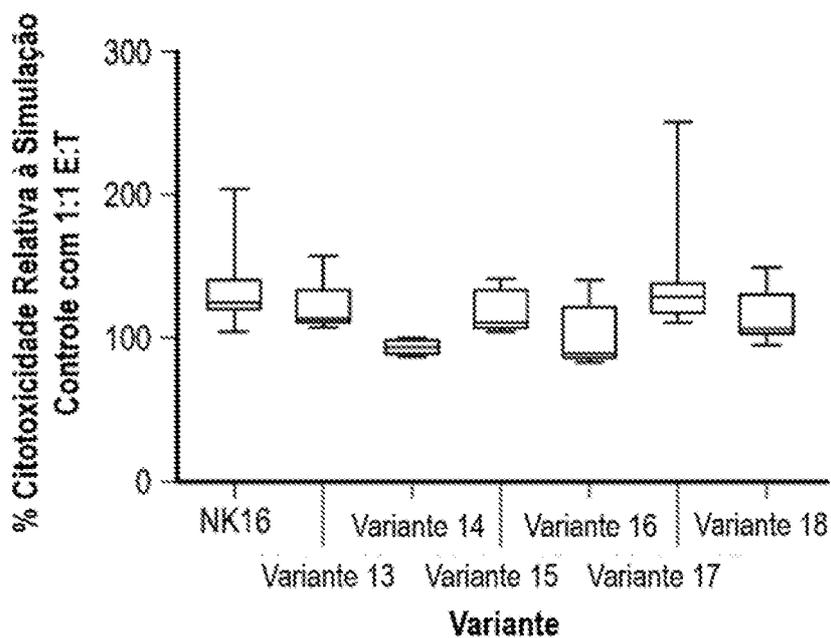


FIG. 19B

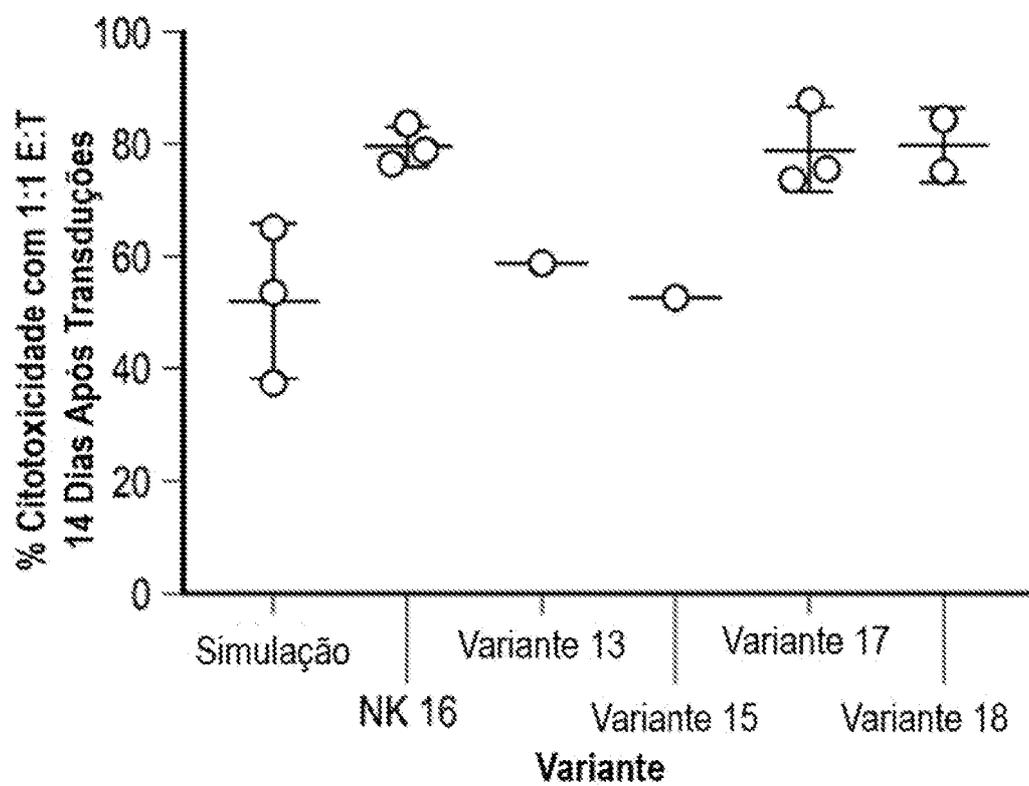


FIG. 20

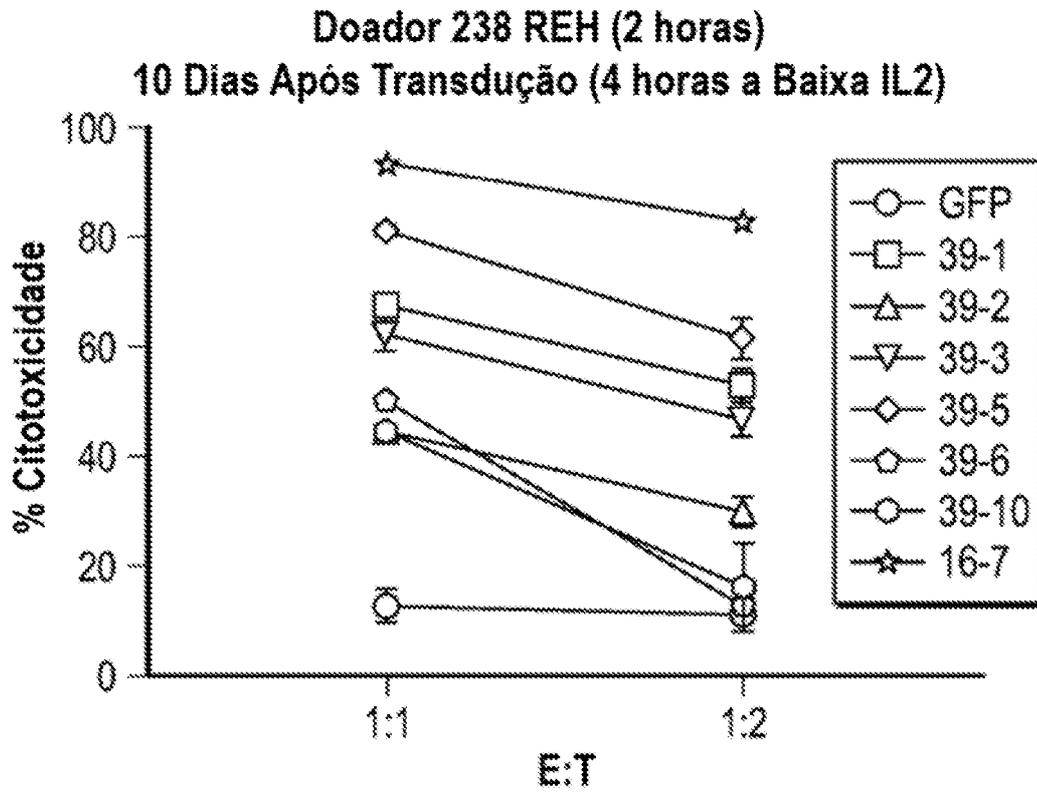
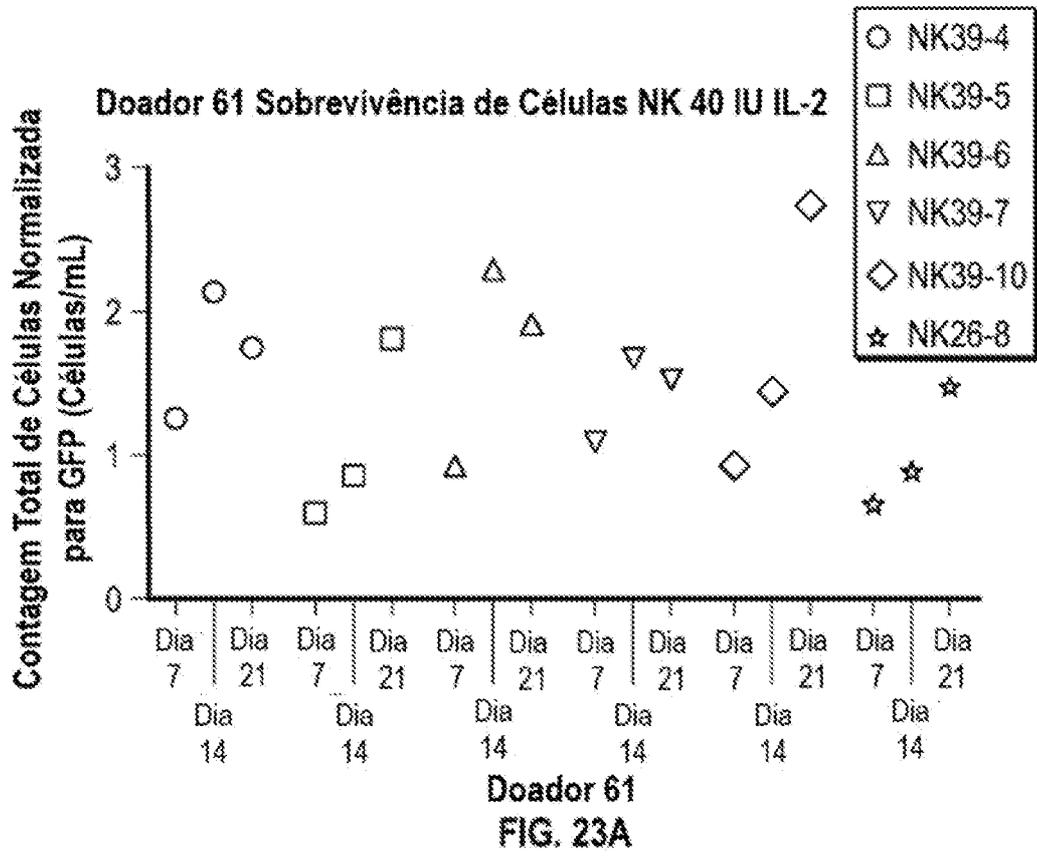


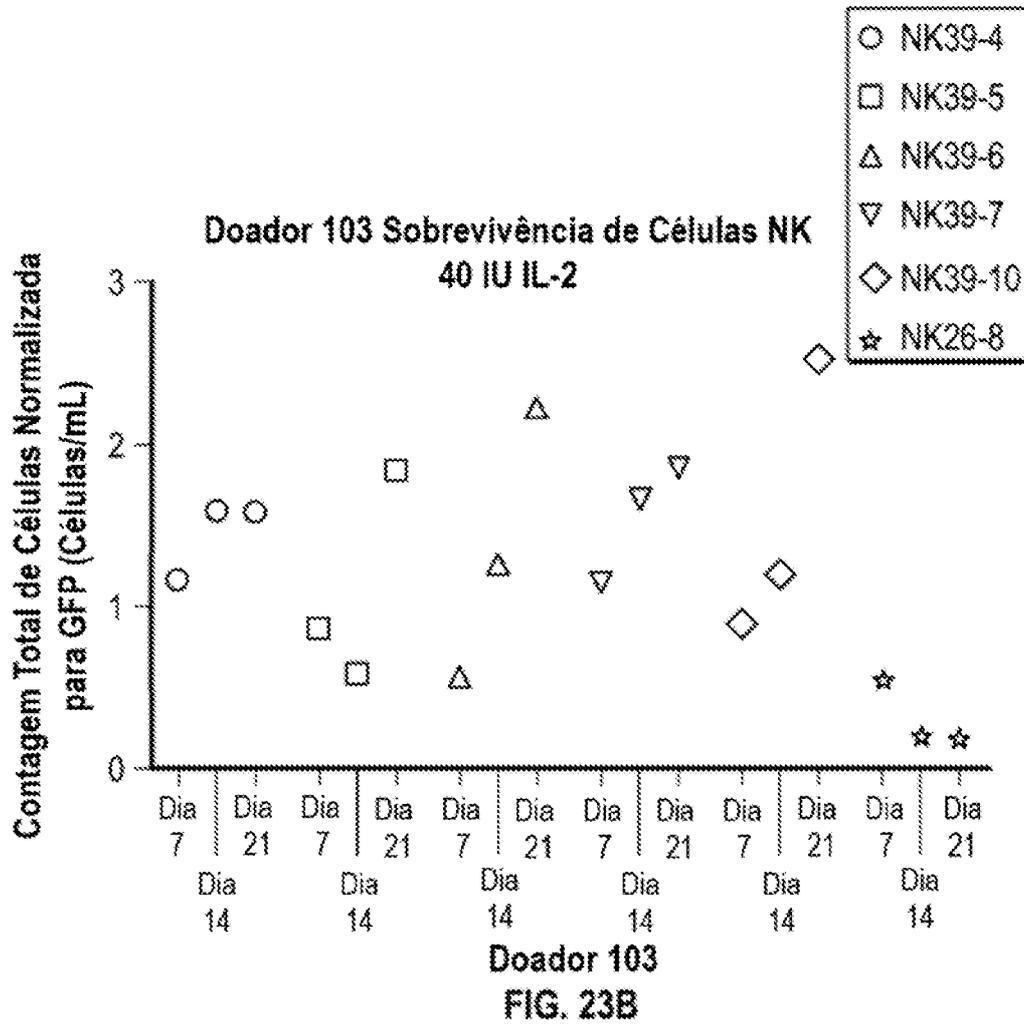
FIG. 21

**NKG2D (Dobração Curta) – 41BB – Cd3z IgG4 Dobração: ESKYGPPCPSCP)**

<b>NK45-1</b>	NKG2D EC	Ig4 SH	CD8 αTM	4-1BB	Cd3ζ ITAM	2A	mIL-15	
	NKG2D-CD28-CD3z							
<b>NK45-2</b>	NKG2D EC	CD8α Dobrad.	CD28 TM	CD28	Cd3ζ ITAM	2A	mIL-15	
	NKG2D (SH)-CD28 - CD3z							
<b>NK45-3</b>	NKG2D EC	Ig4SH	CD28 TM	CD28	Cd3ζ ITAM	2A	mIL-15	
	NKG2D-OX40-CD3z							
<b>NK45-4</b>	NKG2D EC	CD8α Dobrad.	CD8α TM	OX40	Cd3ζ ITAM	2A	mIL-15	
	NKG2D (SH)-OX40-CD3z							
<b>NK45-5</b>	NKG2D EC	Ig4SH	CD8α TM	OX40	Cd3ζ ITAM	2A	mIL-15	
	NKG2D-CD3TM-CD28-CD3z							
<b>NK45-6</b>	NKG2D EC	CD8α Dobrad.	CD3α TM	CD28	Cd3ζ ITAM	2A	mIL-15	
	NKG2D-CD28-41BB-CD3z							
<b>NK45-7</b>	NKG2D EC	CD8α Dobrad.	CD28 TM	CD28	4-1BB	Cd3ζ ITAM	2A	mIL-15

FIG. 22





Expressão de NKG2D em 4 Doadores 3 Dias Após Transdução

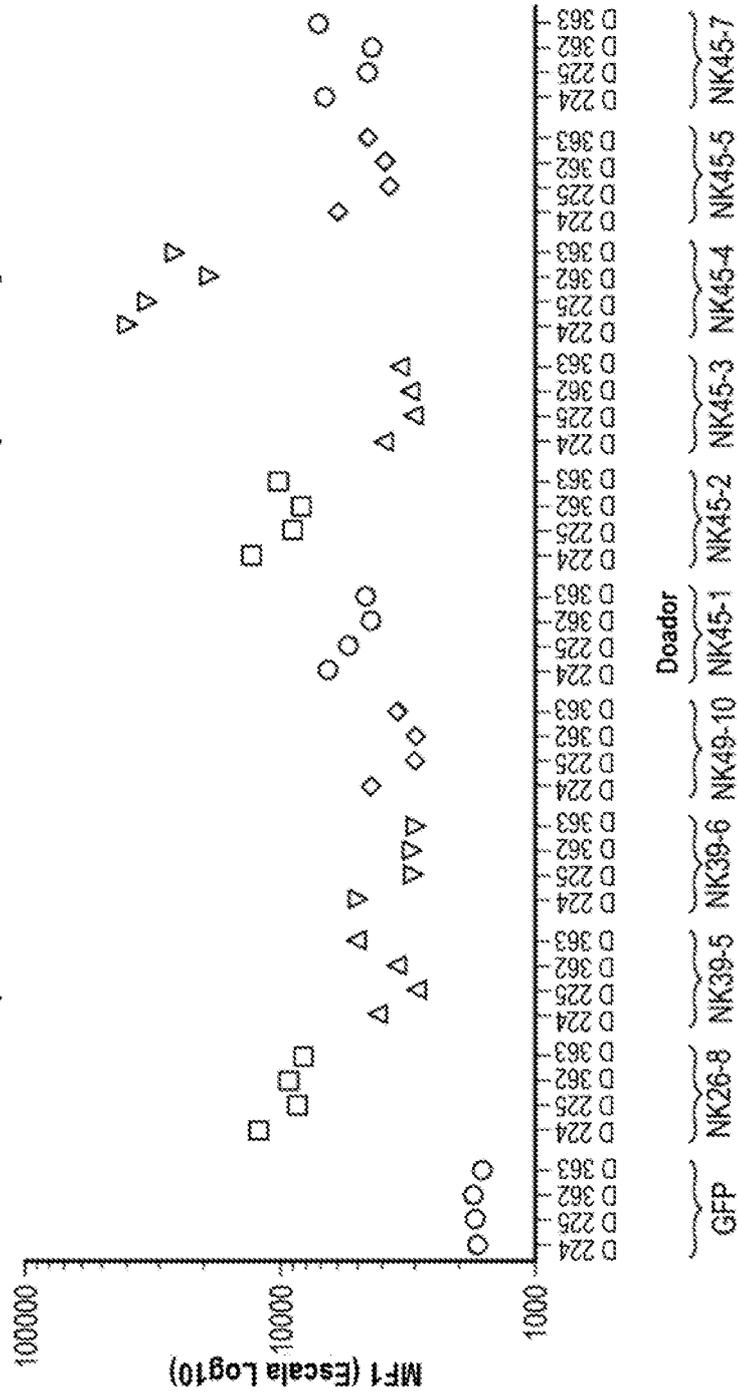


FIG. 24

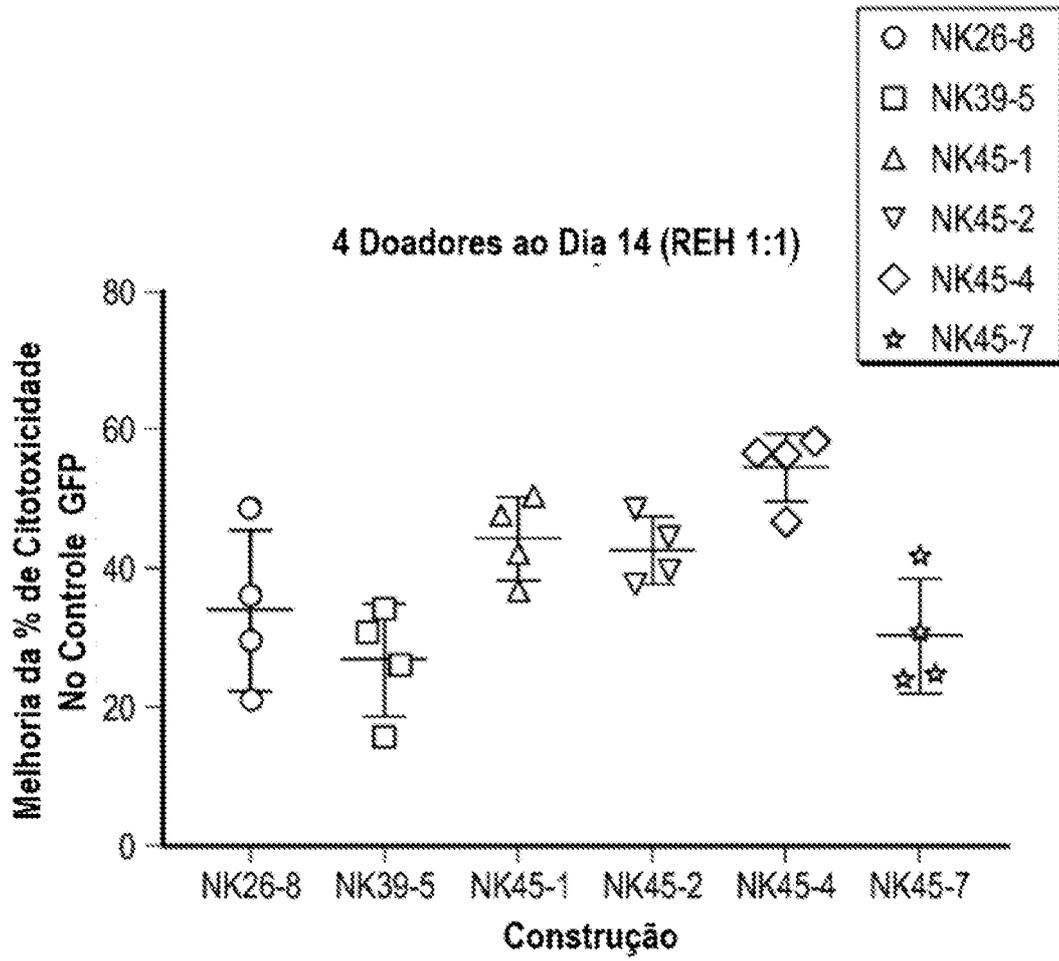


FIG. 25A

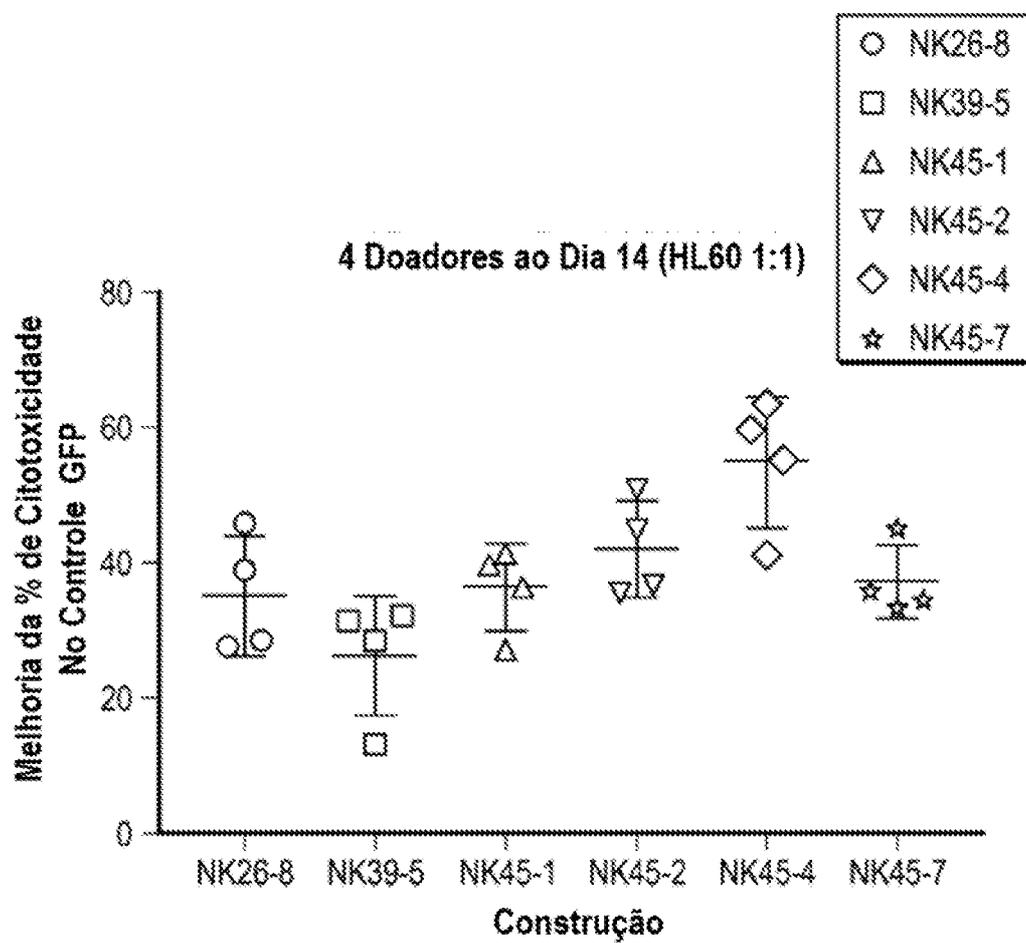


FIG. 25B

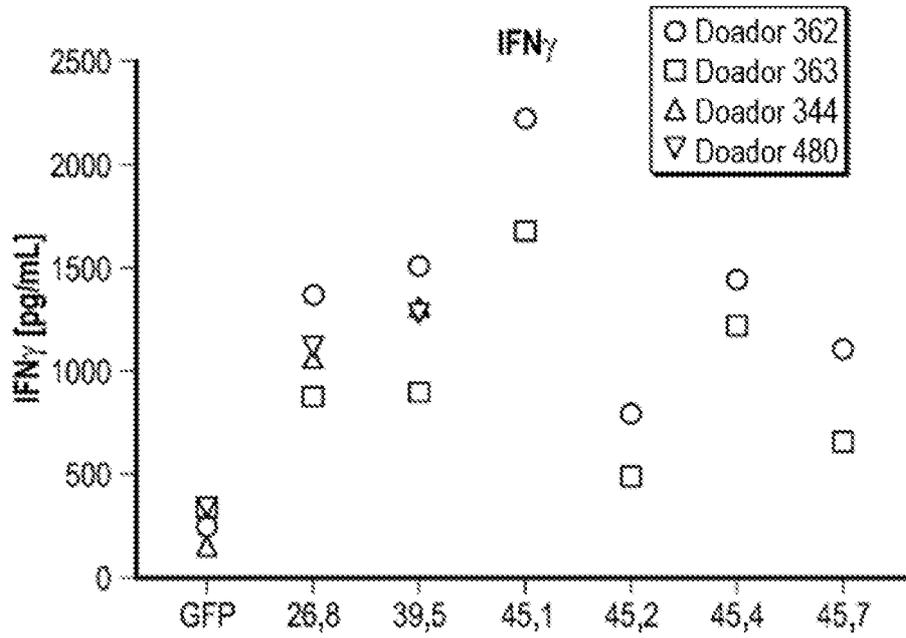


FIG. 26A

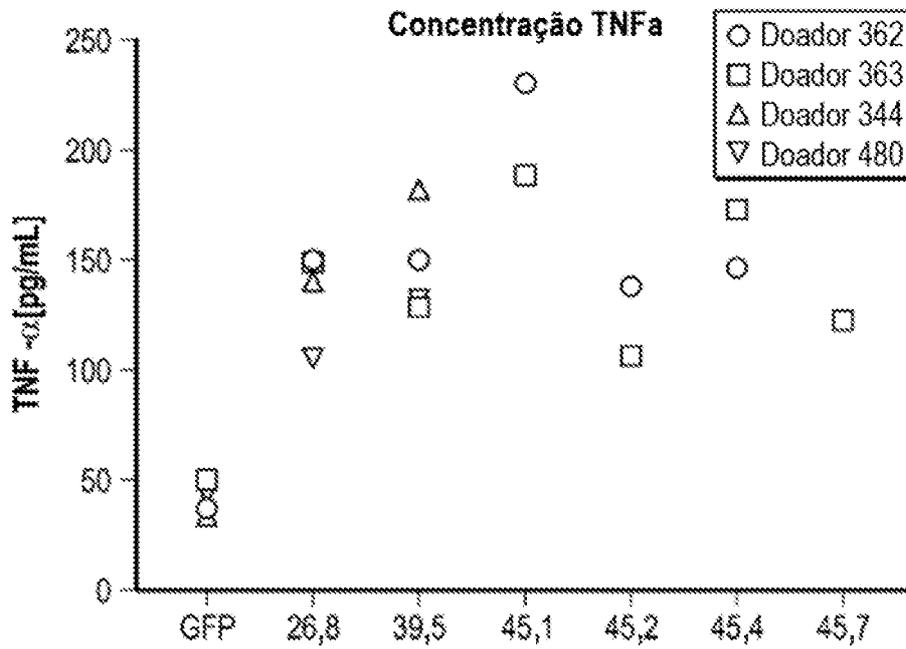


FIG. 26B

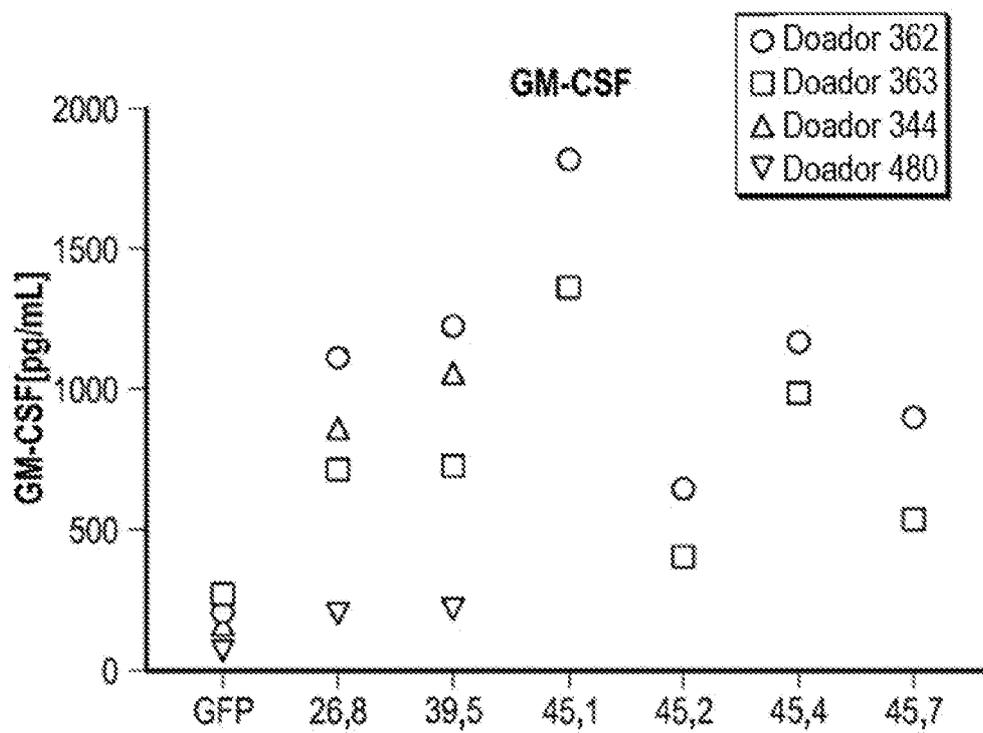


FIG. 26C

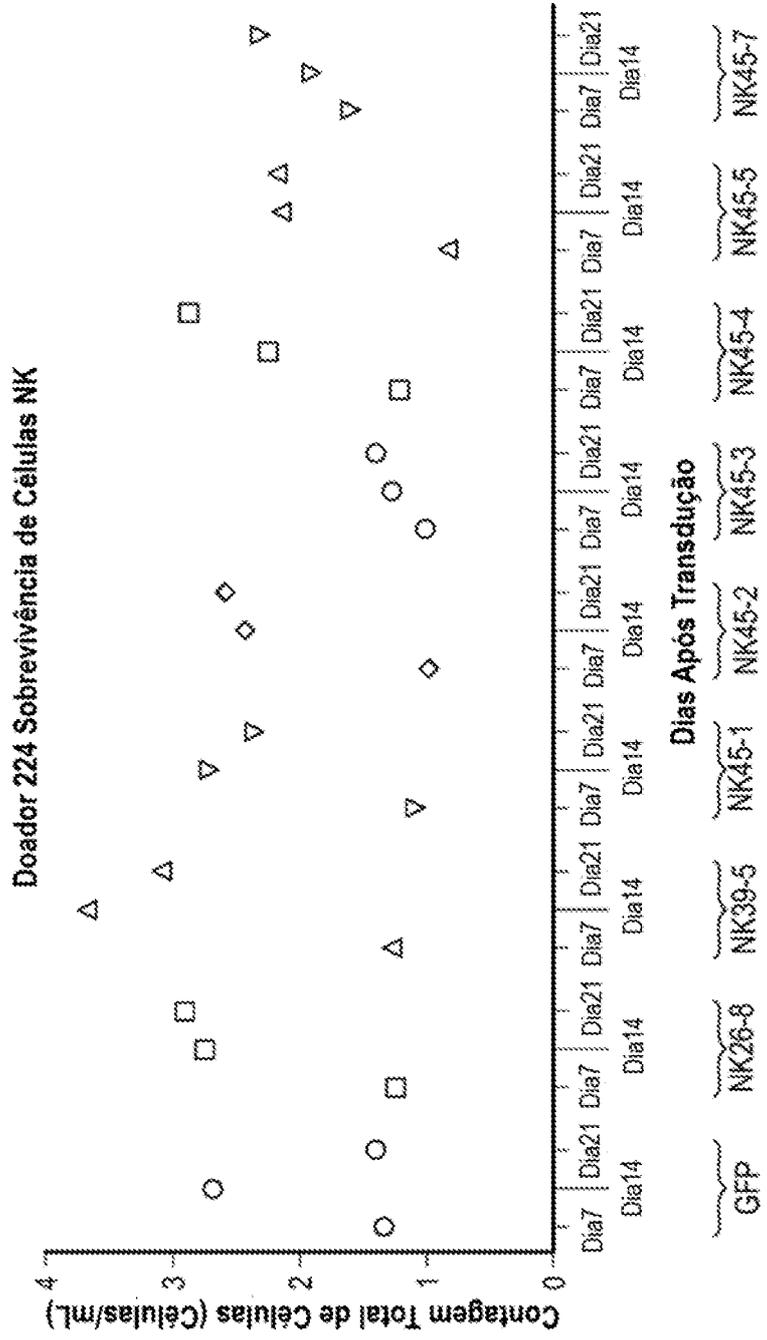
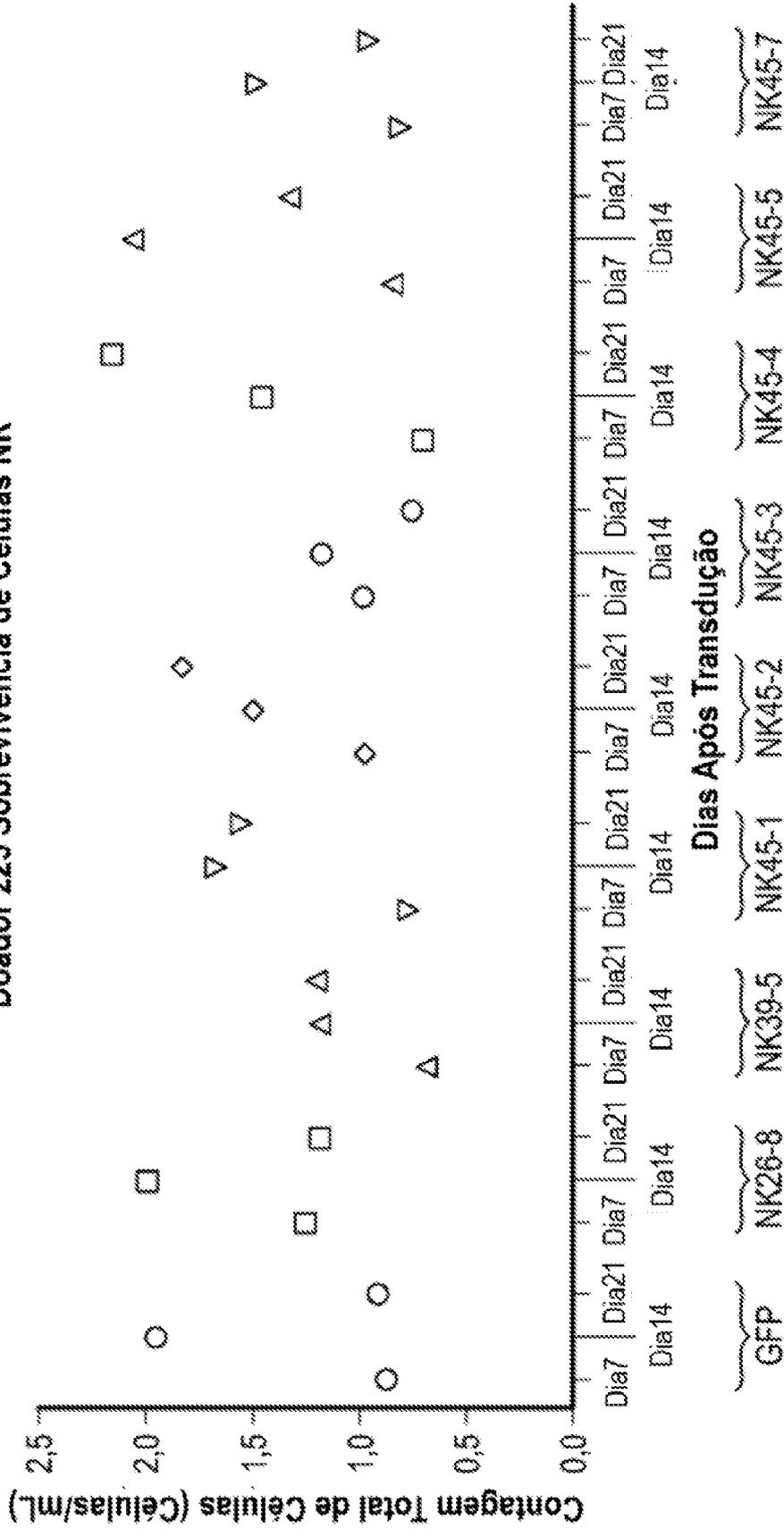


FIG. 27A

**Doador 225 Sobrevivência de Células NK**



**FIG. 27B**

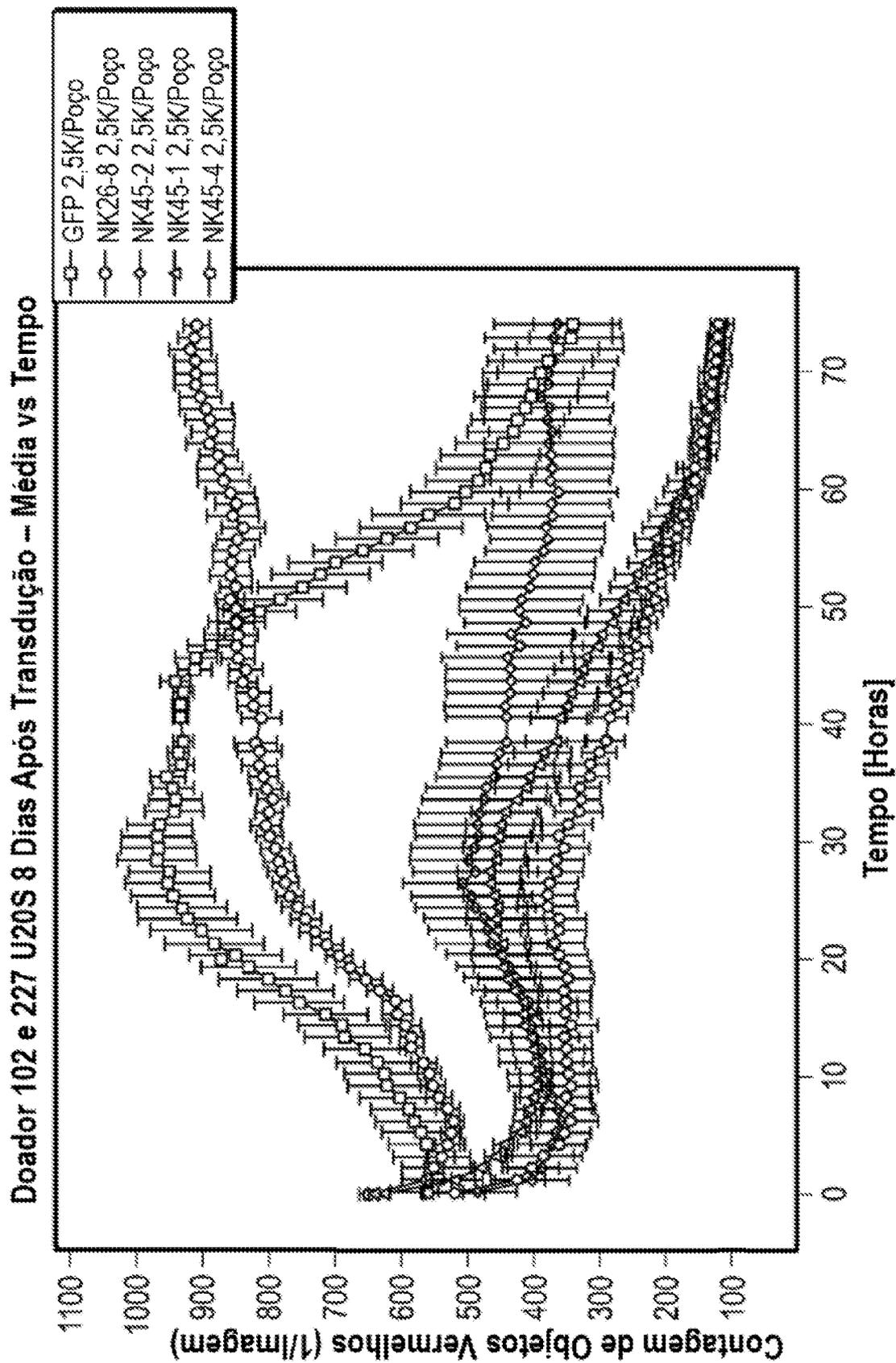


FIG. 28A

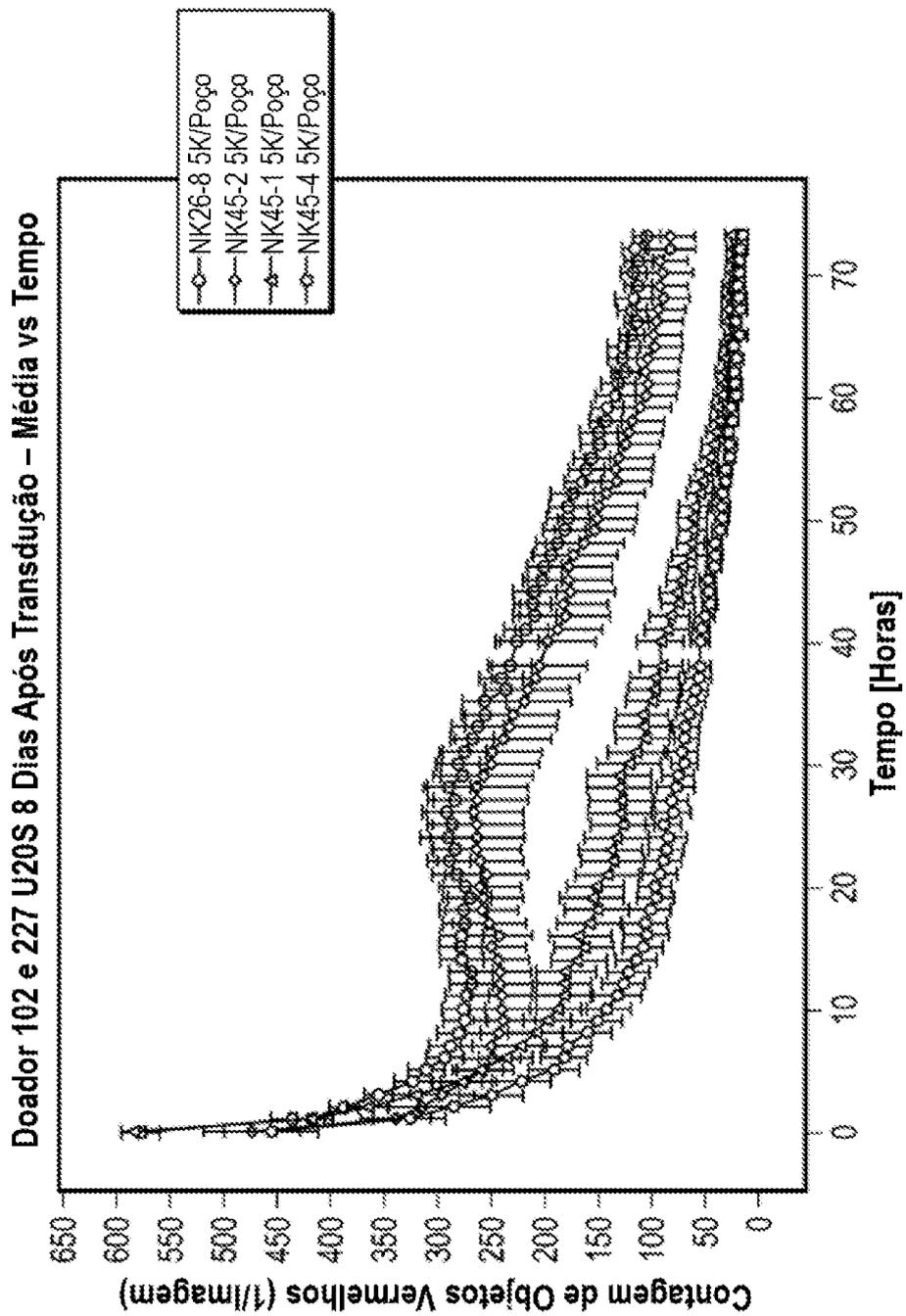


FIG. 28B

**RESUMO**

Patente de Invenção: **"RECEPTORES QUIMÉRICOS NKG2D TRUNCADOS E USOS DOS MESMOS EM IMUNOTERAPIA DE CÉLULAS EXTERMINADORAS NATURAIS"**.

Várias modalidades aqui divulgadas referem-se às composições compreendendo células Exterminadoras Naturais (NK) modificadas que expressam um receptor quimérico, o receptor quimérico transmitindo às células NK uma capacidade aumentada de atingir células específicas, tais como células cancerosas ou aquelas afetadas por uma doença infecciosa. Várias modalidades referem-se a células NK que têm como alvo células que expressam ligantes naturais de NKG2D, em que as células NK compreendem domínios transmembranares e/ou de sinalização que conduzem a efeitos citotóxicos e/ou citolíticos quando as células NK ligam uma célula-alvo. Usos de composições de células NK para tratar doenças são também proporcionados em várias modalidades.

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

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA (JUNTADA) P242564.TXT
- Data de Geração do Código: 21/10/2019
- Hora de Geração do Código: 10:47:26
- Código de Controle:
  - Campo 1: 8AD61E46235549C5
  - Campo 2: AB61D0C3AC66F296