

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 840**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0783** (2010.01)

**A61K 35/17** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2016 PCT/EP2016/063077**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16198480**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2016 E 16729531 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.12.2021 EP 3307875**

54 Título: **Procedimiento para la producción de células T TCRγδ<sup>+</sup>**

30 Prioridad:

**09.06.2015 PT 2015047568**

**12.05.2016 PT 2016032002**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.05.2022**

73 Titular/es:

**LYMPHACT - LYMPHOCYTE ACTIVATION  
TECHNOLOGIES, S.A. (100.0%)**

**Parque Tecnológico Cantanhede Lote 2  
3060-197 Cantanhede, PT**

72 Inventor/es:

**ANJOS, DIOGO ANTONIO REMECHIDO;  
CORREIA, DANIEL VARGAS y  
MARTINS DE ALMEIDA, AFONSO ROCHA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 908 840 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de células T TCR $\gamma\delta^+$

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos procedimientos para el aislamiento y la expansión selectiva *ex vivo* de células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 2^+$  y su aplicación clínica.

10 **Antecedentes de la invención****Células T TCR $\gamma\delta^+$** 

15 El sistema inmunológico de los vertebrados con mandíbula incluye varias poblaciones de linfocitos capaces de reconocer y eliminar las células tumorales, lo que constituye la base de la inmunoterapia del cáncer. Una población se caracteriza por la expresión de un receptor de células T (TCR) formado por la unión de una cadena gamma ( $\gamma$ ) y una cadena delta ( $\delta$ ). Las células T TCR $\gamma\delta^+$  (también designadas en esta invención como células T  $\gamma\delta$ ) representan del 1 al 10 % de los linfocitos de sangre periférica humana (PBL), pero se enriquecen sustancialmente en los tejidos epiteliales de individuos sanos, donde alcanzan hasta el 50 % de las células T. Las células T TCR $\gamma\delta^+$  <sup>1</sup> tienen una potente citotoxicidad sin restricciones del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) contra las células malignas e infectadas, al tiempo que dejan células y tejidos sanos ilesos. Por lo tanto, suelen considerarse como un mecanismo de vigilancia de primera línea frente a infecciones y tumores.<sup>1</sup>

25 En humanos, se identifican y clasifican diferentes subconjuntos o subpoblaciones de células T TCR $\gamma\delta^+$  según los genes que codifican su cadena  $\delta$ . Alrededor del 60 al 95 % de las células T TCR $\gamma\delta^+$  en la sangre periférica expresan la cadena V $\delta 2$  en asociación con la cadena V $\gamma 9$ , mientras que la mayoría del resto de las células T TCR $\gamma\delta^+$  expresan la cadena V $\delta 1$  en asociación con varios elementos V $\gamma$ : V $\gamma 2$ , V $\gamma 3$ , V $\gamma 4$ , V $\gamma 5$  o V $\gamma 8$ . Otras poblaciones de células T TCR $\gamma\delta^+$  (más raras) expresan las cadenas V $\delta 3$ , V $\delta 5$ , V $\delta 6$ , V $\delta 7$  y V $\delta 8$ .<sup>2-4</sup>

30 **Células T TCR $\gamma\delta 2^+$  V $\delta 2^+$** 

35 Las estrategias actuales de inmunoterapia adoptiva basadas en células T TCR $\gamma\delta^+$  se limitan a la subpoblación de células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 2^+$  (también designada en esta invención como células T V $\delta 2^+$ ).<sup>5,6</sup> La mayoría de las células T V $\delta 2^+$  responden específicamente a los alquilfosfatos no peptídicos, como el pirofosfato de isopentenilo (IPP), que se produce en niveles anormales en las células tumorales y en las personas expuestas a aminobifosfonatos que fortalecen los huesos, como el zoledronato y el pamidronato. Estos compuestos, cuando se combinan con la interleucina-2, estimulan la proliferación y la función citotóxica antitumoral de las células T V $\delta 2^+$  *in vitro*, y generan poblaciones de células purificadas para aplicaciones clínicas.<sup>5-7</sup> Sin embargo, los ensayos clínicos realizados hasta la fecha han mostrado un bajo porcentaje de respuestas objetivas en pacientes oncológicos.<sup>8</sup> Por consiguiente, los tratamientos actuales basados en células T  $\gamma\delta$ ,  
40 aunque viables y seguros, tienen limitaciones obvias.<sup>6</sup>

**Células T TCR $\gamma\delta 1^+$  V $\delta 1^+$** 

45 Las células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 1^+$  humanas (también designadas en esta invención como células T V $\delta 1^+$ ), constituyen del 1 al 40 % de todos los PBL TCR $\gamma\delta^+$ , pero son la principal población de células T  $\gamma\delta$  en sitios epiteliales, como el intestino y la piel. Si bien nunca se ha evaluado en ensayos clínicos, este subconjunto de células también puede mostrar una fuerte actividad antitumoral. Las células T V $\delta 1^+$  infiltradas en tumores de piel, colon, riñón y pulmón fueron citotóxicas frente a células cancerosas tanto autólogas como alogénicas.<sup>9-13</sup> También se descubrió una correlación interesante entre el aumento en el número de células T V $\delta 1^+$  de sangre periférica procedente de donantes y la supervivencia libre de enfermedad mejorada de 5 a 10 años después del trasplante de médula ósea para la leucemia linfoblástica aguda (LLA).<sup>14</sup> Es importante destacar que las células T V $\delta 1^+$  infundidas persistieron en estos pacientes por varios años.<sup>14, 15</sup> En otro entorno, los pacientes con linfoma no Hodgkin de bajo grado con un alto recuento de células T V $\delta 1^+$  experimentaron una enfermedad estable en el seguimiento de 1 año, un curso clínico mejorado en comparación con aquellos con un número más bajo de células T V $\delta 1^+$ .<sup>16</sup> Las células T V $\delta 1^+$  circulantes también aumentan típicamente en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC)<sup>17</sup> y se han asociado con la no progresión en pacientes con LLC-B de bajo riesgo.<sup>18</sup> Finalmente, los aumentos cuantitativos en las células T V $\delta 1^+$  circulantes también se observaron en infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>19</sup> y paludismo<sup>20</sup>, así como en infecciones por citomegalovirus humano (CMVH) después de un trasplante renal.<sup>4, 21</sup> Sin embargo, en diferentes circunstancias, las subpoblaciones de células T V $\delta 1^+$  pueden exhibir propiedades inmunosupresoras y reguladoras, una función que también puede aprovecharse con fines terapéuticos.<sup>22</sup>

60 Se ha descrito una pequeña cantidad de procedimientos para expandir específicamente las células T V $\delta 1^+$  *in vitro*, aunque ninguno de ellos podría adaptarse para aplicaciones clínicas (revisado en Siegers, G. y col., 2014, ref.<sup>22</sup>). Meeh y col. Mostraron por primera vez que las células T V $\delta 1^+$  de donantes sanos podían expandirse *ex vivo* en respuesta a los blastos leucémicos de la LLA.<sup>23</sup> Knight, A. y colaboradores, y Merims, S. y colaboradores aislaron células T V $\delta 1^+$  de sangre

periférica y las trataron en presencia de fitohemaglutinina (PHA) o anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD3, IL-2 y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) alogénicas irradiadas, durante 3 semanas.<sup>24, 25</sup> En un estudio más reciente, se utilizó PHA en combinación con interleucina-7 (IL-7).<sup>26</sup> Siegers, G. y *col.* informaron sobre un protocolo de cultivo de dos etapas, donde células T **TCR $\gamma\delta^+$**  clasificadas se trataron primero con concanavalina-A (ConA), IL-2 e IL-4 durante 6-8 días, seguido de una estimulación con IL-2 e IL-4 durante otros 10 días.<sup>27</sup> Después del período de cultivo, las células T **V $\delta 1^+$**  se expandieron en el 59 % de los cultivos y fueron el subconjunto dominante (promedio del 70 % de células T **V $\delta 1^+$** ) en la mitad de los cultivos. Sin embargo, con este procedimiento, se pudo alcanzar un aumento máximo de 25 veces de células T **V $\delta 1^+$** .<sup>27</sup> Este procedimiento de cultivo de 2 etapas también se describió en la solicitud de patente internacional número PCT/CA99/01024 (publicada como WO 00/26347). Según esos inventores, para la proliferación celular continuada tras la eliminación del mitógeno, tanto la IL-2 como la IL-4 en el segundo medio de cultivo eran esenciales. Más tarde se desarrolló una variación de este protocolo, donde las PBMC totales se cultivaron primero en presencia de ConA, IL-2 e IL-4 durante 6 a 13 días, seguido por el agotamiento magnético de células T **TCR $\alpha\beta^+$**  contaminantes y la estimulación de las células restantes con IL-2, IL-4 y ConA durante otros 10 días. Después de 21 días, las células T **V $\delta 1^+$**  se expandieron de 136 a 24.384 veces, aunque se pudo lograr un nivel de pureza mucho más bajo (menos del 30 % de las células en cultivo eran células T **V $\delta 1^+$** ), mientras que la mayoría de las células contaminantes (alrededor del 55 % de las células) eran células T **V $\delta 2^+$** .<sup>28</sup>

Finalmente, nuestro grupo ha descrito anteriormente un procedimiento para expandir y diferenciar selectivamente poblaciones celulares enriquecidas en células T **V $\delta 1^+$**  que expresan receptores naturales de citotoxicidad (NCR) que podrían mediar en la eliminación mejorada de líneas celulares de leucemia y células neoplásicas de pacientes con LLC.<sup>29</sup> Este procedimiento patentado consistió en cultivar células T **TCR $\gamma\delta^+$**  o precursores de las mismas en un medio de cultivo tras la estimulación con citocinas de cadena  $\gamma$  y comunes (como IL-2 o IL-15) y agonistas de TCR (por ejemplo, PHA o mAb anti-CD3) durante 2 a 3 semanas (Solicitud de patente internacional No. PCT/IB2012/052545 publicada como WO 2012/156958). Una limitación importante de este procedimiento es el pequeño número de células obtenidas, el cual es inadecuado para aplicaciones clínicas.

#### Otros subconjuntos de células T **TCR $\gamma\delta^+$**

La mayoría de las células T **TCR $\gamma\delta^+$**  no **V $\delta 1^+$**  y no **V $\delta 2^+$**  en los humanos expresan la cadena TCR **V $\delta 3$** . Las células T **TCR $\gamma\delta^+$**  **V $\delta 3^+$**  humanas representan el -0,2 % de las células T circulantes,<sup>30</sup> pero están enriquecidas en la sangre periférica de los receptores de trasplantes de células madre y renales con activación del CMV,<sup>4, 21</sup> en pacientes con infección por VIH<sup>31</sup> o con LLC B,<sup>17</sup> y en hígados sanos.<sup>32</sup> Las células T **TCR $\gamma\delta^+$**  **V $\delta 3^+$**  activadas fueron capaces de matar las células CD1d<sup>+</sup> y tumores epiteliales *in vitro*.<sup>4</sup> Sin embargo, los procedimientos de cultivo celular disponibles no pueden producir grandes cantidades de células T **TCR $\gamma\delta^+$**  **V $\delta 3^+$**  para aplicaciones clínicas.

#### Otros procedimientos para la producción de poblaciones enriquecidas en células T **TCR $\gamma\delta^+$**

Se han utilizado varios procedimientos para la expansión simultánea de varios subconjuntos de poblaciones de células T **TCR $\gamma\delta^+$**  *in vitro*. Las PBMC totales se trataron con mAb anti-TCR $\gamma\delta$  unido a la placa e IL-2 durante 3 semanas, lo que resultó en alrededor del 90 % de células T **TCR $\gamma\delta^+$** , la mayoría de las cuales eran células T **V $\delta 2^+$**  y un pequeño porcentaje eran células T **V $\delta 1^+$** .<sup>33</sup> López, y *col.* generaron células T **TCR $\gamma\delta^+$**  resistentes a la apoptosis mediante el tratamiento de células con dosis altas de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-12, mAb anti-CD2 y mAb anti-CD3 soluble, en presencia de IL-2. Las células T **V $\delta 2^+$**  fueron el subconjunto dominante después de la expansión celular.<sup>34</sup> Más recientemente, las células T **TCR $\gamma\delta^+$**  policlonales se expandieron en presencia de células presentadoras de antígeno artificiales irradiadas con y (aAPC) de origen tumoral modificadas genéticamente para coexpresar CD19, CD64, CD86, CD137L e IL-15 unida a la membrana.<sup>3, 35</sup> Las células se cultivaron adicionalmente en presencia de IL-2 e IL-21 solubles.

#### Necesidad de procedimientos mejorados para expandir las células T **TCR $\gamma\delta^+$** **V $\delta 2^-$** *in vitro*

Estudios recientes han demostrado que las células T **TCR $\gamma\delta^+$**  con la cadena **V $\delta 1$** , así como también las que no tienen cadenas **V $\delta 1$**  ni **V $\delta 2$** , tienen propiedades que las hacen efectoras anticancerígenas más atractivas en la inmunoterapia adoptiva.<sup>36</sup> Las células T **TCR $\gamma\delta^+$**  **V $\delta 2^-$**  (también designadas en esta invención como células T  $\gamma\delta$  **V $\delta 2^-$** ) exhibieron una mayor citotoxicidad antitumoral y mayores capacidades de supervivencia que las células T **V $\delta 2^+$** , tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>26, 29, 37</sup> En consecuencia, se espera que un medicamento altamente enriquecido en células T  $\gamma\delta$  **V $\delta 2^-$**  genere efectos antitumorales más potentes y brinde mejores beneficios a los pacientes tratados. Si bien se han descrito varios procedimientos en los últimos 5 años que pueden generar cantidades sustanciales de células T  $\gamma\delta$  **V $\delta 2^-$**  dirigidas a tumores *in vitro*, los problemas clave no resueltos seguían excluyendo una aplicación clínica de estas células: 1) el uso de reactivos y materiales inseguros en el procedimiento de fabricación; 2) el alto nivel de variación en la composición de los productos celulares finales, especialmente de productos celulares obtenidos de diferentes donantes, o de pacientes con cáncer; y/o 3) la baja actividad antitumoral del producto final.<sup>22, 27, 28, 38</sup> En la técnica, existe una necesidad de procedimientos de cultivo celular confiables de grado clínico que puedan generar una gran cantidad de células T  $\gamma\delta$  **V $\delta 2^-$**  esencialmente puras (es decir, que comprendan > 90 % de estas células) *in vitro* o *ex vivo*, consistentemente y con eficacia similar de diferentes donantes, especialmente de pacientes con cáncer.

Datos clínicos previos sobre las células T **V $\delta 2^+$**  infundidas sugirieron que una dosis clínicamente relevante de células T **TCR $\gamma\delta^+$**  para el tratamiento de una enfermedad comprenden al menos alrededor de  $1 \times 10^9$  células vivas.<sup>39</sup> En

consecuencia, los procedimientos destinados a generar células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> para aplicaciones clínicas deberían poder expandir estas células *in vitro* al menos 1.000 veces. Sin embargo, las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> no responden a los alquilfosfatos y el conocimiento muy limitado sobre los antígenos que reconocen ha limitado su expansión *in vitro*. Se han utilizado lectinas vegetales como PHA y Con-A para expandir y enriquecer (a niveles de pureza muy altos) estas células *in vitro*, a escala preclínica. En consecuencia, y debido a razones aún desconocidas, estos mitógenos comunes son notablemente selectivos para las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup>, promoviendo su proliferación en cultivo, mientras inhiben el crecimiento (o inducen la apoptosis) de las células T V $\delta$ 2<sup>+</sup> contaminantes.<sup>27, 29</sup> Sin embargo, las lectinas vegetales pueden ser tóxicas si se infunden inadvertidamente en humanos y las agencias reguladoras no recomiendan su uso para aplicaciones clínicas, debido a problemas de seguridad. Además, según nuestros datos, las lectinas vegetales no son tan eficientes como los anticuerpos monoclonales para inducir la expansión de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> *in vitro*, generando un menor número de células. Varios grupos han cultivado células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-CD3, en lugar de PHA. Sin embargo, el mAb anti-CD3 se une a las moléculas de CD3 que también se expresan en células T CD3<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> contaminantes y células T CD3<sup>+</sup> V $\delta$ 2<sup>+</sup>, lo que provoca una disminución en los niveles de pureza del producto celular final. En consecuencia, las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> deben aislarse mediante clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) o clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) antes de la estimulación con mAb anti-CD3.<sup>25, 4\*</sup> Para complicar aún más las cosas, los reactivos críticos como el mAb anti-TCR $\gamma\delta$ , el mAb anti-TCRV $\delta$ 1 y el mAb anti-TCRV $\delta$ 3 utilizados para aislar las células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> totales, las células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> V $\delta$ 1<sup>+</sup> y las células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> V $\delta$ 3<sup>+</sup>, respectivamente, no se fabrican ni son aprobadas actualmente (por las agencias reguladoras) para el uso clínico. Por lo tanto, no ha sido posible generar cantidades suficientes de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> purificadas adecuadas para la aplicación directa en seres humanos.<sup>22</sup> En la técnica, existe una necesidad de procedimientos que no se basen en lectinas de plantas y otros reactivos inseguros para la producción de poblaciones de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> purificadas.

En un estudio previo, Deniger y col. desarrolló células presentadoras de antígenos artificiales derivadas de tumores (aAPC) para propagar grandes cantidades de células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> que expresan un repertorio policlonal de cadenas TCR  $\gamma$  y  $\delta$ .<sup>37</sup> Sin embargo, como señalaron los autores,<sup>41</sup> el procedimiento no pudo resolver los obstáculos críticos asociados con la aplicación clínica de las células T<sup>+</sup> TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>. Por ejemplo, la mayoría de los ingredientes no se producen actualmente en calidad GMP y los desarrollos adicionales aún dependen del interés futuro de los fabricantes, aprobaciones regulatorias complejas, suponiendo que el mismo producto celular se puede obtener con diferentes reactivos y de pacientes con cáncer. Además, en este estudio faltaban detalles clave sobre la composición exacta (y la variabilidad) de los productos celulares generados, lo que dificultaba, por consiguiente, la posible aplicación de este procedimiento.

La interleucina-2, la interleucina-7 y la interleucina-15 son moléculas muy pleiotrópicas, con fuertes efectos estimulantes sobre múltiples células inmunitarias, incluyendo las células T TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> y T V $\delta$ 2<sup>+</sup>. En consecuencia, estos reactivos no son adecuados para expandir las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> *in vitro*, ya que las células contaminantes también se expandirán en el cultivo, comprometiendo la pureza celular. Además, la combinación típica de estas citocinas proinflamatorias con agonistas de  $\gamma\delta$ TCR a menudo conduce a la muerte celular inducida por activación (AICD) de las células estimuladas y a un menor número de células obtenidas. En la técnica, existe una necesidad de procedimientos que puedan basarse en reactivos más selectivos para expandir células T V $\delta$ 2<sup>-</sup>  $\gamma\delta$  a partir de muestras de partida altamente impuras.

La combinación de la IL-2 y la IL-4 se ha utilizado con algún éxito para expandir las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> *in vitro*. Sin embargo, descubrimos que la presencia de IL-4 en el medio de cultivo induce una fuerte regulación a la baja de los receptores de activación de asesinas naturales (NK) (como NKG2D y NCR) en las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup>, debilitando sus respuestas antitumorales (**Tabla 3**). El efecto inhibitorio de la IL-4 sobre las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> se produjo incluso cuando estaba presente la IL-2. En la misma línea, en un estudio independiente, Mao, Y. y colegas demostraron recientemente que las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> cultivadas, tratadas con IL-4 y mAb anti-TCRV $\delta$ 1 secretaron significativamente menos IFN- $\gamma$  y más IL-10 en relación con las células T V $\delta$ 2<sup>+</sup>. Además, las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> tratadas con IL-4 expresaron menores niveles de NKG2D, lo que también indica que la IL-4 debilita la respuesta inmune antitumoral mediada por las células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>.<sup>42</sup> Estas observaciones, junto con hallazgos recientes de los efectos promotores de tumores de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> que producen interleucina-17 (ref.<sup>43, 44</sup>), generaron inquietudes sobre su aplicación y acentuaron la necesidad de una caracterización detallada de los linfocitos V $\delta$ 1<sup>+</sup> efectores que pueden considerarse para la terapia celular adoptiva. En la técnica, existe claramente una necesidad de procedimientos capaces de expandir las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> *in vitro* sin los efectos inmunosupresores o inhibidores de la IL-4.

El documento US2014/141513 describe una línea celular que comprende una muestra de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> de sangre periférica humana que expresan NCR funcionales, así como procedimientos de composición y producción de las mismas. El documento WO2015/061694 describe un procedimiento de expansión de células T  $\gamma\delta$  policlonales que tienen reactividad antitumoral, antiviral y antibacteriana. Ribot y col. (2014) J. Inmunol. 192(5): 2237-2243, analizaron timocitos  $\gamma\delta$  aislados *ex vivo* y demostraron que producen IFN- $\gamma$  insignificante y que carecían de actividad citotóxica contra las células leucémicas. Sin embargo, estas propiedades se adquirieron selectivamente tras la estimulación con IL-2 o IL-15, pero no IL-4 o IL-7.

Finalmente, varios procedimientos publicados destinados a expandir las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> *ex vivo* requieren la presencia de células alimentadoras naturales o artificiales, normalmente en forma de células o líneas celulares, bacterias y parásitos infectados con virus o transformados. Estos procedimientos de cultivo son más complejos, más propensos a la contaminación microbiana y menos adecuados para aplicaciones clínicas.

**Resumen de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos novedosos para expandir y diferenciar células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 2^-$  humanas *in vitro*, sin necesidad del uso de células alimentadoras o componentes microbianos o virales. En primer lugar, los inventores pretendían mejorar los niveles de expansión y pureza de las células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 2^-$ . Se desarrolló un procedimiento novedoso, más eficiente y selectivo para expandir estas células en cultivo, en presencia de un mitógeno de células T e IL-4, y en ausencia de IL-2, IL-7 e IL-15. Finalmente, las células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 2^-$  obtenidas se diferenciaron hacia un fenotipo más citotóxico mediante etapas adicionales de optimización *in vitro*. Después de la eliminación de IL-4 y la adición de un mitógeno de células T e IL-15, IL-2 o IL-7 al medio de cultivo, las células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 2^-$  anteriormente obtenidas produjeron citoquinas proinflamatorias y expresaron altos niveles de receptores de activación de asesinas naturales (NKR), que mediaron en la destrucción de células tumorales *in vitro*. Es importante destacar que, tras la infusión en ratones, las células T TCR $\gamma\delta^+$  diferenciadas mantuvieron su fenotipo citotóxico e inhibieron el crecimiento tumoral *in vivo*.

El procedimiento de cultivo celular descrito en esta invención es muy sólido, altamente reproducible y totalmente compatible con aplicaciones clínicas a gran escala. Genera cantidades suficientes de células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 2^-$  diferenciadas para su uso en la inmunoterapia adoptiva del cáncer y en una variedad de aplicaciones experimentales, terapéuticas y comerciales.

En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para expandir las células TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 2^-$  en una muestra que comprende:

- (1) cultivar las células T en la muestra en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-4; en ausencia de interleucina-15, interleucina-2 o interleucina-7; y
- (2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T y un factor de crecimiento seleccionado de entre interleucina-15, interleucina-2 o interleucina-7, en ausencia de interleucina-4.

Preferiblemente, la presente invención proporciona un procedimiento para expandir y diferenciar células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 2^-$  en una muestra que comprende:

- (1) cultivar las células T en la muestra en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-4; en ausencia de interleucina-15, interleucina-2 e interleucina-7; y
- (2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-15, en ausencia de interleucina-4.

El procedimiento recién obtenido (detallado en esta invención), se basa en propiedades biológicas no identificadas anteriormente de células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 2^-$  y no se ha descrito en otra parte.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos procedimientos para el aislamiento y la expansión y diferenciación selectiva *in vivo/ex vivo* de células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 2^-$  y su aplicación clínica. Los inventores probaron múltiples combinaciones de anticuerpos agonistas de grado clínico y citoquinas para determinar su capacidad para expandir y diferenciar (durante 2 a 3 semanas) células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 2^-$  de sangre periférica en cultivo. Las células T TCR $\gamma\delta^+$  se aislaron y expandieron en cultivo en ausencia de células alimentadoras y moléculas de origen microbiano. Los inventores han demostrado que las células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 2^-$  (también designadas en esta invención como células T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^-$ ), pueden expandirse selectivamente *in vitro* cultivando estas células en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-4, en ausencia de interleucina-2, interleucina-7 e interleucina-15, y subcultivar estas células en un segundo medio de cultivo que contiene un mitógeno de células T e interleucina-15, interleucina-2 o interleucina-7, en ausencia de interleucina-4. También se adicionaron otros factores de crecimiento clave como interferón- $\gamma$ , interleucina-21 e interleucina-1 $\beta$  a uno o ambos medios de cultivo para aumentar aún más los niveles de expansión y pureza de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^-$  cultivadas.

El primer medio de cultivo soportó la supervivencia selectiva y la expansión de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^-$  (aumento de hasta 8.000 veces de células T V $\delta 1^+$  en 14 días; **Table 3**). Es importante destacar que la ausencia de interleucina-2, interleucina-7 e interleucina-15 durante los primeros días de cultivo contribuyó a la inanición y apoptosis de las células contaminantes (incluyendo las células T TCR $\alpha\beta^+$  y T V $\delta 2^+$ ), que dependen críticamente de estas citoquinas para sobrevivir.

Finalmente, la presencia de IL-2, IL-7 o IL-15 y la ausencia de IL-4 en el segundo medio de cultivo permitió la diferenciación de la población de células T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^-$  anteriormente seleccionada, que se expandió *in vitro* un total de varios miles de veces y alcanzó > 90 % de células totales después de 21 días de cultivo (**Tablas 3 y 7**). Esta segunda etapa de cultivo es necesaria para cambiar las propiedades fisiológicas de las células hacia un fenotipo más adecuado para su uso como tratamiento antitumoral o antiviral. Los PBL T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^-$  expandidos y diferenciados obtenidos después de la segunda etapa de cultivo expresaron altos niveles de activación de receptores de asesinas naturales (NKR), incluyendo NKp30 y NKp44, que se sinergizaron con el receptor de células T para mediar en la orientación de células tumorales *in vitro*, mientras que

no se dirigían a células sanas. La infusión de PBL T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> expandidos y diferenciados en ratones inmunodeficientes portadores de tumores inhibió el crecimiento del tumor y limitó la diseminación del tumor a múltiples órganos, en comparación con los animales no tratados. No se encontró evidencia de toxicidad asociada al tratamiento en los análisis bioquímicos e histológicos. Es importante señalar que los PBL T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> expandidos y diferenciados se obtuvieron con una eficacia similar a partir de muestras de sangre de donantes sanos y pacientes con leucemia. Finalmente, la presente invención describe procedimientos para aislar y cultivar células utilizando materiales y reactivos totalmente compatibles con aplicaciones industriales y clínicas. Las células TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> se clasificaron primero en un protocolo de dos etapas adecuado para su uso en una máquina clasificadora de células de grado clínico (CliniMACS; Miltenyi Biotec, GmbH; Alemania). A continuación, las células se cultivaron con una manipulación mínima en un medio de cultivo celular sin suero. Se utilizaron bolsas de cultivo celular de plástico permeables a los gases, a gran escala y cerradas como recipientes para el cultivo celular, en lugar de placas o matraces de cultivo abiertos. Todos los reactivos y materiales usados (o reactivos y materiales equivalentes) están actualmente disponibles y han sido fabricados con calidad de grado clínico o con la calidad de las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP), sin componentes derivados de animales. Por lo tanto, las células producidas por este procedimiento pueden usarse en una variedad de aplicaciones experimentales, terapéuticas y comerciales.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para expandir células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> V $\delta$ 2<sup>-</sup> de una muestra que contiene células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> o precursores de las mismas, que comprende:

- (1) cultivar las células en la muestra en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-4; en ausencia de interleucina-15, interleucina-2 o interleucina-7; y
- (2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T y un factor de crecimiento seleccionado de entre interleucina-15, interleucina-2 o interleucina-7, en ausencia de interleucina-4.

El procedimiento del primer aspecto de la invención da como resultado poblaciones celulares expandidas de células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> V $\delta$ 2<sup>-</sup>. Por "expandida" se entiende que el número del tipo de células deseadas o diana en la preparación final es mayor que el número en la población celular inicial o inicial.

El término "un mitógeno de células T" se refiere a cualquier agente que pueda estimular las células T a través de la señalización de TCR, incluyendo, entre otras, lectinas vegetales como la fitohemaglutinina (PHA) y la concanavalina A (ConA) y lectinas de origen no vegetal, anticuerpos que activan las células T y otros mitógenos que no son lectinas ni anticuerpos. Los clones de anticuerpos preferidos incluyen anticuerpos anti-CD3 como los clones OKT-3 y UCHT-1, anticuerpos anti-TCR $\gamma\delta$  como B1 e IMMU510, o anticuerpos anti-TCRV $\delta$ 1, como  $\delta$ TCS1. En el contexto de la presente invención, se entiende que los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab y F(ab')<sub>2</sub>), anticuerpos monocatenarios, fragmentos variables monocatenarios (ScFv) y socios de unión producidos de manera recombinante. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (mAb). Otros mitógenos incluyen el forbol 12-miristato-13-acetato (TPA) y sus compuestos relacionados, como la mezereína, o compuestos bacterianos (por ejemplo, enterotoxina A estafilocócica (SEA) y proteína A estreptocócica). El mitógeno de células T puede ser soluble o estar inmovilizado y se puede usar más de un mitógeno de células T en el procedimiento de la invención.

En la presente invención se demostró claramente que dos grupos distintos de citocinas, interleucina-4 por un lado, e interleucina-15, interleucina-2 e interleucina-7 por otro, deben utilizarse para fines muy específicos en cada etapa del cultivo, y tienen acciones opuestas en cultivos de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup>. En base al presente estudio de los efectos de IL-4 e IL-15/IL-2/IL-7 en las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup>, debería ser obvio para cualquier experto en la materia que estos dos grupos de citocinas son miembros representativos de dos grupos de factores de crecimiento, que tienen "actividad similar a la interleucina-4" o "actividad similar a la interleucina-15".

El término "un factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-4" significa cualquier compuesto que tiene la misma actividad que la IL-4 con respecto a su capacidad para promover efectos fisiológicos similares en células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> en cultivo e incluye, entre otros, IL-4 y miméticos de IL-4, o cualquier equivalente funcional de la IL-4. Los efectos fisiológicos promovidos por IL-4 sobre las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> (como se describe en la presente invención), incluyen la disminución de los niveles de expresión de NKG2D y NCR, la inhibición de la función citotóxica y una mejor supervivencia selectiva. Algunas de las actividades referidas de IL-4 en células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> también fueron reportadas independientemente por otro grupo. En ese estudio, la IL-4 inhibió significativamente la secreción de citocinas proinflamatorias, incluyendo el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  de células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> activadas.<sup>45</sup>

El término "un factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-15" significa cualquier compuesto que tiene la misma actividad que la IL-15 con respecto a su capacidad para promover efectos fisiológicos similares en células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> en cultivo e incluye, entre otros, IL-15 y miméticos de IL-15, o cualquier equivalente funcional de la IL-15, incluyendo la IL-2 y la IL-7. Los efectos fisiológicos promovidos por IL-15, IL-2 e IL-7 en cultivos de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> (como se describe en la presente invención) fueron esencialmente equivalentes, es decir, la inducción de la diferenciación celular hacia un fenotipo más citotóxico, incluyendo el aumento de los niveles de expresión de NKG2D y NCR (NKp30 y NKp44), el aumento de la función citotóxica antitumoral y el aumento de la producción de citocinas proinflamatorias, como el IFN- $\gamma$ .

Los términos "en ausencia de la interleucina-15, la interleucina-2 y la interleucina-7" y "en ausencia de la interleucina-4" se refieren no solo a la ausencia total de estas citocinas en el medio de cultivo, sino que también incluyen el uso de dichas citocinas a niveles de concentración tan bajos que no pueden producir una respuesta medible o un efecto fisiológico en las células diana y, por consiguiente, pueden considerarse ausentes a efectos prácticos. Además, "un efecto fisiológico medible en las células diana" se refiere a cualquier cambio medible en el estado fisiológico de las células, dentro del alcance de la presente invención y según las definiciones estándares. Por ejemplo, los cambios en el estado fisiológico de la célula pueden detectarse mediante cambios en su estado de activación (reconocidos por la regulación positiva o negativa de los niveles de expresión del marcador celular de activación temprana CD69); o detectarse por cambios en su estado de diferenciación (reconocidos por la regulación al alza o a la baja de NKG2D o NCR), unas horas o unos días después del contacto con tales citocinas. Un efecto fisiológico medible también puede ser un cambio en la tasa de proliferación celular, medida mediante tinción con CFSE o mediante otras técnicas conocidas en la técnica. Debería ser evidente para cualquier experto en la materia que las células cultivadas en el primer medio de cultivo no deben recibir un estímulo funcionalmente relevante por parte de la IL-2, la IL-7 y la IL-15 o factores de crecimiento funcionalmente similares. Además, las células en el segundo medio de cultivo no deben recibir un estímulo funcionalmente relevante por parte de la IL-4 o factores de crecimiento funcionalmente similares. Preferiblemente, estas citocinas no deben estar presentes en el medio de cultivo celular a una concentración final superior a 2 ng/ml; más preferiblemente, no más alto que 1 ng/ml, más preferiblemente no más alto que 0,1 ng/ml, más preferiblemente, deberían estar ausentes.

Preferiblemente, la presente invención proporciona un procedimiento para expandir y diferenciar células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2 en una muestra que comprende:

- (1) cultivar las células en la muestra en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-4; en ausencia de interleucina-15, interleucina-2 e interleucina-7; y
- (2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-15, en ausencia de interleucina-4.

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para expandir y diferenciar células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2 en una muestra que comprende:

- (1) cultivar las células en la muestra en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-4; en ausencia de interleucina-15, interleucina-2 e interleucina-7; y
- (2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-2, en ausencia de interleucina-4.

Adicionalmente, en otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para expandir y diferenciar células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2 en una muestra que comprende:

- (1) cultivar las células en la muestra en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-4; en ausencia de interleucina-15, interleucina-2 e interleucina-7; y
- (2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-7, en ausencia de interleucina-4.

El primero o el segundo medio de cultivo, o ambos medios de cultivo, pueden incluir además otros ingredientes que pueden ayudar en el crecimiento y la expansión de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2. Los ejemplos de otros ingredientes que se pueden adicionar incluyen, entre otros, plasma o suero, proteínas purificadas como la albúmina, una fuente de lípidos como la lipoproteína de baja densidad (LDL), vitaminas, aminoácidos, esteroides y cualquier otro complemento que apoye o promueva el crecimiento y/o la supervivencia celular.

El primero o el segundo medio de cultivo, o ambos medios de cultivo, también pueden contener otros factores de crecimiento, incluyendo citocinas que pueden potenciar aún más la expansión de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2. Los ejemplos de tales citoquinas incluyen, entre otros: (i) interferón- $\gamma$  y cualquier factor de crecimiento que tenga actividad similar al interferón- $\gamma$ , (ii) interleucina-21 y cualquier factor de crecimiento que tenga actividad similar a la interleucina-21 y (iii) IL-1 $\beta$  y cualquier factor de crecimiento que tenga actividad similar a la interleucina-1 $\beta$ . Los ejemplos de otros factores de crecimiento que se pueden adicionar incluyen moléculas coestimuladoras tales como un anticuerpo anti-SLAM humano, cualquier ligando soluble de CD27 o cualquier ligando soluble de CD7. Cualquier combinación de estos factores de crecimiento puede incluirse en el primero o el segundo medio de cultivo, o en ambos medios.

El término "un factor de crecimiento que tiene actividad similar al interferón- $\gamma$ " significa cualquier compuesto que tiene la misma actividad que el IFN- $\gamma$  con respecto a su capacidad para promover la supervivencia o proliferación de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2 en cultivo e incluye, entre otros, el IFN- $\gamma$  y miméticos del IFN- $\gamma$ , o cualquier equivalente funcional del IFN- $\gamma$ .

El término "un factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-21" significa cualquier compuesto que tiene la misma actividad que la IL-21 con respecto a su capacidad para promover la supervivencia o la proliferación de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2 en cultivo e incluye, entre otros, IL-21 y miméticos de IL-21, o cualquier equivalente funcional de la IL-21.

El término "un factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-1 $\beta$ " significa cualquier compuesto que tiene la misma actividad que la IL-1 $\beta$  con respecto a su capacidad para promover la supervivencia o la proliferación de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2 en cultivo e incluye, entre otros, la IL-1 $\beta$  y miméticos de la IL-1 $\beta$ , o cualquier equivalente funcional de la IL-1 $\beta$ .

5

En particular, el inventor ha descubierto que la adición de un segundo factor de crecimiento que tiene actividad similar al interferón- $\gamma$  al primero o al segundo medio de cultivo, o a ambos medios de cultivo, dio como resultado una mayor expansión de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2 en comparación con la expansión obtenida utilizando un factor de crecimiento.

10 En consecuencia, en una realización, el procedimiento del primer aspecto de la invención comprende:

(1) cultivar las células en la muestra en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-4 e  $\gamma$ , en ausencia de interleucina-2, interleucina-7 e interleucina-15; y

15 (2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno, interleucina-15 e interferón- $\gamma$ , en ausencia de interleucina-4, para expandir y diferenciar las células T V $\delta$ 2  $\gamma\delta$ .

Preferiblemente, el factor de crecimiento que tiene actividad similar al IFN- $\gamma$  está presente en una cantidad de alrededor de 1 a alrededor de 1000 ng/ml. Más preferiblemente, este factor de crecimiento está presente en una cantidad de alrededor de 2 a alrededor de 500 ng/ml. Más preferiblemente, este factor de crecimiento está presente en una cantidad de alrededor de 20 a alrededor de 200 ng/ml. Más preferiblemente, el segundo medio de cultivo comprende alrededor de 20

20

70 ng/ml de un factor de crecimiento que tiene actividad similar al IFN- $\gamma$ , tal como el IFN- $\gamma$ .

El inventor también ha descubierto que la adición de un segundo factor de crecimiento que tiene actividad similar al IFN- $\gamma$  y un tercer factor de crecimiento que tiene actividad similar a la IL-21 al primero o al segundo medio de cultivo, o a ambos medios de cultivo, dio como resultado la expansión mejorada de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2 en comparación con la expansión obtenida usando uno o dos factores de crecimiento.

25

En consecuencia, en una realización, el procedimiento del primer aspecto de la invención comprende:

30 (1) cultivar las células en la muestra en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T, interleucina-4, interferón- $\gamma$  e interleucina-21, en ausencia de interleucina-2, interleucina-7 e interleucina-15; y

(2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno, interleucina-15 e interferón- $\gamma$ , en ausencia de interleucina-4, para expandir y diferenciar las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2.

35 Preferiblemente, el factor de crecimiento que tiene actividad similar a la IL-21 está presente en una cantidad de alrededor de 1 a alrededor de 500 ng/ml. Más preferiblemente, este factor de crecimiento está presente en una cantidad de alrededor de 2 a alrededor de 200 ng/ml. Más preferiblemente, este factor de crecimiento está presente en una cantidad de alrededor de 5 a alrededor de 100 ng/ml. Más preferiblemente, el segundo medio de cultivo comprende alrededor de 15 ng/ml de un factor de crecimiento que tiene actividad similar a la IL-21, como la IL-21.

40

El inventor también ha descubierto que la adición de un segundo factor de crecimiento que tiene actividad similar al IFN- $\gamma$ , un tercer factor de crecimiento que tiene actividad similar a la IL-21 y un cuarto factor de crecimiento que tiene actividad similar a la IL-1 $\beta$  al primero o al segundo medio de cultivo, o a ambos medios de cultivo, dio como resultado la expansión mejorada de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2 en comparación con la expansión obtenida usando uno, dos o tres factores de crecimiento.

45

En consecuencia, en una realización, el procedimiento del primer aspecto de la invención comprende:

50 (1) cultivar las células en la muestra en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T, interleucina-4, interferón- $\gamma$ , interleucina-21 e interleucina-1 $\beta$ , en ausencia de interleucina-2, interleucina-7 e interleucina-15; y

(2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T, interleucina-15, interferón- $\gamma$  e interleucina-21, en ausencia de IL-4, para expandir las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2.

55 Preferiblemente, el factor de crecimiento que tiene actividad similar a la IL-1 $\beta$  está presente en una cantidad de alrededor de 1 a alrededor de 500 ng/ml. Más preferiblemente, este factor de crecimiento está presente en una cantidad de alrededor de 2 a alrededor de 200 ng/ml. Más preferiblemente, este factor de crecimiento está presente en una cantidad de alrededor de 5 a alrededor de 100 ng/ml. Más preferiblemente, el segundo medio de cultivo comprende alrededor de 15 ng/ml de un factor de crecimiento que tiene actividad similar a la IL-1 $\beta$ , como la IL-1 $\beta$ .

60

El inventor también ha descubierto que la adición de una molécula coestimuladora al primero o al segundo medio de cultivo, o a ambos medios de cultivo, resultó en una mayor expansión de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2 en comparación con la expansión obtenida sin usar dicha molécula.

65 En consecuencia, en una realización, el procedimiento del primer aspecto de la invención comprende:

(1) cultivar células en la muestra en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T, interleucina-4 y cualquier ligando molecular de CD27, o cualquier ligando molecular de SLAM o cualquier ligando molecular de receptores de CD7, en ausencia de interleucina-2, interleucina-7 e interleucina-15; y

5 (2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-15, en ausencia de IL-4, para expandir las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2.

10 El término "un ligando molecular" significa cualquier molécula o compuesto que se une a un receptor diana específico. En particular, el inventor descubrió que la adición de un ligando soluble de CD27, o un ligando soluble de CD7 o un ligando soluble de SLAM dio como resultado una mayor expansión de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2. Estos ligandos solubles constituyen agonistas funcionales de cada uno de estos receptores moleculares, y cualquier agonista similar que se una a estos receptores puede inducir el mismo efecto sobre las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2, por ejemplo, anticuerpos agonistas tales como anticuerpos humanos anti-SLAM, anticuerpos humanos anti-CD27 y anticuerpos humanos anti-CD7.

15 Durante el período total de cultivo, se puede realizar más de una etapa de subcultivo. Por ejemplo, cada una de las etapas de subcultivo descritas anteriormente se puede dividir en dos etapas de subcultivo (1a) y (1b) y (2a) y (2b), y se pueden usar diferentes combinaciones de ingredientes según el procedimiento descrito originalmente.

En consecuencia, en una realización, el procedimiento del primer aspecto de la invención comprende:

20 (1) cultivar las células en la muestra en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T, interleucina-4, interferón- $\gamma$ , interleucina-1 $\beta$  e interleucina-21, en ausencia de interleucina-2, interleucina-7 e interleucina-15; y

(2a) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T, interleucina-15 e interleucina-21, en ausencia de interleucina-4; y

25 (2b) cultivar las células obtenidas en la etapa (2a) en un tercer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T, interleucina-15 e interferón- $\gamma$ , en ausencia de interleucina-4, para expandir las células T V $\delta$ 2-  $\gamma\delta$ .

En otra realización, el procedimiento del primer aspecto de la invención comprende:

30 (1a) cultivar las células en la muestra en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T, interleucina-4, interferón- $\gamma$  e interleucina-21, en ausencia de interleucina-2, interleucina-7 e interleucina-15; y

(1b) cultivar las células obtenidas en la etapa (1a) en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T, interleucina-4, interferón- $\gamma$  e interleucina-1 $\beta$ , en ausencia de interleucina-2, interleucina-7 e interleucina-15; y

35 (2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1b) en un tercer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-15, en ausencia de -4; para expandir las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2.

40 Las células T TCR $\gamma\delta^+$  obtenidas mediante el procedimiento de la invención se pueden usar en una variedad de aplicaciones experimentales, terapéuticas y comerciales. Esto incluye, entre otras, la modificación genética posterior o la edición genética de tales células, por ejemplo, con el objetivo de mejorar su potencial terapéutico, por ejemplo, con el objetivo de redirigir la especificidad de células T TCR $\gamma\delta^+$  a través de la expresión de un receptor de antígeno quimérico (CAR) o TCR en estas células. La expresión de CAR se puede inducir mediante electroporación de células TCR $\gamma\delta^+$  para la inserción de material genético, o a través de la infección de estas células con vectores virales, tales como lentivirus o retrovirus que contienen el material genético deseado. Tal edición genética puede mejorar la potencia de las células T TCR $\gamma\delta^+$  al mejorar la localización, la producción de citocinas, la eliminación del reciclaje y/o al mejorar los injertos.

45 La presente invención proporciona procedimientos novedosos para expandir selectivamente las células T TCR $\gamma\delta^+$ V $\delta$ 2 en cultivo. Los procedimientos del primer aspecto de la invención se llevan a cabo en una muestra, a la que también se hace referencia en esta invención como "muestra de partida". Los procedimientos pueden utilizar muestras no fraccionadas o muestras que han sido enriquecidas en células T TCR $\gamma\delta^+$ .

50 La muestra puede ser cualquier muestra que contenga células T TCR $\gamma\delta^+$  o precursores de las mismas que incluyen, entre otros, sangre, médula ósea, tejido linfoide, epitelio, timo, hígado, bazo, tejidos cancerosos, tejido de ganglios linfáticos, tejido infectado, tejido fetal y fracciones o porciones enriquecidas de los mismos. La muestra es preferiblemente sangre, incluyendo sangre periférica o sangre de cordón umbilical, o fracciones de la misma, incluyendo células de capa leucocitaria, productos de leucaféresis, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células mononucleares de baja densidad (LDMC). En algunas realizaciones, la muestra es sangre humana o una fracción de la misma. Las células se pueden obtener a partir de una muestra de sangre utilizando técnicas conocidas en la técnica, como la centrifugación en gradiente de densidad. Por ejemplo, la sangre completa se puede colocar en capas sobre un volumen igual de Ficoll-Hypaque™ seguido de centrifugación a 400 xg durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente. El material de interfase contendrá células mononucleares de baja densidad que se pueden recolectar y lavar en un medio de cultivo y centrifugar a 200 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente.

60 Las células T TCR $\gamma\delta^+$  aisladas o sin purificar se pueden cultivar o mantener en cualquier medio de cultivo de células de mamífero adecuado, como AIM-V™, RPMI 1640, OPTIMIZER CTS™ (Gibco, Life Technologies), EXVIVO-10, EXVIVO-15 o EXVIVO-20 (Lonza), en la presencia de suero o plasma. Las células se pueden transferir, por ejemplo, a bolsas estáticas

de cultivo celular permeables al gas de grado clínico VueLife® (Saint Gobain) o a bolsas de cultivo celular de grado clínico de Miltenyi Biotec. Las bolsas de células que contienen células y medio de cultivo se pueden colocar en una incubadora a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, en la oscuridad.

5 Antes de cultivar la muestra o fracción de la misma (como PBMC) en el primer medio de cultivo, la muestra o fracción de la misma puede enriquecerse en ciertos tipos de células y/o agotarse en otros tipos de células. En particular, la muestra o fracción de la misma puede estar enriquecida con células T o enriquecida con células T TCRγδ<sup>+</sup>, o agotarse en células TCRαβ<sup>+</sup> T o agotarse en células T no TCRγδ<sup>+</sup>. En una realización preferida, la muestra primero se agota en células T TCRαβ<sup>+</sup> y, a continuación, se enriquece en células CD3<sup>+</sup>.

10 La muestra se puede enriquecer o agotar en ciertos tipos de células utilizando técnicas conocidas en la técnica. En una realización, las células de un fenotipo particular pueden agotarse cultivando la muestra o una fracción de la misma con un cóctel de anticuerpos que contiene anticuerpos que se unen a moléculas específicas en las células que van a agotarse. Preferiblemente, los anticuerpos en el cóctel se acoplan a microesferas magnéticas que se pueden usar para agotar o enriquecer magnéticamente las células diana cuando estas células se ven obligadas a pasar a través de una columna magnética.

20 Una vez fraccionadas y enriquecidas las células de la muestra, si se lo desea, las células se cultivan en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T y al menos un factor de crecimiento con actividad similar a la interleucina-4, como la interleucina-4, en la ausencia de factores de crecimiento que tengan actividad similar a la interleucina-15, tales como la interleucina-15, la interleucina-2 y la interleucina-7.

25 Preferiblemente, el mitógeno de células T en el primer medio de cultivo está presente en una cantidad de alrededor de 10 a alrededor de 5000 ng/ml. Más preferiblemente, el mitógeno de células T está presente en una cantidad de alrededor de 20 a alrededor de 2000 ng/ml. Más preferiblemente, el mitógeno de células T está presente en una cantidad de alrededor de 50 a alrededor de 1000 ng/ml. Más preferiblemente, el medio comprende 70 ng/ml de un mitógeno de células T.

30 Preferiblemente, el factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-4 está presente en una cantidad de alrededor de 1 a alrededor de 1000 ng/ml. Más preferiblemente, este factor de crecimiento está presente en una cantidad de alrededor de 5 a alrededor de 500 ng/ml. Más preferiblemente, este factor de crecimiento está presente en una cantidad de alrededor de 20 a alrededor de 200 ng/ml. Más preferiblemente, el medio comprende 100 ng/ml de un factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-4, tal como o la IL-4.

35 Las células se cultivan preferiblemente en el primer medio de cultivo durante un período de tiempo que oscila entre alrededor de 2 días y alrededor de 21 días. Más preferiblemente, desde alrededor de 3 días hasta alrededor de 14 días. Más preferiblemente, de alrededor de 4 días a 8 días.

40 Después del cultivo en el primer medio de cultivo, las células se subcultivan en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T y al menos un factor de crecimiento con actividad similar a la interleucina-15, como IL-15, IL-2 o IL-7, en ausencia de factores de crecimiento que tengan actividad similar a la interleucina-4, tal como IL-4. Si las células se subcultivan, por ejemplo, en presencia tanto de IL-15 como de IL-4, la proliferación continúa, pero la viabilidad celular disminuye y los receptores NK clave ubicados en la superficie celular (como NKG2D, NKp30 y NKp44) se internalizan en el interior de la célula. En consecuencia, estos receptores ya no pueden unirse a sus ligandos expresados en las células tumorales, lo que reduce la actividad citotóxica antitumoral de estas células.

45 La etapa de subcultivo consiste en cultivar las células obtenidas en la etapa 1 en un nuevo medio de cultivo. Esto puede lograrse mediante la adición de medio de cultivo fresco al primer medio de cultivo, preferiblemente después de la eliminación de una fracción del primer medio de cultivo. Esto se puede hacer mediante el centrifugado y/o decantado de las células, la eliminación de una fracción del primer medio de cultivo y la resuspensión de las células en el segundo medio de cultivo. Preferiblemente, la etapa de subcultivo implica la eliminación de al menos 3/4 del primer medio de cultivo. La etapa de subcultivo debe llevarse a cabo porque es importante para la expansión y diferenciación de las células T Vδ2<sup>+</sup> γδ que el factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-4 se elimine durante la etapa de subcultivo.

55 Preferiblemente, en el segundo medio de cultivo, el mitógeno de células T está presente en una cantidad de alrededor de 0,1 a alrededor de 50 μg/ml. Más preferiblemente, el mitógeno de células T está presente en una cantidad de alrededor de 0,3 a alrededor de 10 μg/ml. Más preferiblemente, el mitógeno de células T está presente en una cantidad de alrededor de 0,5 a alrededor de 5 μg/ml. Más preferiblemente, el medio comprende 1 μg/ml de un mitógeno de células T.

60 Preferiblemente, el factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-15, como IL-15, IL-2 o IL-7, está presente en una cantidad de alrededor de 1 a alrededor de 1000 ng/ml. Más preferiblemente, este factor de crecimiento está presente en una cantidad de alrededor de 2 a alrededor de 500 ng/ml. Más preferiblemente, este factor de crecimiento está presente en una cantidad de alrededor de 20 a alrededor de 200 ng/ml. Más preferiblemente, el segundo medio de cultivo comprende alrededor de 70 ng/ml de un factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-15, tal como IL-15, IL-2 o IL-7.

65

Las células se cultivan preferiblemente en el segundo medio de cultivo durante un período de tiempo que oscila entre alrededor de 2 días y alrededor de 30 días. Más preferiblemente, desde alrededor de 5 días hasta alrededor de 21 días. Más preferiblemente, de alrededor de 10 días a 15 días.

5 Preferiblemente, en el primer aspecto de la invención, tanto el primero como el segundo medio de cultivo se complementan con suero o plasma. La cantidad de plasma en el primero y el segundo medio de cultivo es preferiblemente de alrededor del 0,5 % a alrededor del 25 % en volumen, por ejemplo, de alrededor del 2 % a alrededor del 20 % en volumen o de alrededor del 2,5 % a alrededor del 10 % en volumen, por ejemplo, es de alrededor del 5 % por volumen. El suero o plasma se puede obtener de cualquier fuente, incluyendo, entre otras, la sangre periférica humana, la sangre del cordón umbilical o la sangre derivada de otra especie de mamífero. El plasma puede ser de un solo donante o puede provenir de varios donantes. Si las células T TCR $\gamma\delta^+$  autólogas deben usarse clínicamente, es decir, reinfundirse en el mismo paciente del que se obtuvo la muestra original, entonces es preferible usar también plasma autólogo (es decir, del mismo paciente) para evitar la introducción de productos peligrosos (por ejemplo, virus) en ese paciente. El plasma debe ser de origen humano para evitar la administración de productos animales al paciente.

15 Las células T TCR $\gamma\delta^+$  obtenidas según el procedimiento del primer aspecto de la invención se pueden separar de otras células que pueden estar presentes en el cultivo final utilizando técnicas conocidas en la técnica que incluyen clasificación de células activadas por fluorescencia, separación inmunomagnética, cromatografía en columna de afinidad, centrifugación en gradiente de densidad y paneo celular.

20 Las células T TCR $\gamma\delta^+$  obtenidas mediante el procedimiento del primer aspecto de la invención también son útiles. En consecuencia, el inventor describe una preparación celular de células T TCR $\gamma\delta^+$ .

25 También se describe una preparación celular enriquecida en células T TCR $\gamma\delta^+$  preparadas según el procedimiento del primer aspecto de la invención.

También se describe una preparación celular enriquecida en células T TCR $\gamma\delta^+$  en las que más del 80 % del total de células son células T TCR $\gamma\delta^+$ .

30 Preferiblemente, las células T TCR $\gamma\delta^+$  comprenden más del 80 %, más preferiblemente más del 90 % y, más preferiblemente aún, más del 95 %, del total de células en la población enriquecida.

35 Las células T TCR $\gamma\delta^+$  obtenidas mediante el procedimiento del primer aspecto de la invención pueden usarse en todas y cualquiera de las aplicaciones. Se cree que las células T TCR $\gamma\delta^+$  son una primera línea de defensa contra los patógenos infecciosos. Además, las células T TCR $\gamma\delta^+$  poseen actividad citolítica intrínseca contra células transformadas de varios orígenes, incluyendo los linfomas, sarcomas y carcinomas de células B. Como resultado, las células T TCR $\gamma\delta^+$  obtenidas y cultivadas *ex vivo* según los procedimientos de la invención se pueden transfundir a un paciente para el tratamiento o prevención de infecciones, cáncer o enfermedades resultantes de la inmunosupresión.

40 También se describe un procedimiento para modular una respuesta inmunitaria que comprende administrar una cantidad efectiva de células T TCR $\gamma\delta^+$  preparadas según un procedimiento del primer aspecto de la invención, u obtenidas a partir de una preparación celular como se describe en esta invención, a un animal que lo necesita.

45 El término "cantidad efectiva", tal como se utiliza en esta invención, significa una cantidad efectiva, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios para lograr los resultados deseados.

El término "animal" como se usa en esta invención incluye a todos los miembros del reino animal. Preferiblemente, el animal es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

50 También se describe un procedimiento para tratar una infección que comprende administrar una cantidad efectiva de células T TCR $\gamma\delta^+$  preparadas según el procedimiento del primer aspecto de la invención, u obtenidas a partir de una preparación celular como se describe en esta invención, a un animal que lo necesita.

55 Los ejemplos de infecciones que pueden tratarse incluyen, entre otras, infecciones bacterianas como las causadas por *micobacterias* (por ejemplo, tuberculosis), infecciones virales como las causadas por el virus del herpes simple (VHS), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus de la hepatitis e infecciones parasitarias como las causadas por *Plasmodium* (por ejemplo, paludismo).

60 También se describe un procedimiento para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad efectiva de células T TCR $\gamma\delta^+$  preparadas según el procedimiento del primer aspecto de la invención, u obtenidas a partir de una preparación celular como se describe en esta invención, a un animal que lo necesita.

65 Los ejemplos de cáncer que se pueden tratar incluyen, entre otros, leucemias que incluyen leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda y leucemias de células T y células B, linfomas (de Hodgkin y no Hodgkin), trastornos linfoproliferativos, plasmocitomas, histiocitomas, melanomas, adenomas, sarcomas, carcinomas de tejidos sólidos, tumores hipóxicos, carcinomas de células escamosas, cánceres

genitourinarios tales como cáncer de cuello uterino y vejiga, cánceres hematopoyéticos, cánceres de cabeza y cuello y cánceres del sistema nervioso.

5 El cáncer a tratar puede ser una leucemia linfocítica crónica. Las PBMC se pueden obtener de un paciente con leucemia linfocítica crónica (LLC). Después de cultivar y expandir para las células T TCR $\gamma\delta^+$ , las células expandidas no contendrán significativamente células de LLC cancerosas, lo que las hace muy adecuadas para la reinfusión al paciente.

10 También se describen TCR $\gamma\delta$  + Células T obtenidas por un procedimiento del primer aspecto de la invención, u obtenidas de una preparación celular como se describe aquí, para usar en un procedimiento de modulación de una respuesta inmune, tratamiento de una infección o tratamiento de cáncer como se describe aquí anteriormente.

15 También se describe el uso de células T TCR $\gamma\delta^+$  obtenidas según procedimientos del primer aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento o composición farmacéutica para modular una respuesta inmunitaria, para tratar una infección o para tratar el cáncer como se ha descrito anteriormente.

Las células T TCR $\gamma\delta^+$  obtenidas también se pueden utilizar en modelos experimentales, por ejemplo, para seguir estudiando y dilucidar la función de las células. Además, estas células pueden ser utilizadas para estudios dirigidos a la identificación de los antígenos/epitopos reconocidos por las células T TCR $\gamma\delta^+$  y para el diseño y desarrollo de vacunas.

20 También se describe un procedimiento para vacunar a un animal que comprende administrar una cantidad efectiva de células T TCR $\gamma\delta^+$  obtenidas mediante un procedimiento del primer aspecto de la invención, u obtenidas a partir de una preparación celular como se describe en esta invención, a un animal que lo necesita. Dicha vacuna se puede administrar a pacientes inmunocomprometidos o individuos con riesgo elevado de desarrollar una enfermedad infecciosa o cáncer.

25 También se describe el uso de células T TCR $\gamma\delta^+$  preparadas según el primer aspecto de la invención, u obtenidas a partir de una preparación celular como se describe en esta invención, para la fabricación de una vacuna, y para células T TCR $\gamma\delta^+$  preparadas según el procedimiento del primer aspecto de la invención, u obtenidas a partir de una preparación celular como se describe en esta invención, para usar en un procedimiento de vacunación de un animal.

30 Las células T TCR $\gamma\delta^+$  pueden usarse inmediatamente en las aplicaciones terapéuticas, experimentales o comerciales descritas anteriormente o pueden criopreservarse para su uso en una fecha posterior.

35 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de esta descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican realizaciones preferidas de la invención, se dan únicamente a modo de ilustración, ya que varios cambios y modificaciones resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

40 La presente invención es completamente diferente a otras invenciones que se han descrito anteriormente en este campo. La Solicitud de patente No. PCT/CA1999/001024 (WO/2000/026347; fecha de depósito: 04.11.1999), describe un procedimiento para la producción de células T TCR $\gamma\delta^+$ . El procedimiento consta de dos etapas, donde las células T TCR $\gamma\delta^+$  en la muestra de partida se cultivan en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T y al menos dos citocinas, preferiblemente interleucina-2 e interleucina-4. A continuación, las células obtenidas en la primera etapa se cultivan en un segundo medio de cultivo que comprende al menos dos citocinas, que son preferiblemente la interleucina-2 y la interleucina-4. Es importante destacar que las citocinas utilizadas en cada etapa pueden ser iguales o diferentes.

45 Por el contrario, la presente invención describe un procedimiento de 2 etapas para expandir y diferenciar selectivamente células T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^-$  en un cultivo, donde la primera y la segunda etapa de cultivo son necesariamente diferentes entre sí. La primera etapa consiste en cultivar las células T<sup>+</sup> en la muestra de partida en un medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-4, en ausencia de interleucina-2, interleucina-7 e interleucina-15. En la presente invención, se demostró claramente que la IL-4 y la IL-2 o la IL-7 o la IL-15 ejecutan una función muy específica en cada etapa de cultivo y tienen actividades opuestas. El primer medio de cultivo contiene IL-4, que no se puede mezclar con (IL-2/IL-7/IL-15, de lo contrario, la viabilidad y proliferación celular disminuirán y no se producirá el producto celular esperado. La primera etapa de cultivo celular se usa para expandir células T TCR $\gamma\delta^+$  muchas veces en un período de tiempo excepcionalmente corto, generando un producto celular altamente enriquecido en células T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^-$ . De hecho, la ausencia de IL-2/IL-7/IL-15 en el medio de cultivo permite la eliminación de muchas impurezas (otros tipos celulares) que no se eliminarían sin esta innovación. Las células T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^-$  expandidas se encuentran en un estado menos diferenciado ya que no han entrado en contacto con la interleucina-2/-15/-7. Para diferenciar las células hacia un fenotipo más citotóxico y proinflamatorio, las células T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^-$  obtenidas en la primera etapa se deben cultivar en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-15, interleucina-2 o interleucina -7, en ausencia de interleucina-4. Nuevamente, es fundamental que estos diferentes factores de crecimiento no se mezclen, ya que la presencia de IL-4 en el segundo medio de cultivo disminuyó la viabilidad celular y la función citotóxica. La segunda etapa de cultivo expande aún más las células T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^-$  en cultivo y las convierte en mejores células efectoras, generando un producto celular distintivo que puede usarse para muchos propósitos terapéuticos.

65 La Patente No. US2003/0157060 A1 (Solicitud No. US10239854); depositada el 03.04.2000), describe otro procedimiento

para expandir células T TCR $\gamma\delta^+$  en cultivo. El procedimiento también implica dos etapas, donde las células T TCR $\gamma\delta^+$  en la muestra de partida se cultivan en un primer medio de cultivo que comprende (1) un mitógeno de células T, (2) un factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-2 y (3) un factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-7. Las células obtenidas en la primera etapa, a continuación, se cultivan en un segundo medio de cultivo que comprende (1) un factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-2 y un (2) factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-7 para expandir células T TCR $\gamma\delta^+$ .

Por el contrario, la presente invención es diferente ya que las dos etapas de cultivo son necesariamente diferentes, dado que sirven para propósitos distintos. La invención excluye claramente el uso de factores de crecimiento que tienen actividad similar a la interleucina-2 o actividad similar a la interleucina-7 en la primera etapa de cultivo, debido a las razones ya explicadas (véase arriba). Aunque la presente invención describe la presencia de otros factores de crecimiento en el primero y/o el segundo medio de cultivo, incluyendo citocinas como interferón- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-21, no se puede considerar que estas citocinas tengan actividad similar a la interleucina-2 o a la interleucina-7 debido a los efectos fisiológicos que ejercen sobre las células T  $\gamma\delta^+$  son muy diferentes. Por ejemplo, las células cultivadas en presencia de interferón- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-21 (en ausencia de IL-2, IL-7 e IL-15) no pudieron adquirir su función citotóxica completa y su estado diferenciado, por consiguiente, el interferón- $\gamma$ , la IL-1 $\beta$  y la IL-21 no pudieron imitar los altos efectos proinflamatorios inducidos por la IL-2, la IL-7 y la IL-15 en células T  $\gamma\delta^+$  cultivadas (**Tabla 2**). Además, algunas de estas citocinas, como el interferón- $\gamma$  y la IL-1 $\beta$ , pertenecen a una familia de citocinas estructuralmente diferente.

Ahora se describirá la invención con referencia a los ejemplos y figuras siguientes, en los que:

#### **Figuras:**

**La Figura 1 muestra los porcentajes de PBL T TCR $\gamma\delta^+$  en una muestra de sangre periférica extraída de un donante sano, antes y después de la clasificación celular activada magnéticamente (MACS).** Se obtuvieron 50-150 ml de sangre periférica fresca de un voluntario sano y se diluyeron en un 1:1 relación (volumen a volumen) con PBS (Invitrogen Gibco) y se centrifugaron en Ficoll-Paque (Histopaque-1077; Sigma-Aldrich) en una relación de volumen de 1:3 (1 parte de ficoll por 3 partes de sangre diluida) durante 35 minutos a 1.500 rpm y 25 °C. La interfase que contenía células mononucleares (PBMC) se recogió y se lavó (en PBS). Las células T TCR $\gamma\delta^+$  totales se marcaron con un mAb anti-TCR $\gamma\delta$  conjugado con microesferas magnéticas y las células T TCR $\gamma\delta^+$  se aislaron (por encima del 75 % de pureza) con una columna magnética (Miltenyi Biotec, Alemania). Las células se marcaron con los siguientes anticuerpos monoclonales fluorescentes: anti-CD3—PerCP-Cy5.5 (Biolegend; clon SK7); anti- TCR-V $\delta$ 1 -APC (Miltenyi Biotec, clon REA173); control de isotipo anti-IgG1k-APC de ratón (Miltenyi Biotec; clon IS5-21F5). Las células se analizaron en un citómetro de flujo Fortessa II (BD Biosciences). Se muestran los resultados representativos de 6 experimentos independientes.

**La Figura 2 muestra porcentajes de PBL T TCR $\gamma\delta^+$  en una muestra de sangre periférica recolectada de un donante sano anteriormente seleccionado, antes y después del procedimiento de clasificación MACS de dos etapas.** 50-150 ml de sangre periférica fresca se obtuvo de voluntarios sanos y se diluyó en una relación de 1:1 (volumen a volumen) con PBS (Invitrogen Gibco) y se centrifugó en Ficoll-Paque (Histopaque-1077; Sigma-Aldrich) en una relación de volumen de 1:3 (1 parte de ficoll por cada 3 partes de sangre diluida) durante 35 minutos a 1.500 rpm y 25 °C. La interfase que contenía células mononucleares (PBMC) se recogió y se lavó (en PBS). Los linfocitos T TCR $\alpha\beta^+$  no deseados, a continuación, se marcaron mediante incubación en presencia de un anticuerpo monoclonal (mAb) murino anti-TCR $\alpha\beta$  humano conjugado con biotina (Miltenyi Biotec Ref#701-48, clon BW242/412). A continuación, las células se marcaron de nuevo con un mAb anti-biotina murino acoplado a microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec Ref#173-01). Finalmente, la suspensión celular se cargó en una columna magnética (Miltenyi Biotec, Alemania) y los linfocitos T TCR $\alpha\beta^+$  se agotaron magnéticamente (y se desecharon). Las células CD3 $^+$  (de las cuales la mayoría eran células T TCR $\gamma\delta^+$ ) presentes en la población celular restante se marcaron con un mAb anti-CD3 humano murino (Miltenyi Biotec Ref#273-01, clon OKT-3, dirigido a un epítipo ubicado en la cadena CD3epsilon), conjugado con partículas superparamagnéticas de hierro dextrano. Las células se cargaron en una columna de separación magnética MACS y las células CD3 $^+$  se seleccionaron de manera positiva (se purificaron). Las células se tiñeron para los marcadores TCR $\gamma\delta$ , CD3, TCRV $\delta$ 1 y TCRV $\delta$ 2 y se analizaron en un citómetro de flujo Fortessa II (BD Biosciences). Se muestran los resultados representativos de 6 experimentos independientes.

**La Figura 3 muestra un resumen de las condiciones de cultivo de prueba. A-C.** Se aislaron PBL TCR $\gamma\delta^+$  de un donante sano mediante MACS, como se describió anteriormente, y se cultivaron en placas de 96 pocillos a 1 millón de células/ml en un medio completo (Optimizier CTS, GIBCO) complementado con un 5 % de suero humano, 1mM de L-glutamina, a 37 °C y 5 % de CO $_2$ . Las células se distribuyeron por igual en múltiples pocillos y se cultivaron en presencia de tres combinaciones fijas de mAb anti-CD3 e IL-4, complementadas además con varias concentraciones de IL-2, IL-7, IL-15 o IFN- $\gamma$ . El medio fresco complementado con los mismos factores de crecimiento se adicionó cada 5-6 días. Al final del periodo de cultivo, se contaron las células y se analizó el fenotipo celular mediante citometría de flujo. Cada factor de crecimiento se usó por separado en diluciones en serie de 500 ng/ml a 0,1 ng/ml. Los gráficos muestran la mejor condición de cultivo (es decir, la mayor expansión en cantidad de veces de células V $\delta$ 1 $^+$ ) obtenidas, para cada citocina (IL-2, IL-7, IL-15 e IFN- $\gamma$ ). La muestra de control contenía IL-4 y mAb anti-CD3 únicamente. **D.** Los PBL CD3 $^+$  totales se aislaron mediante MACS con un mAb anti-CD3 humano (junto con perlas paramagnéticas) de la sangre periférica del mismo donante y se cultivaron y analizaron como se describió anteriormente. Se muestra la

media más/menos la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. El análisis estadístico se realizó usando el software Graphpad-Prism. Las diferencias entre las subpoblaciones se evaluaron mediante la prueba *t* de Student y se indican cuando son significativas como \**P* < 0,05; \*\**P* < 0,01; y \*\*\* *P* < 0,001 en las figuras.

5 **La Figura 4 muestra los porcentajes de PBL T Vδ1+ antes y después del cultivo *in vitro* durante 15 días.** Los PBL TCRγδ+ de un donante sano se aislaron mediante MACS, como se describió anteriormente, y se cultivaron en presencia de 200 ng/ml de IFN-γ, 1 μg/ml de α-CD3 y 100 ng/ml de IL-4. Se adicionó una fracción de medio fresco que contenía la misma combinación de factores de crecimiento cada 5-6 días. Se muestra el análisis del gráfico FACS en el día 15. Resultados representativos de 3 experimentos independientes.

10 **La Figura 5 muestra un panel de medios de cultivo celular analizados.** Se aislaron PBL T TCRγδ+ de un donante sano mediante MACS, como se describió anteriormente y se cultivaron en diferentes medios de cultivo celular de grado clínico libres de suero y disponibles comercialmente. Las células se cultivaron en un primer medio de cultivo en presencia de 70 ng/ml de IFN-γ, 1 μg/ml de α-CD3 y 100 ng/ml de IL-4, seguido del cultivo en un segundo medio de cultivo en presencia de 100 ng/ml de IL-15 y 2 μg/ml de mAb anti-CD3 (en ausencia de IL-4). Se muestra el número final de células y los porcentajes de células después del análisis FACS en el día 15. Se muestra la media más/menos la desviación estándar de 3 réplicas técnicas.

20 **La Figura 6 muestra que las células T Vδ1+ se expanden *in vitro* para convertirse en el subconjunto celular dominante en el cultivo.** Se obtuvieron 70 ml de sangre periférica concentrada (correspondientes a 450 ml de sangre periférica) de 8 unidades de capa leucocitaria recolectadas de 8 donantes sanos. La sangre se centrifugó sin diluir en Ficoll-Paque (Histopaque-1077; Sigma-Aldrich) en una relación de volumen de 1:3 (1 parte de ficoll por cada 3 partes de sangre) durante 35 minutos a 1.600 rpm y 25 °C. La interfase que contenía células mononucleares (PBMC) se recogió y se lavó (en un tampón de solución salina). Se aislaron PBL TCRγδ+ mediante la MACS de dos etapas anteriormente descrito y se resuspendieron en un medio de cultivo libre de suero (OPTIMIZER, GIBCO) complementado con un 5 % de plasma autólogo y 1 mM de L-glutamina. Las células se sembraron a una concentración de  $0,5 \times 10^6$  células/ml y se expandieron en bolsas de plástico de cultivo celular cerradas, permeables a los gases, de 1 l en la incubadora a 37 °C y con un 5 % de CO2. Los factores de crecimiento se adicionaron a los medios de cultivo celular según el protocolo de 2 etapas descrito anteriormente: 70 ng/ml de mAb anti-CD3, 100 ng/ml de IL-4, 70 ng/ml de IFN-γ, 7 ng/ml de IL-21 y 15 ng/ml de IL-1β se adicionaron al primer medio de cultivo y 70 ng/ml de IL-15, 100 ng/ml de IFN-γ, 15 ng/ml de IL-21 y 1 μg/ml de mAb anti-CD3 se adicionaron al segundo medio de cultivo. Se eliminó una fracción del medio viejo y se adicionó medio fresco cada 5-6 días, complementado con factores de crecimiento. Este sistema no requería células "alimentadoras" accesorias. El panel izquierdo muestra los porcentajes de células Vδ1+CD3+ entre el total de células vivas analizadas mediante citometría de flujo. El panel derecho muestra un aumento en cantidad de veces en el número absoluto de células T Vδ1+ CD3+ en relación con el número inicial de células. Las células vivas se contaron usando exclusión positiva con azul de tripano en un hemocitómetro. Se muestra un promedio de 3 mediciones del número de células

40 **La Figura 7 muestra la expresión de varios marcadores de superficie celular en células T Vδ1+ expandidas *in vitro*.** Expresión de los receptores de activación NKp30, NKp44 y NKG2D en células T CD3+Vδ1+ después de 16 días de cultivo (como en la Tabla 8). También se muestran las tinciones de control de mAb de isotipo (se debe tener en cuenta que el control para la expresión de NKp30 y NKp44 es el mismo).

45 **La Figura 8 muestra que las células T TCRγδ+ expandidas *in vitro* son citotóxicas contra las células de LLC, pero no contra las PBMC autólogas.** Después de 21 días de expansión y diferenciación (como se describe en la Figura 6), las células T TCRγδ+ resultantes se incubaron conjuntamente con células diana (anteriormente marcadas con DDAO-SE) durante 3 horas a 37 °C y la muerte de las células diana se evaluó mediante tinción con anexina V. (A) Análisis de citometría de flujo de células MEC-1 de LLC susceptibles (panel superior) y PBMC autólogas no susceptibles (panel inferior). Gráficos representativos de 3 réplicas técnicas. (B) Impacto de diferentes relaciones de células diana:efector y de los anticuerpos de bloqueo contra NKG2D o NKp30 en la destrucción de células de leucemia MEC-1. Las barras de errores representan la DE (n = 3, \**P* < 0,05). (C) Las células T TCRγδ+ expandidas y diferenciadas (designadas en esta invención como "células DOT") del donante A se incubaron conjuntamente con muestras de células primarias de LLC B (recolectadas de la sangre periférica de pacientes con LLC/LLP y enriquecidas en CD19 mediante MACS) o con PBMC autólogas sanas. Se muestra la media más la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. Procedimientos detallados: La línea celular MEC-1 LLC<sup>46</sup> se obtuvo del Centro Alemán de Recursos para el Material Biológico (DSMZ). Las células tumorales MEC-1 se cultivaron en matraces T25 en RPMI 1640 al 10 % completo, con suero bovino fetal al 10 %, 2 mM de L-glutamina, se mantuvieron a 10<sup>5</sup> hasta 10<sup>6</sup> células/ml por dilución y se fraccionaron en una relación de 1:3 cada 3-4 días. Para los ensayos de citotoxicidad, las células T TCRγδ+ expandidas *in vitro* se colocaron en placas de fondo redondo de 96 pocillos. Las muestras primarias de líneas celulares tumorales o leucemia se tiñeron con CellTrace Far Red DDAO-SE (1 μM; Molecular Probes, Invitrogen) y se incubaron en la relación de diana:efector con células T TCRγδ+ en un medio RPMI 1640 durante 3 horas a 37 °C y con un 5 % de CO<sub>2</sub>, en presencia de 70 ng/ml de IL-15. Todas las células con Annexin V-FITC (BD Biosciences) y se procedió al análisis de las mismas mediante citometría de flujo.

65 **La Figura 9 muestra que las células T TCRγδ+ producen altos niveles de IFN-γ.** Las células T TCRγδ+ se produjeron a partir de dos donantes sanos en bolsas de cultivo celular durante 21 días, seguido de un protocolo de

cultivo de 2 etapas, como se describió anteriormente. Las células se lavaron, se sembraron en placas de 96 pocillos y se volvieron a estimular con medio fresco complementado con 100 ng/ml de IL-15 y 2 µg/ml de mAb anti-CD3. Después de 48 h, los sobrenadantes del cultivo celular se analizaron mediante citometría de flujo mediante una matriz de perlas citométrica (BD Biosciences). OpTmizer se refiere a células mantenidas en medios no complementados con compuestos de activación. Se muestra la media más la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. Las barras de errores representan la DE (n = 3, \*\*P < 0,01).

**La Figura 10 muestra que las células T TCRγδ<sup>+</sup> de pacientes con LLC/LLP se expanden de manera sólida *in vitro* y son altamente citotóxicas contra las células de LLC/LLP y las células infectadas con CMV.** Los PBL TCRγδ<sup>+</sup> clasificados mediante MACS de los pacientes con LLC/LLP se cultivaron durante 21 días con citocinas y mAb como se describió anteriormente. Panel izquierdo: las células se analizaron mediante citometría de flujo para la coexpresión de TCRVδ1/CD3 y se calculó el aumento en cantidad de veces de las células T CD3+Vδ1+. Las células vivas se identificaron mediante citometría de flujo con un colorante de viabilidad (Zombie Violet; Biolegend) y se contaron con azul de tripano en un hemocitómetro. Panel derecho: las células T TCRγδ<sup>+</sup> de un paciente con LLC/LLP LC/LLP se cultivaron conjuntamente durante 3 h a una relación de diana-efector de 1:10 en una placa de 96 pocillos con células MEC-1 derivadas de una LLC/un LLP o con fibroblastos de prepucio humano (FFB), sanos o anteriormente infectados con la cepa de citomegalovirus AD169 YFP<sup>+</sup> (M.I. de 0,005; las barras de error representan la desviación estándar (n = 3 para cada grupo). El porcentaje de células tumorales muertas antes de la incubación con células DOT fue de alrededor del 20 % en cada grupo. LLP significa linfoma linfocítico pequeño.

**La Figura 11 muestra que las células T TCRγδ<sup>+</sup> expandidas *in vitro* son citotóxicas contra las células de cáncer de varios orígenes tisulares.** Los linfocitos T TCRγδ<sup>+</sup> de sangre periférica de un donante sano se clasificaron mediante MACS y se estimularon *ex vivo* en presencia de citocinas y mAb anti-CD3 durante 21 días, según el protocolo de cultivo de dos etapas descrito. Las células se incubaron conjuntamente durante 3 horas en placas de 96 pocillos con un panel de líneas de células tumorales: MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda; LLA); HL-60 (leucemia mieloide aguda; AML); K562 (leucemia mieloide crónica; LMC); MEC-1 (leucemia linfocítica crónica; LLC); HELA (carcinoma cervical); Daudi (linfoma de Burkitt); THP-1 (leucemia monocítica aguda; AMoL); MDA-231 (carcinoma de mama), PA-1 (carcinoma de ovario); PC3 (carcinoma de próstata) y HCT116 (carcinoma de colon). La muerte de células tumorales se evaluó mediante tinción con anexina-V (n = 3 réplicas técnicas).

**La Figura 12 muestra que las células T TCRγδ<sup>+</sup> se alojan y sobreviven en modelos tumorales de xenoinjerto.** **A.**  $2 \times 10^7$  de células T TCRγδ<sup>+</sup> se transfirieron a huéspedes inmunodeficientes NSG portadores de tumores portadores (línea células de LLC/LLP de MEC-1). Al cabo de 30 días desde la transferencia de células T TCRγδ<sup>+</sup>, los animales se sacrificaron y la progenie de las células T TCRγδ<sup>+</sup> se evaluó mediante FACS en los tejidos indicados. Cabe señalar que las células T TCRγδ<sup>+</sup> estaban presentes en todos los tejidos analizados y, también, las células T CD3<sup>+</sup>Vδ1<sup>+</sup> se enriquecieron altamente, lo que sugiere el buen estado preferencial y/o la activación en presencia del tumor de LLC. Los diagramas de puntos son de un animal representativo de 6 animales analizados. **B.** Las células T TCRγδ<sup>+</sup> expresan NCR *in vivo*. Las células T TCRγδ<sup>+</sup> recuperadas del hígado al día 30 después de la transferencia se analizaron mediante FACS, en búsqueda de la expresión de NCR. Nótese la alta expresión de NKp30 y NKG2D. Los gráficos de puntos superiores son controles de isotipo. Se muestra un animal representativo de 3 animales analizados. **C.** Las células T TCRγδ<sup>+</sup> infundidas pueden alojarse en huéspedes inmunodeficientes BRG.  $10^7$  células T TCRγδ<sup>+</sup> de un donante diferente se transfirieron a huéspedes BRG portadores de un tumor de LLC y se cuantificaron mediante FACS 72 horas después de la transferencia. Las células T TCRγδ<sup>+</sup> podrían recuperarse tanto del pulmón como del hígado y se descubrieron células que expresaban TCRVδ1<sup>+</sup> en proporciones similares a las de la transferencia inicial. Se muestra un animal de cada dos.

**La Figura 13 muestra que las células T TCRγδ<sup>+</sup> pueden limitar el crecimiento tumoral *in vivo*.**  $10^7$  células tumorales de LLC/LLP MEC-1 que expresaban luciferasa se transfirieron subcutáneamente a huéspedes inmunodeficientes BRG. 10 y 15 días después de la transferencia,  $10^7$  células T TCRγδ<sup>+</sup> o PBS de control se transfirieron por vía intravenosa a huéspedes portadores de tumores de LLC, tal como se verificó mediante un análisis de luminiscencia. El crecimiento del tumor de LLC/LLP se midió periódicamente usando un calibrador. Se muestra el tamaño del tumor, teniendo en cuenta el efecto de las células T TCRγδ<sup>+</sup> visibles en el tamaño del tumor de LLC (n = 8 ratones por grupo).

**La Figura 14 muestra que las células T TCRγδ<sup>+</sup> limitan la diseminación del tumor LLC.** **A.**  $10^7$  células de tumores de LLC/LLP MEC-1 que expresan luciferasa se transfirieron por vía subcutánea a huéspedes NSG inmunodeficientes. 10 y 15 días después de la transferencia, las células T TCRγδ<sup>+</sup> ( $2 \times 10^7$ ) o PBS de control se transfirieron por vía intravenosa a huéspedes con tumores de LLC/LLP, como se verificó mediante el análisis de luminiscencia. El crecimiento tumoral de LLC/LLP se midió periódicamente usando un calibrador. Se muestra el tamaño del tumor, teniendo en cuenta la tendencia parcial y transitoria al principio del tratamiento, pero las células T TCRγδ<sup>+</sup> no pudieron limitar el crecimiento tumoral más rápido de la afección LLC/LLP en volumen en estos huéspedes. **B-D.** La línea tumoral de LLC/LLP es capaz de extenderse a otros órganos en estos experimentos. Los gráficos que se muestran en B representan el análisis FACS de los órganos recuperados al final del experimento de los huéspedes NSG que reciben la transferencia de células T TCRγδ<sup>+</sup> o PBS de control. Se observó una reducción generalizada de las células tumorales de LLC/LLP se recuperaron en diferentes órganos, pero este efecto fue más pronunciado en el hígado, un órgano importante para la propagación del tumor en este modelo. **C.** Análisis histológico (H&E) de un

animal representativo de cada grupo, mostrando metástasis tumoral de LLC/LLP en los sitios anatómicos indicados de animales tratados con PBS y ausencia de infiltrados tumorales en animales tratados. (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01). **D.** Se muestra un resumen del análisis histológico, que muestra animales de cada grupo donde se descubrieron infiltrados tumorales de LLC/LLP contra animales libres de infiltrados tumorales. La puntuación fue realizada a ciegas por un patólogo certificado en muestras histológicas teñidas con H&E de los tejidos indicados de animales en el experimento representado en la figura 15. Los resultados se muestran para todos los animales analizados y muestran una clara reducción en la diseminación tumoral general en el grupo de animales tratados con células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> expandidas *in vitro*.

**La Figura 15 muestra que las células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> pueden infiltrar un tumor primario y se activan *in vivo*. A.** Se muestra el análisis IHC de secciones teñidas con CD3 de tumores de LLC/LLP de animales NSG transferidos con células tumorales MEC-1 y tratados con células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>. **B.** Analizamos la expresión de CD69 (n = 3, se muestra un gráfico de puntos representativo), de Nkp30 y de NKG2D (n = 2) *in vivo* en diferentes órganos y se descubrió que las células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> recientemente activadas, con una mayor expresión de estos marcadores de activación en las células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> se recuperaron del tumor LLC/LLP.

**La Figura 16 muestra el análisis bioquímico de muestras de sangre.** (A) Se recolectó sangre en el momento de la necropsia de los animales del experimento que se muestra en la Figura 14 y se realizó un análisis bioquímico para la alanina-aminotransferasa (ALT/GPT), el aspartato aminotransferasa (AST/GOT), el nitrógeno urea en sangre (BUN), la creatinina, la creatina Fosfoquinasa (CPK) y el lactato deshidrogenasa (LDH). (B) Lo mismo que en A, para los animales que se muestran en la figura 11. No encontramos evidencia de toxicidad asociada con el tratamiento con células DOT.

#### Procedimientos detallados de los estudios *in vivo* :

Los animales Balb/c Rag<sup>-/-</sup>  $\gamma\text{c}^{-/-}$ <sup>47</sup> se obtuvieron de Taconic (USA); los ratones NOD-SCID $\gamma\text{c}^{-/-}$ <sup>48</sup> se obtuvieron de Laboratories (EE. UU.). A los ratones BRG o NSG se les inyectó por vía subcutánea células MEC-1 y, después de 6 y 11 días, se los trató con dos transferencias intravenosas de 10<sup>7</sup> o 2 × 10<sup>7</sup> células DOT, y, a continuación, se analizaron (tamaño del tumor, histología, citometría de flujo del tumor o infiltrados de órganos y bioquímica sanguínea) como se detalla. Todos los procedimientos con animales se realizaron según las pautas nacionales de la Direção Geral de Veterinária y fueron aprobados por el Comité de Ética correspondiente. Para el fenotipado después de la transferencia de células DOT *in vivo*, los animales fueron sacrificados usando Eutasil para la recolección de sangre mediante punción cardíaca; y rápidamente se los perfundió con PBS + Heparina. Los órganos se homogeneizaron y lavaron en filtros de células de 70  $\mu\text{m}$ . Los fémures se enjuagaron y, a continuación, se filtraron. A continuación, las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos de Ebioscience, Biolegend, Myltenyi Biotec o Beckton Dickinson: anti-CD45 de ratón (30-F11) y anti-CD45 humano (HI30). Otros anticuerpos utilizados son comunes con los estudios *in vitro*. Los anticuerpos se acoplaron a los fluorocromos FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy5, PE-Cy7, APC, APC-Cy7, Pacific Blue, Brilliant Violet 421 y Brilliant Violet 510. El análisis estadístico se realizó usando el software Graphpad-Prism. Las medias de las muestras se compararon utilizando la prueba *t* de Student para datos no apareados. En caso de que las varianzas de las dos muestras se encontraran diferentes usando la prueba F, los datos se transformaron logarítmicamente y, en caso de hallarse varianzas que no fuesen diferentes, se aplicó la prueba *t* no apareada a los datos transformados logarítmicamente. Para los datos de supervivencia, se utilizó la prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox).

Diseño experimental *in vivo*: Usamos un modelo anteriormente descrito de una LLC humana con un xenoinjerto tras la transferencia adoptiva subcutánea de células MEC-1 derivadas de la LLC/el LLP en animales Balb/cRag<sup>-/-</sup> $\gamma\text{c}^{-/-}$  (BRG), las cuales adaptamos adicionalmente usando animales NOD-SCID $\gamma\text{c}^{-/-}$  (NSG) como huéspedes. Con el fin de garantizar que los animales que recibieron tratamiento o control con PBS fueran animales portadores de tumores, transducimos células de LLC MEC-1 con luciferasa de luciérnaga para detectar y medir el injerto tumoral en puntos de tiempo tempranos antes de atribuir las células de tratamiento. Después de 7 o 4 días (en diferentes estudios) inyectamos luciferina IP para determinar la carga tumoral en función de la luminiscencia, antes de atribuir el tratamiento (o control PBS) a los animales. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en jaulas y se asignaron a cada tratamiento (PBS o células DOT) según la luminiscencia medida el día 7, de tal forma que el animal con mayor luminiscencia recibió tratamiento, el segundo con mayor luminiscencia recibió tratamiento con PBS, el tercero con mayor luminiscencia recibió tratamiento, etc. Esto resultó en una distribución no aleatoria en grupos, aunque sí aleatoria en las diferentes jaulas. 2 animales adicionales recibieron células DOT en los experimentos indicados para el análisis de orientación inicial. Realizamos dos transferencias de 10<sup>7</sup> o 2 × 10<sup>7</sup> células DOT (dentro de 5 días), usando células de un donante diferente por experimento. El tumor se midió usando un calibrador y tomando tres medidas perpendiculares. La fórmula utilizada fue  $\frac{1}{2} \times L \times W \times H$ .<sup>49</sup> Los animales se sacrificaron cuando las medidas del tumor alcanzaron los 1000 mm<sup>3</sup>.

Análisis de luminiscencia: después de la transducción de la línea celular MEC-1 con luciferasa de luciérnaga GFP, las células en crecimiento se examinaron y clasificaron según la expresión de GFP utilizando un FACS-Aria (Becton Dickinson, EE. UU.), hasta > 95 % de células GFP positivas. A continuación, estas células se mantuvieron en cultivo hasta que se transfirieron por vía subcutánea a animales huéspedes (en 50  $\mu\text{l}$  de PBS). En los puntos de tiempo indicados después de la transferencia, los animales fueron anestesiados (Ketamina/Medetomidina) y se les inyectó Luciferina (IP). Al cabo de 4 minutos, se detectó y adquirió la actividad de luciferasa utilizando IVIS Lumina (Calliper LifeSciences) en las instalaciones de bioimágenes de IMM. A continuación, se revirtió la anestesia y los animales regresaron al alojamiento

anterior.

Recuentos de linfocitos: Los recuentos de células se realizaron con un hemocitómetro o utilizando un citómetro Accuri Flow (Becton Dickinson, EE. UU.). Se estimaron los recuentos por órgano cuando se tomaron muestras de partes del órgano para análisis histológico pesando los órganos antes y después de dividir las muestras. Los números presentados a continuación se corrigen para el órgano completo. En los datos de médula ósea, se calcularon números absolutos y se muestran para un fémur. Histopatología e Inmunohistoquímica: Los ratones fueron sacrificados con sobredosis de anestésico, se realizaron necropsias y se extrajeron órganos seleccionados (pulmón, corazón, intestino, bazo, hígado, riñón, tracto reproductivo, cerebro, cerebelo, médula espinal y fémur), se fijaron en un 10 % de formalina tamponada neutra, se incrustaron en parafina y se tiñeron secciones de 3  $\mu\text{m}$  con hematoxilina y eosina (H&E). Los huesos se descalcificaron adicionalmente en Calci-Clear™ (Fisher Scientific) antes de la incrustación. Las secciones de tejido fueron examinadas por un patólogo, cegado a los grupos experimentales, en un microscopio Leica DM2500 acoplado a una cámara microscópica Leica MC170 HD. La tinción inmunohistoquímica para CD3 (Dako, No. de cat. A0452) fue realizada por el Laboratorio de Histología y Patología Comparada del IMM, utilizando protocolos estándares, con un Dako Autostainer Link 48. La recuperación de calor del antígeno se realizó en DAKO PT Link con una solución de pH bajo (pH 6) y la incubación con el kit ENVISION (Peroxidasa/Sistema de detección DAB, DAKO, Santa Bárbara, CA) fue seguido por la contratinción de hematoxilina de Harri (Bio Otica, Milán, IT). El control negativo incluyó la ausencia de anticuerpos primarios; y no se observó tinción de CD3 en los controles negativos. Las imágenes se adquirieron en un microscopio Leica DM2500, acoplado con una cámara microscópica Leica MC170 HD.

Bioquímica de la sangre del ratón: los ratones se anestesiaron profundamente y se extrajo sangre del corazón en tubos recubiertos de heparina, que se enviaron para el análisis de los parámetros bioquímicos mostrados en un laboratorio independiente. Los parámetros bioquímicos se midieron en suero, en un analizador de química clínica RX monaco (RANDOX).

**La Figura 17 muestra el enriquecimiento de PBL TCR $\gamma\delta^+$  después de la clasificación MACS de dos etapas.**

Se recolectó sangre periférica (obtenida de capas leucocitarias) de 4 voluntarios sanos, y las células T TCR $\gamma\delta^+$  T totales se aislaron mediante MACS: primero, se realizó el agotamiento de TCR $\alpha\beta$  y, a continuación, se realizó la selección positiva de las células CD3 $^+$ . Las células se tiñeron para TCR $\gamma\delta$ , CD3 y TCRV $\delta 1$  y se analizaron mediante citometría de flujo. Los gráficos de puntos muestran fracciones de PBL TCR $\gamma\delta^+$  antes y después de cada etapa de clasificación de la MACS (paneles izquierdos); y los porcentajes iniciales y finales de las células T V $\delta 1^+$  (paneles derechos).

**La Figura 18 muestra la caracterización del fenotipo de activación y maduración de las células T V $\delta 1^+$  obtenidas.**

(A) Comparación de citometría de flujo del fenotipo de superficie celular de células T V $\delta 1^+$  en el día 21 de cultivo (usando el protocolo de cultivo de 2 etapas descrito anteriormente); (líneas completas) con células T V $\delta 1^+$  recientemente aisladas (líneas de puntos), analizadas usando el kit LEGENDScreen (Biolegend). Se muestran superposiciones de histogramas para varios marcadores relacionados con la activación y diferenciación de linfocitos, y marcadores implicados en la adhesión y la migración. Se muestran las células de un donante sano. (B) Mapa de calor que representa los porcentajes de células positivas para cada marcador de superficie en células T V $\delta 1^+$  cultivadas (en el día 21 de cultivo) producidas a partir de 4 donantes sanos diferentes (cultivos 1-4), en comparación con células T V $\delta 1^+$  recientemente aisladas (de los donantes 1 y 2). El código de color se presenta a la derecha. Para el fenotipado después de la producción celular: las células se tiñeron con anti-CD3-APC (clon UCHT1), anti-TCRV $\delta 1$ -FITC y un panel de receptores usando el kit LegendScreen (Biolegend).

**La Figura 19 muestra la citotoxicidad dependiente de TCR/NCR de las células T TCR $\gamma\delta^+$  contra células leucémicas (pero no sanas).**

Las células T TCR $\gamma\delta^+$  expandidas y diferenciadas, producidas a partir de dos donantes sanos (usando el protocolo de cultivo de 2 etapas descrito anteriormente), se probaron en diferentes experimentos contra las células diana MEC-1 (LLC) en niveles crecientes, relaciones de efector/diana (gráfico de la izquierda, barras grises) y también en presencia de anticuerpos bloqueantes para ( $\alpha$ , anti-) las moléculas indicadas, ya sea individualmente (Exp. 1) o en combinaciones (Exp. 2). La relación de más alto efector/diana (10:1) se usó en experimentos de bloqueo y la barra gris en esta relación (con un anticuerpo de isotipo IgG) sirve como control. Se muestran los porcentajes de células diana MEC-1 muertas (Anexina V $^+$ ). \* y # indican diferencias significativas en relación con el control de isotipo IgG o una  $\alpha$ -TCRV $\delta 1$ , respectivamente (media más la desviación estándar; \*\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,01; prueba de la t de Student).

Para los ensayos citotóxicos, las células tumorales MEC-1 se cultivaron en matraces T25 en RPMI 1640 al 10 % completo, con suero bovino fetal al 10 %, 2 mM de L-glutamina, se mantuvieron a  $10^5$  hasta  $10^6$  células/ml por dilución y se fraccionaron en una relación de 1:3 cada 3-4 días. Las células T TCR $\gamma\delta^+$  expandidas *in vitro* se colocaron en placas de fondo redondo de 96 pocillos. Las células tumorales se tiñeron con CellTrace Far Red DDAO-SE (1  $\mu\text{M}$ ; Molecular Probes, Invitrogen) y se incubaron en la relación de diana:efector con células T TCR $\gamma\delta^+$  en un medio RPMI 1640 durante 3 horas a 37 °C y con un 5 % de CO $_2$ , en presencia de 70 ng/ml de IL-15. Para el bloqueo del receptor, los PBL  $\gamma\delta$  se preincubaron durante 1 hora con anticuerpos bloqueadores: anti-TCRV $\delta$  humano (clon B1); anti-NKG2D humano (clon 1D11); anti-CD2 humano (clon RPA-2.10); anti-CD3 humano (clon OKT-3); anti-NKp30 humano (clon P30-15); anti-NKp44 humano (clon

P44-8), IgG1,k de ratón (clon MOPC-21), IgG2b de ratón (clon MPC-11), IgG3k de ratón (clon MG3-35), todos de Biologend. El anti-CD226 humano (clon DX11) era de BD Biosciences. Los TCR anti-V $\delta$ 1 humanos (clones TCS-1 o TS8.2) eran de Fisher Scientific y el anti-TCR $\gamma\delta$  humano (clon IMMU510) era de BD Biosciences. Los anticuerpos bloqueantes se mantuvieron en el medio de cultivo durante los ensayos de destrucción.

5

Finalmente, a continuación, se tiñeron todas las células con Annexin V-FITC (BD Biosciences) y se procedió al análisis de las mismas mediante citometría de flujo.

10 **La Figura 20 muestra la expresión de los receptores de activación NK de superficie celular en células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> V $\delta$ 1<sup>-</sup> y V $\delta$ 2<sup>-</sup> expandidas in vitro.** Las células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> expandidas y diferenciadas se produjeron a partir de donantes sanos, utilizando el protocolo de cultivo de 2 etapas descrito anteriormente. Se muestra la expresión de los receptores de activación NKp30 y NKp44 en células CD3<sup>+</sup> V $\delta$ 1<sup>+</sup> y en células T CD3<sup>+</sup> V $\delta$ 1<sup>-</sup> V $\delta$ 2<sup>-</sup> después de 21 días de cultivo. Primero, se identificaron las células CD3<sup>+</sup>V $\delta$ 2<sup>+</sup> (con mAb anti-CD3 y anti-V $\delta$ 2 conjugados con fluorocromos) y se excluyeron del análisis. Las células CD3<sup>+</sup> restantes se analizaron para determinar la expresión de V $\delta$ 1 y NKp30, NKp44 y el control del isotipo. Se muestran los resultados representativos de 4 experimentos independientes con 4 donantes diferentes.

15

**La Figura 21 muestra la citotoxicidad del subconjunto de células T V $\delta$ 1<sup>-</sup>V $\delta$ 2<sup>-</sup> de células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> contra células leucémicas.**

20 Las células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> expandidas y diferenciadas, producidas a partir de un donante sano (utilizando el protocolo de cultivo de 2 etapas descrito anteriormente) se tiñeron para los marcadores de células T CD3, V $\delta$ 1 y V $\delta$ 2 con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos, y la población de células T CD3<sup>+</sup>V $\delta$ 1<sup>-</sup>V $\delta$ 2<sup>-</sup> se aisló mediante citometría de flujo. A continuación, las células aisladas se analizaron en un ensayo de destrucción *in vitro* contra las líneas celulares diana de la leucemia mieloide aguda (LMA) (KG-1, THP-1, HL-60 y NB-4) en una relación de efector/diana de 10:1. El ensayo de destrucción se realizó como se describió anteriormente.

25

#### **Tablas:**

30 **La Tabla 1 describe las moléculas utilizadas para estimular la proliferación de células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> durante la etapa de optimización.** Los reactivos se utilizaron en un intervalo de concentración de 0,1 ng/ml a 80  $\mu$ g/ml. La columna de la derecha muestra el distribuidor o fabricante del reactivo.

35 **La Tabla 2 muestra un resumen de las condiciones de cultivo probadas.** Los PBL TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> se aislaron mediante MACS de un donante sano y se cultivaron a 1 millón de células/ml en placas de 96 pocillos, a 37 °C y con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células se expandieron en medio completo (Optmizer CTS, GIBCO) complementado con un 5 % de plasma autólogo, 1 mM de L-glutamina y con los factores de crecimiento descritos. Al final del período de cultivo, se contaron las células y se analizó el fenotipo celular mediante citometría de flujo. Se muestran los resultados seleccionados de 4 experimentos consecutivos. Las mejores condiciones de cultivo en cada experimento se clasifican por aumento en cantidad de veces. La tasa de expansión en cantidad de veces de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> se calculó de la siguiente manera: (número absoluto de células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> al final del cultivo)/(número absoluto de células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> al día 0 de cultivo). Se muestran los resultados representativos de 2 experimentos independientes.

40

45 **La Tabla 3 muestra un resumen de las condiciones de cultivo probadas.** Los PBL TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> se aislaron mediante MACS de un donante sano y se cultivaron durante 14 días en presencia de los factores de crecimiento descritos. El día 14 de cultivo, las células se dividieron: una fracción de células se cultivó como antes, mientras que la otra fracción de células se cultivó en ausencia de IL-4 y en presencia de los factores de crecimiento indicados. El día 21, se contaron las células y se analizó el fenotipo celular mediante FACS. Se muestran los resultados representativos de 2 experimentos independientes. También se realizó un ensayo de citotoxicidad el día 21 usando las células TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> contra dianas de leucemia MOLT-4 (el procedimiento se describe en la Figura 8). Las células diana apoptóticas (moribundas) se detectaron mediante tinción positiva con el reactivo Anexina-V en una máquina de citometría de flujo Fortessa II (BD Biosciences). La muerte de las células tumorales basales (es decir, el porcentaje de células tumorales apoptóticas en muestras de tumores que no se cultivaron conjuntamente con células TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>) fue de 10  $\pm$  3 %. Se muestra el promedio de dos réplicas técnicas.

50

55 **La Tabla 4 muestra un resumen de las condiciones de cultivo probadas.** Los PBL TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> se aislaron mediante MACS de un donante sano y se cultivaron durante 15 días en protocolos de cultivo de dos y tres etapas, en presencia de los factores de crecimiento descritos. Se contaron las células y se analizó el fenotipo celular mediante FACS al final del período de cultivo. Se muestran los resultados representativos de 2 experimentos independientes.

55

60 **La Tabla 5 muestra un resumen de las condiciones de cultivo probadas.** Los PBL TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> se aislaron mediante MACS de un donante sano, siguiendo el protocolo de dos etapas, y se cultivaron durante 21 días en presencia de los factores de crecimiento descritos. Se contaron las células y se analizó el fenotipo celular mediante FACS al final del período de cultivo. Se muestran los resultados representativos de 2 experimentos independientes

60

65 **La Tabla 6 muestra la pureza y el fenotipo de los PBL TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> aislados a través de un protocolo MACS de dos etapas.** Las PBMC se obtuvieron mediante centrifugación en gradiente de densidad en ficoll a partir de productos de

65

la capa leucocitaria recolectados de 8 donantes sanos. Las células T TCR $\gamma\delta^+$  se aislaron adicionalmente mediante un protocolo MACS de dos etapas, como se describe en la Figura 2. El fenotipo celular se caracterizó mediante un análisis de citometría de flujo de los antígenos de la superficie celular. Los datos corresponden a porcentajes de células vivas

5

**La Tabla 7 muestra la pureza y el fenotipo de las células T TCR $\gamma\delta^+$  expandidas *in vitro*.** Las células T TCR $\gamma\delta^+$  clasificadas por MACS de donantes sanos (las mismas de la Tabla 6) se cultivaron por 21 días en bolsas de cultivo celular, según el protocolo de cultivo de dos etapas descrito anteriormente. Las poblaciones celulares se caracterizaron por citometría de flujo. Se indican los porcentajes de células T TCR $\gamma\delta^+$  y células contaminantes, en relación con las células vivas totales presentes en los cultivos.

10

**La Tabla 8 muestra la expresión de NCR y NKG2D en células T V $\delta 1^+$  recientemente aisladas, contra las que se cultivaron.** Expresión de los receptores de activación NKp30, NKp44 y NKG2D en células T CD3 $^+$ V $\delta 1^+$  después de 16 y 21 días de tratamiento con citocina y mAb anti-CD3. Los datos de esta tabla son representativos de los datos obtenidos de 10 donantes independientes, y se observa que la expresión de NKp30 y NKp44 varió entre alrededor del 10 % y el 70 % entre diferentes donantes, mientras que NKG2D se expresó en más del 80 % de los PBL V $\delta 1^+$  de todos los donantes analizados.

15

**La Tabla 9 muestra la pureza y el fenotipo de PBL TCR $\gamma\delta^+$  clasificados por MACS de pacientes con LLC/LLP.** Se obtuvieron células de leucemia linfocítica crónica (LLC) de células B de la sangre periférica de los pacientes en la primera presentación, después del consentimiento informado y la aprobación de la junta de revisión institucional. Las células T TCR $\gamma\delta^+$  se clasificaron mediante MACS de la sangre periférica de 3 pacientes con LLC (LLC-1-3) y el fenotipo de la población celular se caracterizó mediante un análisis de citometría de flujo de antígenos de la superficie celular. Muestra porcentajes de células T TCR $\gamma\delta^+$  y células contaminantes, obtenidas inmediatamente antes y después del procedimiento de aislamiento magnético de 2 etapas. Cada subconjunto de células se controló con el total de células vivas.

20

25

**La Tabla 10 muestra que las células de LLC B autólogas contaminantes se convierten en una población residual en el cultivo.** Las células T TCR $\gamma\delta^+$  se clasificaron por MACS de la sangre periférica de 3 pacientes con LLC/LLP (LLC-1-3; como en la Tabla 9) y se cultivaron *in vitro* durante 16 días como se describió anteriormente. El fenotipo de la población celular se caracterizó mediante un análisis de citometría de flujo de antígenos de superficie celular. Se muestran los porcentajes de células T TCR $\gamma\delta^+$  y células contaminantes. Cada subconjunto de células está controlado por el total de células vivas, excepto la expresión de NKp30 y NKG2D que se controló con las células T V $\delta 1^+$ .

30

35

**La Tabla 11 muestra con más detalle las condiciones de cultivo probadas presentadas en la Tabla 2 de una solicitud anterior.** Se aislaron PBL TCR $\gamma\delta^+$  de un donante sano mediante MACS, como se describió anteriormente, y se cultivaron en placas de 96 pocillos a 1 millón de células/ml en un medio completo (Optmizer CTS, GIBCO) complementado con un 5 % de suero humano, 1mM de L-glutamina, a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Al final del período de cultivo, se contaron las células y se analizó el fenotipo celular mediante citometría de flujo. Se muestran los resultados seleccionados de 4 experimentos consecutivos (los mismos experimentos descritos en la Tabla 2 de una solicitud anterior, pero además se describen los resultados de las condiciones de cultivo de control paralelo, marcados con un asterisco, para una comprensión más completa de los resultados). También se muestra el porcentaje de células T V $\delta 1^+$  NKp30 $^+$  obtenidas con cada condición. Las condiciones de cultivo en cada experimento se clasificaron por aumento en cantidad de veces. La tasa de expansión en cantidad de veces de las células T V $\delta 1^+$  se calculó de la siguiente manera: (número absoluto de células T V $\delta 1^+$  al final del cultivo)/(número absoluto de células T V $\delta 1^+$  al día 0 de cultivo). Se muestran los resultados representativos de 2 experimentos independientes.

40

45

**La Tabla 12 muestra un resumen de las condiciones de cultivo probadas.** Los PBL TCR $\gamma\delta^+$  se aislaron y se expandieron a partir de un donante sano, como se describió anteriormente, en la presencia de los factores de crecimiento indicados. Se muestran los resultados seleccionados de un experimento con múltiples condiciones de cultivo. Para comprender mejor los efectos de la IL15/IL-2/IL-7 y el IFN- $\gamma$  en células T TCR $\gamma\delta^+$  cultivadas, las células T TCR $\gamma\delta^+$  se cultivaron en medio de cultivo y tres concentraciones diferentes de IL-4 y mAb anti-CD3, en presencia o ausencia de la IL15/IL-2/IL-7 y el IFN- $\gamma$ . Se muestra el efecto perjudicial de la IL-15, la IL-2 y la IL-7 en la expansión de las células T TCR $\gamma\delta^+$ , cuando estas células se cultivaron en presencia de la IL-4 y el IFN- $\gamma$ . Se muestran los resultados representativos de 2 experimentos independientes.

50

55

**La Tabla 13 muestra el número absoluto total de células T TCR $\gamma\delta^+$  obtenidas antes y después del protocolo de cultivo celular de 2 etapas a gran escala.** Se contaron las células TCR $\gamma\delta^+$  obtenidas de sangre periférica clasificada mediante MACS, de donantes sanos (representados en la Figura 6), con un hemocitómetro antes y después de la expansión/diferenciación del cultivo celular. Cada capa leucocitaria se concentró a partir de 450 ml de sangre periférica y contenía alrededor de 450-550 millones de PBMC. En promedio, 17 millones de células T TCR $\gamma\delta^+$  podrían recolectarse mediante MACS de cada capa leucocitaria. Sin embargo, en futuras aplicaciones clínicas, las muestras iniciales serán productos de leucaféresis que contengan un mayor número de células y sean recolectadas por una máquina de aféresis. En estudios previos, los productos de leucaféresis no estimulados recolectados de pacientes con leucemia contenían en promedio  $13,4 \times 10^9$  (intervalo  $4,4-20,6 \times 10^9$ ) células de sangre periférica, de las cuales

60

65

alrededor de 160 millones de células T TCR $\gamma\delta^+$  (intervalo  $1,0-3,0 \times 10^8$ ) se obtuvieron después de la MACS (Wilhelm, M., y col., Successful adoptive transfer and in vivo expansion of haploidentical gammadelta T cells. J Transl Med, 2014. 12: p. 45.). Esto representa, en promedio, alrededor de 9 veces más células iniciales que las obtenidas con las capas leucocitarias. En consecuencia, el número medio estimado de células que se generarían en el mismo sistema de cultivo si se utilizaran productos de leucaféresis como muestra de partida es de unas  $10,2 \times 10^9$  células (intervalo:  $3,9 \times 10^9$  —  $14,4 \times 10^9$  células).

**La Tabla 14 muestra los reactivos y materiales utilizados para producir células T TCR $\gamma\delta^+$  de grado farmacéutico.**

## Ejemplos

### Optimización de la expansión *ex-vivo* de células T TCR $\gamma\delta^+$ V $\delta 1^+$

Los inventores realizaron una serie de experimentos que apuntan a mejorar la expansión y los niveles de pureza de células T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^-$  cultivadas *in vitro*. Dado que no había ningún anticuerpo contra la cadena V $\delta 3^+$  del TCR disponible comercialmente, se usó un mAb anti-TCRV $\delta 1$  para identificar las células T V $\delta 1^+$  en las muestras celulares, durante la etapa de optimización del cultivo. Los PBL T TCR $\gamma\delta^+$  de un panel de donantes sanos se aislaron por MACS y se probó su actividad para la estimulación *in vitro* con IL-2 y PHA (es decir, cambios detectables en la activación y proliferación celular). Se seleccionó un donante con PBL V $\delta 1^+$  reactivos para la proporción de muestras de sangre para el resto del estudio de optimización. La preferencia por un donante sano fijo fue importante, ya que se podía realizar una comparación más confiable entre los resultados obtenidos en diferentes experimentos. El donante seleccionado tenía un porcentaje normal (pero alto) de células T TCR $\gamma\delta^+$  en la sangre periférica (10 % al 12 % de los PBL totales), aunque el porcentaje de PBL V $\delta 1^+$  era muy bajo (0,3 % de los PBL totales o el 3,0 % de PBL T TCR $\gamma\delta^+$  totales; **Figura 1**). Se consideró que este era un donante adecuado para su uso en estos experimentos porque cada mejora menor en el número y los niveles de pureza finales de las células T V $\delta 1^+$  podía detectarse de inmediato mediante citometría de flujo.

El protocolo de MACS de una sola etapa que se usó para aislar las células T TCR $\gamma\delta^+$  de las PBMC fue muy eficiente, generando poblaciones celulares altamente puras (**Figura 1**). Sin embargo, un reactivo crítico (es decir, el mAb anti-TCR $\gamma\delta$  humano conjugado con microesferas magnéticas, de Miltenyi Biotec) no está aprobado actualmente para aplicaciones clínicas. La producción, validación y aprobación reglamentaria de grado clínico de dicho reactivo puede llevar muchos años, y este problema impedirá cualquier uso inmediato del protocolo descrito en aplicaciones clínicas. A continuación, se desarrolló y adoptó un procedimiento diferente, pero equivalente, para aislar células T TCR $\gamma\delta^+$ . El procedimiento consistió en dos etapas de separación de células magnéticas, como se describe en la **Figura 2**. Los niveles de pureza finales de las células T TCR $\gamma\delta^+$  obtenidas fue inferior que con el procedimiento anterior (de una sola etapa), pero aun así es aceptable para el cultivo celular. Es importante destacar que este nuevo procedimiento de aislamiento celular utilizó solo reactivos ya aprobados para aplicaciones clínicas (fabricados por Miltenyi Biotec GmbH, Alemania).

A continuación, los inventores probaron múltiples combinaciones de citocinas y anticuerpos agonistas de grado clínico, en búsqueda de su capacidad para expandir y diferenciar (en 2 a 3 semanas) las células T V $\delta 1^+$  de la sangre periférica. Los PBL TCR $\gamma\delta^+$  clasificados por MACS, recolectados del donante sano anteriormente seleccionado se incubaron en un medio de cultivo durante 2 a 3 semanas, en placas de 96 pocillos, a 37 °C y con un 5 % de CO<sub>2</sub>, en presencia de 58 moléculas de activación celular T/NK diferentes (**Tabla 1**). Estos incluyeron 13 agonistas de TCR diferentes, 23 agonistas de co-receptor diferentes y 22 citocinas diferentes, que se probaron en 2488 combinaciones y concentraciones diferentes. Los anticuerpos se usaron en presentaciones tanto solubles como unidas a plástico. Las citoquinas se probaron en un intervalo de concentración de 0,1 ng/ml a 1000 ng/ml; se usaron agonistas de TCR en 0,1 ng/ml a 40  $\mu$ g/ml, y los agonistas del co-receptor se usaron a la concentración final de 0,5  $\mu$ g/ml a 80  $\mu$ g/ml.

Se realizaron varios experimentos secuenciales de expansión de cultivo celular y aislamiento celular del mismo donante; cada experimento prueba el efecto de alrededor de 100 a 400 combinaciones diferentes de moléculas de activación. La optimización comenzó con el cóctel básico no optimizado (es decir, cultivar células T TCR $\gamma\delta^+$  en presencia de IL-2 y PHA). Se adicionó medio nuevo que contenía el mismo cóctel elegido de moléculas de activación cada 5 días. Después de 14 días, se recogieron las células y se analizó su fenotipo por citometría de flujo. Se identificó la mejor condición de cultivo de cada experimento (para la mayor cantidad de veces de expansión de células T V $\delta 1^+$ ) y se seleccionó para una mayor optimización, en combinación con todos los reactivos disponibles, probados en varias concentraciones. La expansión en cantidad de veces y los niveles de pureza de las células T V $\delta 1^+$  se incrementaron gradualmente durante la etapa de optimización, después de obtener cada condición de cultivo superior.

Los resultados de los experimentos 1-4 se resumen en la **Tabla 2**. El experimento No. 1 confirmó las observaciones anteriores de que la IL-4 es un factor de crecimiento clave en la promoción de la proliferación y el enriquecimiento de las células T V $\delta 1^+$  en cultivo.<sup>27, 42</sup> En este experimento, los inventores probaron la actividad de 22 citocinas diferentes en células T TCR $\gamma\delta^+$  cultivadas, en presencia de un mitógeno de células T e IL-2. Claramente, la IL-4 fue única en la capacidad de inducir un fuerte enriquecimiento y expansión de estas células. Por el contrario, el uso de concentraciones crecientes de IL-2, o la combinación de IL-2 con diferentes mitógenos de células T, no produjo un efecto equivalente, muy probablemente debido al aumento de la muerte celular inducida por activación (AICD) de células cultivadas (condiciones 2-3; **Tabla 2**).

Tabla 1

|                                       |   |   |                    |
|---------------------------------------|---|---|--------------------|
| Agonistas de TCR                      | Anticuerpos monoclonales (solubles y unidos a la placa) | mAb anti-TCR V $\delta$ 1 humano (Clon TS8.2); purificado         | Thermo Fisher Sci. |
|                                       |   | mAb anti-TCR $\delta$ TCS-1 humano (Clon TS-1); purificado        | Thermo Fisher Sci. |
|                                       |   | mAb anti-TCR PAN $\gamma\delta$ humano (Clon IMMU510); purificado | Beckman Coulter    |
|                                       |   | mAb anti-CD3 humano (Clon OKT3); purificado                       | BioXcell/Biolegend |
|                                       | Lectinas vegetales (solubles)                           | Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol rojo; PHA-P), pur.   | Sigma-Aldrich, Co. |
|                                       |   | Concanavalina A (de <i>Canavalia ensiformis</i> ; Con-A), pur.    |                    |
|                                       |   | Lectina de <i>Phytolacca americana</i> ; purificada               |                    |
|                                       |   | Lectina de <i>Triticum vulgaris</i> (trigo); purificada           |                    |
|                                       |   | Lectina de <i>Lens culinaris</i> (lenteja); purificada            |                    |
|                                       |   | Lectina de <i>Glycine max</i> (soja); purificada                  |                    |
|                                       |   | Lectina de <i>Maackia amurensis</i> ; purificada                  |                    |
|                                       |   | Lectina de <i>Pisum sativum</i> (guisante); purificada            |                    |
|                                       | Lectina de <i>Sambucus nigra</i> (sauco); purificado    |   |                    |
| Agonistas de correceptores            | Anticuerpos monoclonales (solubles y unidos a la placa) | mAb anti-CD2 humano (Clon S5.2); purificado                       | BD Biosciences     |
|                                       |   | mAb anti-CD6 humano (Clon UMCD6/3F7B5); purificado                | Ancell Corporation |
|                                       |   | mAb anti-CD9 humano (Clon MEM-61); purificado                     | Exbio Praha, a.s.  |
|                                       |   | mAb anti-CD28 humano (Clon CD28.2); purificado                    | Biolegend          |
|                                       |   | mAb anti-CD43 humano (Clon MEM-59); purificado                    | Exbio Praha, a.s.  |
|                                       |   | mAb anti-CD94 humano (Clon HP-3B1); purificado                    | Santa Cruz Biotech |
|                                       |   | mAb anti-CD160 humano (Clon CL1-R2); purificado                   | Novus Biologicals  |
|                                       |   | mAb anti-SLAM humano [Clon A12(7D4)]; purificado                  | Biolegend          |
|                                       |   | mAb anti-NKG2D humano (Clon 1D11); purificado                     | Exbio Praha, a.s.  |
|                                       |   | mAb anti-2B4 humano (Clon C1.7); purificado                       | Biolegend          |
|                                       |   | mAb anti-HLA-A,B,C (Clon W6/32); purificado                       | Biolegend          |
|                                       |   | mAb anti-ICAM-3 humano (Clon MEM-171); purificado                 | Exbio Praha, a.s.  |
|                                       |   | mAb anti-ICOS humano (Clon C398.4A); purificado                   | Biolegend          |
|                                       | Proteínas recombinantes (solubles)                      | SECTM-1/Fc Chimera humano (ligando de CD7)                        | R&D Systems        |
| CD26 humano (dipeptidil peptidasa IV) | Sigma-Aldrich,  |   |                    |

|                  |                                    |   |                    |
|------------------|------------------------------------|---|--------------------|
|                  |                                    |   | Co.                |
|                  |                                    | <b>CD27L</b> humano (ligando de CD27);                          | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>CD30L</b> humano (ligando de CD30);                          | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>CD40L</b> humano (ligando de CD40);                          | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>OX40L</b> humano (ligando de OX40);                          | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>4-1BBL</b> humano (ligando 4-1 BB)                           | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>ICAM-1</b> humana  | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>Fibronectina</b> humana                                      | Sigma-Aldrich, Co. |
|                  |                                    | <b>Hidrocortisona</b> humana                                    | Sigma-Aldrich, Co. |
| <b>Citocinas</b> | Proteínas recombinantes (solubles) | <b>IFN-γ</b> (interferón-γ) humano;                             | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>TGF-β</b> humano (factor de crecimiento transformante beta); | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>IL-1-β</b> (interleucina-1β) humana;                         | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>IL-2</b> (interleucina-2) humana;                            | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>IL-3</b> (interleucina-3) humana;                            | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>IL-4</b> (interleucina-4) humana;                            | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>IL-6</b> (interleucina-6) humana;                            | Biolegend          |
|                  |                                    | <b>IL-7</b> (interleucina-7) humana;                            | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>IL-9</b> (interleucina-9) humana;                            | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>IL-10</b> (interleucina-10) humana;                          | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>IL-12</b> (interleucina-12) humana;                          | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>IL-13</b> (interleucina-13) humana;                          | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>IL-15</b> (interleucina-15) humana;                          | PeptoTech, inc     |
|                  |                                    | <b>IL-18</b> (interleucina-18) humana;                          | Southern Biotech   |
|                  |                                    | <b>IL-21</b> (interleucina-21) humana;                          | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>IL-22</b> (interleucina-22) humana;                          | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>IL-23</b> (interleucina-23) humana;                          | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>IL-27</b> (interleucina-27) humana;                          | Biolegend          |
|                  |                                    | <b>IL-31</b> (interleucina-31) humana;                          | PeptoTech, inc.    |
|                  |                                    | <b>IL-33</b> (interleucina-33) humana;                          | PeptoTech,         |

|  |  |   |                 |
|--|--|---|-----------------|
|  |  |   | inc.            |
|  |  | <b>GM-CSF</b> humano (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos); | PeptoTech, inc. |
|  |  | <b>FLT3-L</b> humano (ligando de tirosina quinasa 3 similar a FMS);                 | PeptoTech, inc. |

**Tabla 2**

| Exp. | Cond. No. | Condición:   | Células vivas totales (%) | Células T V $\delta$ 1+ (%) | Aumento en cantidad de veces de las células T V $\delta$ 1+ |
|------|-----------|--|---------------------------|-----------------------------|---|
|      |           | (cultivadas en 1 millón de células/ml durante 14 días en placas de 96 pocillos)  |                           |                             |   |
| 1    | 1         | 20 ng/ml de <b>IL-2</b> + 1 $\mu$ g/ml de <b>PHA</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>   | 68,9                      | 31,6                        | 77  |
|      | 2         | 500 ng/ml de <b>IL-2</b> + 1 $\mu$ g/ml de <b>PHA</b>  | 63,3                      | 10,5                        | 4   |
|      | 3         | 20 ng/ml de <b>IL-2</b> + 1 $\mu$ g/ml de <b>PHA</b> ( <i>control</i> )  | 68,8                      | 1,90                        | 1   |
| 2    | 1         | 20 ng/ml de <b>IL-2</b> + 1 $\mu$ g/ml de mAb <b><math>\alpha</math>-CD3</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>                           | 90,0                      | 51,7                        | 75  |
|      | 2         | 20 ng/ml de <b>IL-2</b> + 1 $\mu$ g/ml de mAb <b>TCR <math>\alpha</math>-V51</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>                       | 85,2                      | 55,9                        | 69  |
|      | 3         | 5 ng/ml de <b>IL-2</b> + 1 $\mu$ g/ml de <b>PHA</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>  | 84,0                      | 61,9                        | 62  |
|      | 4         | 20 ng/ml de <b>IL-2</b> + 1 $\mu$ g/ml de <b>PHA</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b> ( <i>mejor anterior</i> )                         | 72,0                      | 45,3                        | 27  |
|      | 5         | 100 ng/ml de <b>IL-2</b> + 1 $\mu$ g/ml de <b>PHA</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>  | 71,3                      | 55,7                        | 22  |
|      | 6         | 300 ng/ml de <b>IL-2</b> + 1 $\mu$ g/ml de <b>PHA</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>  | 71,3                      | 57,0                        | 21  |
| 3    | 1         | 5 ng/ml de <b>IL-15</b> + 1 $\mu$ g/ml de mAb <b><math>\alpha</math>-CD3</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>                           | 91,7                      | 61,4                        | 138   |
|      | 2         | 5 ng/ml de <b>IL-2</b> + 1 $\mu$ g/ml de mAb <b><math>\alpha</math>-CD3</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>                            | 81,4                      | 59,4                        | 124   |
|      | 3         | 20 ng/ml de <b>IL-2</b> + 1 $\mu$ g/ml de mAb <b><math>\alpha</math>-CD3</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b> ( <i>mejor anterior</i> ) | 84,2                      | 45,4                        | 105   |
|      | 4         | 5 ng/ml de <b>IL-15</b> + 1 $\mu$ g/ml de <b>PHA</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>   | 68,0                      | 76,2                        | 21  |
|      | 5         | 5 ng/ml de <b>IL-2</b> + 1 $\mu$ g/ml de <b>PHA</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>  | 60,1                      | 69,1                        | 19  |
|      | 6         | 20 ng/ml de <b>IL-15</b> + 1 $\mu$ g/ml de <b>PHA</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>  | 68,6                      | 69,9                        | 13  |
|      | 7         | 20 ng/ml de <b>IL-2</b> + 1 $\mu$ g/ml de <b>PHA</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>   | 62,9                      | 67,7                        | 11  |
| 4    | 1         | 20 ng/ml de <b>IFN-<math>\gamma</math></b> + 1 $\mu$ g/ml de mAb <b><math>\alpha</math>-CD3</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>        | 87,1                      | 79,5                        | 1 349   |
|      | 2         | 3 ng/ml de <b>IFN-<math>\gamma</math></b> + 1 $\mu$ g/ml de mAb <b><math>\alpha</math>-CD3</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>         | 85,5                      | 67,4                        | 1 014   |
|      | 3         | 2 ng/ml de <b>IL-15</b> + 1 $\mu$ g/ml de mAb <b><math>\alpha</math>-CD3</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>                           | 87,9                      | 81,6                        | 909   |
|      | 4         | 1 $\mu$ g/ml de mAb <b><math>\alpha</math>-CD3</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>   | 85,9                      | 67,8                        | 804   |
|      | 5         | 5 ng/ml de <b>IL-15</b> + 1 $\mu$ g/ml de mAb <b><math>\alpha</math>-CD3</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b> ( <i>mejor anterior</i> ) | 78,9                      | 69,4                        | 624   |

Los resultados del experimento No. 2 demostraron que la IL-2 (cuando está en presencia de IL-4 y PHA) debe usarse a

bajas concentraciones, para aumentar la proliferación y el enriquecimiento de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> en cultivo (condiciones 3-7, **Tabla 2**). Este efecto no se observó en el experimento anterior (exp. No. 1), donde la expansión de las veces fue mayor en presencia de PHA y niveles elevados de IL-2, en ausencia de IL-4. Además, se demostró que el mAb anti-CD3 es el mitógeno más efectivo para promover la supervivencia y la proliferación de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> en cultivo (ver la condición 1 contra la condición 2, **Tabla 2**).

Los resultados del experimento No. 3 (**Tabla 2**) confirmaron las observaciones previas y mostraron que niveles de concentración de IL-2 incluso más bajos (que los utilizados anteriormente) (en presencia de IL-4 y un mitógeno de células T) promovieron una proliferación, supervivencia y enriquecimiento incluso mayor de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> en cultivo. Además, cuando se usó a la misma concentración, la IL-15 fue más efectiva que la IL-2 en la promoción de la supervivencia, el enriquecimiento y la proliferación de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup>. Nuevamente, el mAb anti-CD3 demostró ser el mitógeno más efectivo de nuestras pruebas.

Los resultados del experimento No. 4 indicaron además que la presencia de altos niveles de IL-15 en el medio de cultivo fue perjudicial para la proliferación de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup>. De hecho, niveles de concentración de IL-15 incluso más bajos (que los utilizados anteriormente) promovieron niveles de expansión aún más altos de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup>, en presencia de IL-4 y  $\alpha$ -CD3 (condiciones 3-5, **Tabla 2**).

Finalmente, en un hallazgo totalmente inesperado, se mostró que el reemplazo de la IL-15 con INF- $\gamma$  (es decir, la ausencia de IL-15 y la presencia de INF- $\gamma$  en el medio de cultivo) genera niveles de expansión incrementados de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> cultivadas.

Si bien muchas concentraciones y combinaciones diferentes de IL-2, IL-7 e IL-15 se probaron en paralelo, se descubrió de manera consistente que el INF- $\gamma$  es un reactivo mucho más efectivo para la promoción de la expansión selectiva de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> en cultivo (cuando se usa en presencia de la IL-4 y un mitógeno de células T, como el mAb anti-CD3; **Figura 3**). El mayor rendimiento de INF- $\gamma$  en estos cultivos fue independiente de las concentraciones de IL-4 y mAb anti-CD3 utilizadas (**Figura 3A-C y Figura 4**). Es importante destacar que el uso del INF- $\gamma$  (pero no de la IL-2, la IL-15 o la IL-7) indujo un aumento drástico en los niveles de enriquecimiento y expansión de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> en cultivos a granel de células T CD3<sup>+</sup> (**Figura 3D**). En estos cultivos, las células T TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> contaminantes presentes en las muestras de partida respondieron a y proliferaron en presencia de IL-2, IL-15 y IL-7, pero no en presencia de INF- $\gamma$ , que parece ser un activador más selectivo de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup>. Estos experimentos mostraron que la combinación específica (y no descrita anteriormente) de INF- $\gamma$  con IL-4 y un mitógeno de células T, en ausencia de IL-2, IL-7 e IL-15 para la producción de células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> tiene ventajas únicas que se pueden usar en una variedad de aplicaciones terapéuticas y comerciales novedosas.

El INF- $\gamma$  es una citocina soluble dimerizada y es el único miembro de la clase de interferones de tipo II.<sup>5</sup> Es estructural y funcionalmente diferente de las citocinas de cadena  $\gamma$  comunes, como IL-2, IL-4, IL-7 o IL-15, y es serológicamente distinto de los interferones de tipo I: es lábil en ácido, mientras que las variantes de tipo I son ácidas. -estable.

Aunque hemos obtenido un procedimiento nuevo y mejorado para expandir y enriquecer poblaciones de células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> en cultivo, también buscamos analizar la función antitumoral de las células generadas, *in vitro*. Descubrimos que la presencia de IL-4 en el medio de cultivo inhibió o redujo fuertemente la expresión de receptor de activación tales como los receptores de citotoxicidad naturales (NCR, es decir NKp30 y NKp44), y NKG2D en células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> expandidas (**Tabla 3**).

Se sabe que los receptores de activación de asesinas naturales (NK) (como NKp30, NKp44 y NKG2D) desempeña un papel fundamental en la función antitumoral y antiviral de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup>, mediante la unión a sus ligandos moleculares expresados en la superficie de células tumorales o infectadas. La unión receptor-ligando desencadena la producción y liberación de granzimas y perforinas por parte de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup>, lo que lleva a la muerte de las células diana.<sup>29</sup> En nuestro estudio, descubrimos que la presencia de IL-4 en el medio de cultivo indujo una disminución en los niveles de receptores de activación NK ubicados en la superficie de las células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, disminuyendo así su función citotóxica contra las células de leucemia MOLT-4 (**Tabla 3**). Cabe señalar que la inhibición inducida por la IL-4 pareció afectar todos los subconjuntos de células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> presentes en el producto celular final, incluyendo las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> y TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> V $\delta$ 1<sup>+</sup> (**Tabla 3**).

Tabla 3

| Condición Nº | Condiciones de cultivo (días 1-14)                 | Condiciones de cultivo (días 15-21) | Células vivas (%) | Vδ1+ T células (%) | Incremento de Vδ1+ células T | Vδ1+ NKp30+ células T (%) | Vδ1+ NKp44+ células T (%) | Vδ1+ NKG2D+ células T (%) | Células blancas muertas tumorales (%) |
|--------------|--|-------------------------------------|-------------------|--------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| 1            | 100ng/ml IL-15<br>1µg/ml a-CD3 mAb (control)       |                                     | 61,4              | 50,3               | 108                          | 45,0                      | 38,0                      | 99,8                      | 62,6                                  |
| 2            | 100ng/ml IL-4<br>70ng/ml IFN-γ<br>1µg/ml a-CD3 mAb |                                     | 81,0              | 92,6               | 8 064                        | 0,9                       | 0,2                       | 48,2                      | 14,0                                  |
| 3            | 100ng/ml IL-4<br>1µg/ml a-CD3 mAb                  |                                     | 83,1              | 83,1               | 2 185                        | 0,1                       | 0,3                       | 46,4                      | 17,5                                  |
| 4            | 100ng/ml IL-4<br>1µg/ml a-TCRVδ1 mAb               |                                     | 68,4              | 92,8               | 1 263                        | 1,6                       | 1,1                       | 38,4                      | 13,3                                  |
| 5            | 100ng/ml IL-4<br>1µg/ml PHA                        |                                     | 69,6              | 73,8               | 464                          | 1,5                       | 2,2                       | 58,7                      | 9,0                                   |
| 6            | 100ng/ml IL-4<br>70ng/ml IFN-γ<br>1µg/ml a-CD3 mAb | 100ng/ml IL-15<br>1µg/ml a-CD3 mAb  | 87,3              | 85,9               | 24 152                       | 30,1                      | 14,7                      | 98,9                      | 68,5                                  |
| 7            |  | 100ng/ml IL-2<br>1µg/ml a-CD3 mAb   | 80,1              | 88,1               | 16 374                       | 29,0                      | 18,2                      | 99,4                      | 70,2                                  |
| 8            |  | 100ng/ml IL-7<br>1µg/ml a-CD3 mAb   | 78,3              | 85,4               | 18 366                       | 15,6                      | 15,4                      | 99,2                      | 67,6                                  |
| 9            | 100ng/ml IL-4<br>1µg/ml a-CD3 mAb                  | 100ng/ml IL-15<br>1µg/ml a-CD3 mAb  | 83,1              | 80,6               | 9 636                        | 19,5                      | 17,7                      | 99,0                      | 64,6                                  |
| 10           |  | 100ng/ml IL-2<br>1µg/ml a-CD3 mAb   | 84,0              | 85,5               | 7 747                        | 23,0                      | 12,9                      | 98,4                      | 54,4                                  |
| 11           |  | 100ng/ml IL-7<br>1µg/ml a-CD3 mAb   | 76,5              | 83,0               | 10 567                       | 10,1                      | 4,4                       | 99,2                      | 50,6                                  |
| 12           | 100ng/ml IL-4<br>1µg/ml a-Vδ1 mAb                  | 100ng/ml IL-15<br>1µg/ml a-Vδ1 mAb  | 69,4              | 72,6               | 5 564                        | 23,2                      | 6,6                       | 95,4                      | 54,5                                  |
| 13           | 100ng/ml IL-4<br>1µg/ml PHA                        | 100ng/ml IL-15<br>1µg/ml PHA        | 67,8              | 65,6               | 2 454                        | 17,6                      | 13,4                      | 95,6                      | 46,0                                  |

5 Esto estaba en línea con un estudio reciente que mostró que la IL-4 promueve la generación de las células T Vδ1+ regulatorias mediante la producción de IL-10. Las células T Vδ1+ tratadas con IL-4 secretaron significativamente menos IFN-γ y más IL-10 en relación con las células T Vδ2+. Además, las células T Vδ1+ mostraron niveles relativamente más bajos de la expresión de NKG2D en presencia de IL-4, lo que sugirió que las células T Vδ1+ debilitan la respuesta inmune contra tumores mediada por las células T TCRγδ+.<sup>42</sup>

10 Ya que buscábamos procedimientos de cultivo novedosos con el objetivo de mejorar las funciones efectoras antitumorales de las células T Vδ1+, intentamos recuperar la expresión de los receptores de activación NK en las células tratadas con IL-4, recuperando también el fenotipo citotóxico de estas células, algo que nunca antes se había intentado.

15 Las células T TCRγδ+ se cultivaron en un protocolo de dos etapas. La primera etapa consistió en tratar las células en un medio de cultivo en presencia de un mitógeno de células T (como mAb anti-CD3 o PHA) e IL-4, y en ausencia de IL-2, IL-15 e IL-7, para promover la expansión selectiva de las células T Vδ1+. La segunda etapa de cultivo consistió en tratar las células en un medio de cultivo en ausencia de IL-4 y en presencia de un mitógeno de células T e IL-2, o IL-7 o IL-15, para promover la diferenciación celular y la expresión de NKR (Tabla 3 y Tabla 4).

20 Las condiciones 1-5 (Tabla 3) confirmaron los resultados anteriores, mostrando que las células T Vδ1+ cultivadas en presencia de IL-4 podrían expandirse en cultivo varios miles de veces, pero no podrían diferenciarse, volviéndose asesinas ineficientes de células tumorales. Por el contrario, como se vio en las condiciones 6-13, cuando las células se subcultivaron en un segundo medio de cultivo en ausencia de IL-4 y en presencia de un mitógeno de células T e IL-2, IL-7 o IL-15, la capacidad de eliminar las células tumorales aumentó radicalmente. La presencia de cada una de estas tres citoquinas (IL-2, IL-7 e IL-15), solas o en combinación, fue capaz de revertir el fenotipo de células T Vδ1+ y, por  
25 consiguiente, pueden usarse para este propósito.

Los resultados de los experimentos No. 6 y 7 (Tabla 4) mostraron que los protocolos de 2 etapas e incluso los protocolos

- de 3 etapas podrían usarse más eficientemente para estimular la proliferación y la diferenciación de las células T Vδ1+. En el caso de los protocolos de 3 etapas, donde las células se cultivaban en 3 medios de cultivo diferentes (véase, por ejemplo, la condición 2 del experimento No. 7 de la Tabla 4), era muy importante separar el medio que contenía IL-4 del medio que contenía IL-2 o IL-7 o IL-15. A partir de estos resultados también se podría concluir que se debe eliminar una fracción del medio de cultivo antiguo durante cada etapa de subcultivo para mejorar la expansión celular; y que, en el segundo medio de cultivo, la IL-15 es ligeramente más eficiente que la IL-2 en la promoción de la proliferación de células T Vδ1+.
- Experimentos adicionales usando protocolos de cultivo de 3 y 4 etapas demostraron además que es posible adicionar otros factores de crecimiento al primero y/o el segundo medio de cultivo (**Tabla 3 y Tabla 4**) para obtener niveles de expansión incrementados de las células T Vδ1+ y para la expresión de los receptores NK en estas células. El INF-γ, la IL-21 y la IL-1β fueron identificados como inductores eficientes de la expansión y supervivencia de las células T Vδ1+ (**Tabla 5**). Estos factores de crecimiento podrían utilizarse en el primero o en el segundo medio de cultivo.
- Finalmente, la adición de un ligando soluble del receptor CD27 o un ligando soluble del receptor CD7 o un ligando soluble del receptor SLAM dio como resultado una expansión mejorada de las células T Vδ1+ (condiciones 3-6 de la **Tabla 5**). El receptor CD27 generalmente se requiere para la generación y el mantenimiento a largo plazo de la inmunidad de las células T. Se une a su ligando CD70 y juega un papel clave en la regulación de la activación de las células B y la síntesis de inmunoglobulinas. El receptor CD7 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Esta proteína se encuentra en los timocitos y en las células T maduras. Desempeña un papel esencial en las interacciones de las células T y también en las interacciones de las células T/células B durante el desarrollo linfocítico temprano. El receptor SLAM es un miembro de la familia de moléculas de activación linfocítica de señalización de receptores inmunomoduladores.

**Tabla 4**

| Exp. No. | Cond. No. | Condición:<br>(cultivadas en 5 × 10 <sup>5</sup> millones de células/ml durante 15 días en placas de 96 pocillos): | Células T Vδ1+ | Aumento en cantidad de veces de las células T Vδ1+ | Células T NKp30+ Vδ1+ |
|----------|-----------|--|----------------|--|-----------------------|
| 6        | 1         | Días 0-5: 100 ng/ml de IL-4 + 1 µg/ml de α-CD3 + 70 ng/ml de IFN-γ   | 72,4           | 7 635  | 39,4                  |
|          |           | Días 6-15: 100 ng/ml de IL-15 + 2 µg/ml de α-CD3   |                |  |                       |
|          | 2         | Días 0-5: 100 ng/ml de IL-4 + 1 µg/ml de α-CD3 + 70 ng/ml de IFN-γ   | 60,1           | 5 100  | 37,9                  |
|          |           | Días 6-15: 100 ng/ml de IL-7 + 2 µg/ml de α-CD3  |                |  |                       |
|          | 3         | Días 0-5: 100 ng/ml de IL-4 + 1 µg/ml de α-CD3 + 70 ng/ml de IFN-γ   | 68,2           | 4 135  | 36,5                  |
|          |           | Días 6-15: 100 ng/ml de IL-2 + 2 µg/ml de α-CD3  |                |  |                       |
| 7        | 1         | Días 0-5: 100 ng/ml de IL-4 + 1 µg/ml de α-CD3 + 70 ng/ml de IFN-γ   | 65,0           | 4 468  | 45,4                  |
|          |           | Días 6-10: 100 ng/ml de IL-15 + 2 µg/ml de α-CD3   |                |  |                       |
|          |           | Días 11-15: <u>eliminar el medio</u> , 100 ng/ml de IL-15 + 2 µg/ml de α-CD3                                       |                |  |                       |
|          | 2         | Días 0-5: 30 ng/ml IL-4 + 1 µg/ml α-CD3 + 70 ng/ml IFN-γ   | 80,5           | 3 987  | 36,0                  |
|          |           | Días 6-10: 100 ng/ml de IL-15 + 1 µg/ml de α-CD3 + 2 ng/ml de IL-21  |                |  |                       |
|          |           | Días 11-15: 100 ng/ml de IL-15 + 1 µg/ml de α-CD3 + 5 ng/ml de IL-21   |                |  |                       |
|          | 3         | Días 0-5: 100 ng/ml de IL-4 + 1 µg/ml de α-CD3 + 70 ng/ml de IFN-γ   | 64,0           | 3 683  | 41,0                  |
|          |           | Días 6-10: eliminar el medio. 100 ng/ml de IL-15 + 2 µg/ml de α-CD3  |                |  |                       |
|          |           | Días 11-15: 100 ng/ml de IL-15 + 2 µg/ml de  |                |  |                       |

|      |           |  |                                     |   |  |
|------|-----------|--|-------------------------------------|---|--|
| Exp. | Cond. No. | Condición:<br>(cultivadas en $5 \times 10^5$ millones de células/ml durante <u>15 días en placas de 96 pocillos</u> ): | Células T V $\delta$ 1 <sup>+</sup> | Aumento en cantidad de veces de las células T V $\delta$ 1 <sup>+</sup> | Células T NKp30 <sup>+</sup> V $\delta$ 1 <sup>+</sup> |
|      |           | <b><math>\alpha</math>-CD3</b>   |                                     |   |  |

Cabe señalar que se probaron varios medios de cultivo diferentes (**Figura 5**). Estas pruebas han demostrado que la presente invención funciona muy bien con diferentes medios de cultivo, incluyendo los medios de calidad clínica, libres de suero y comercialmente disponibles producidos por diferentes fabricantes y adecuados para aplicaciones clínicas.

5

**Tabla 5**

| Condición número: | Condiciones de cultivo (días 1-6)  | Condiciones de cultivo (días 7-11) | Condiciones de cultivo (días 12-16)                                       | Condiciones de cultivo (días 17-21)              | V $\delta$ 1 <sup>+</sup> células T (%) | Incremento de V $\delta$ 1 <sup>+</sup> células T | V $\delta$ 1 <sup>+</sup> NKp30 <sup>+</sup> células T (%) |
|-------------------|--|------------------------------------|---|--|---|---|--|
| 1                 | 100ng/ml IL-4<br>70ng/ml IFN- $\gamma$<br>70ng/ml $\alpha$ -CD3 mAb<br>70ng/ml IL-21<br>15ng/ml IL-1 $\beta$ |                                    | 70ng/ml IFN- $\gamma$<br>2 $\mu$ g/ml $\alpha$ -CD3 mAb<br>100ng/ml IL-15 |  | 75,0                                    | 61 417  | 54,1   |
| 2                 | 100ng/ml IL-4<br>70ng/ml IFN- $\gamma$<br>70ng/ml $\alpha$ -CD3 mAb<br>70ng/ml IL-21                         |                                    | 70ng/ml IFN- $\gamma$<br>2 $\mu$ g/ml $\alpha$ -CD3 mAb<br>100ng/ml IL-15 |  | 80,1                                    | 37 457  | 38,5   |
| 3                 | 100ng/ml IL-4<br>70ng/ml IFN- $\gamma$<br>70ng/ml $\alpha$ -CD3 mAb<br>1 $\mu$ g/ml sCD27L                   |                                    |   |  | 72,4                                    | 10 535  | 22,5   |
| 4                 | 100ng/ml IL-4<br>70ng/ml IFN- $\gamma$<br>70ng/ml $\alpha$ -CD3 mAb<br>1 $\mu$ g/ml $\alpha$ -SLAM mAb       |                                    |   | 1 $\mu$ g/ml $\alpha$ -CD3 mAb<br>100ng/ml IL-15 | 69,6                                    | 9 566   | 25,4   |
| 5                 | 100ng/ml IL-4<br>70ng/ml IFN- $\gamma$<br>70ng/ml $\alpha$ -CD3 mAb<br>1 $\mu$ g/ml sCD7L                    |                                    |   |  | 70,7                                    | 7 764   | 24,5   |
| 6                 | 100ng/ml IL-4<br>70ng/ml IFN- $\gamma$<br>70ng/ml $\alpha$ -CD3 mAb  |                                    |   |  | 72,8                                    | 5 594   | 21,4   |

10 **Caracterización *in vitro* de células T TCR $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup> expandidas a gran escala.**

Habiendo establecido un protocolo efectivo para el aislamiento y la expansión de las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> en cultivo, buscamos probarlo con las muestras de sangre recolectadas de un número mayor de donantes sanos y también de pacientes con cáncer. Esto fue necesario para probar la solidez y la aplicabilidad general del nuevo procedimiento de cultivo. Además, en lugar de placas o matraces de plástico, las células se cultivaron en bolsas de células cerradas, a gran escala, permeables a los gases, desarrolladas para aplicaciones clínicas.

15

El procedimiento de dos etapas adoptado, de clasificación de células asociadas magnéticamente (MACS) produjo poblaciones celulares viables y enriquecidas en células T TCR $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup> de 8 donantes diferentes (**Tabla 6**). Las células T TCR $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup> V $\delta$ 1<sup>+</sup> comprendían solo alrededor del 1 % al 44 % de las células viables totales inicialmente presentes después de la MACS. Sin embargo, dentro de los 11 a 21 días de tratamiento siguiendo el procedimiento de cultivo optimizado de 2 etapas y en presencia del cóctel descrito de citocinas y mitógeno de células T, células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> se convirtieron en el subconjunto celular dominante en el cultivo, variando entre el 60 y el 80 % del total de células entre los donantes (**Figura**

20

6). Cabe señalar que se logró una expansión muy reproducible y la composición del producto celular final fue notablemente similar entre múltiples donantes (**Figura 6, Tabla 7**). Es importante destacar que se descubrió que las células T TCR $\gamma\delta^+$  no V $\delta 1^+$  en los productos finales fueron mayoritariamente células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 1^-$  V $\delta 2^-$  (lo que comprendió alrededor del 17 % al 37 % de las células totales). Estas células probablemente consistían en células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 3^+$ , dado que es el tercer subconjunto de células T TCR $\gamma\delta^+$  más abundante en la sangre periférica. Se logró calcular el porcentaje de células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 1^-$  V $\delta 2^-$  en los productos celulares finales mediante la sustracción del porcentaje de células T V $\delta 1^+$  y células T V $\delta 2^+$  del porcentaje de células T TCR $\gamma\delta^+$  totales (**Tabla 7**). Las expansiones en cantidad de veces en bolsas de cultivo celular grandes fueron, tal como se esperaba, de menor magnitud que las de las placas, pero aun así generaron números relevantes para la traducción clínica.

La expresión de los receptores de activación de citotoxicidad natural (NCR; incluyendo NKp30 y NKp44), y NKG2D se indujo de manera sólida en células T V $\delta 1^+$  cultivadas a largo plazo, de todos los donantes probados (**Tabla 8 y Figura 7**). Las células T TCR $\gamma\delta^+$  obtenidas (que incluían los subconjuntos de células tanto V $\delta 1^+$  como V $\delta 1^-$ V $\delta 2^-$ ) eran altamente citotóxicas contra las células LLC (tanto la línea celular MEC-1 como las muestras de pacientes con LLC primaria), pero no se dirigían a las PBMC autólogas sanas (**Figura 8A y Figura 8C**). Los experimentos preliminares con el uso de anticuerpos bloqueantes contra los receptores de activación de células T TCR $\gamma\delta^+$  mostraron que la citotoxicidad antitumoral se basó parcialmente en los receptores NKG2D y NKp30 (**Figura 8B**). Además, las células T TCR $\gamma\delta^+$  expandidas y diferenciadas produjeron altos niveles de la citocina proinflamatoria IFN- $\gamma$  (**Figura 9**).

Finalmente, las células T TCR $\gamma\delta^+$  V $\delta 2^-$  pudieron aislarse eficientemente y expandirse a partir de los PBL de pacientes LLC mayores con una carga tumoral muy alta (**Tabla 9, Tabla 10 y Figura 10A**), y exhibieron actividades antitumorales y antivirales potentes (**Figura 10B**). Cabe señalar que las células B leucémicas autólogas contaminantes se eliminaron durante el cultivo *in vitro* de células T TCR $\gamma\delta^+$  (**Tabla 10**).

Esta recolección de datos demuestra plenamente la capacidad única de la invención de generar células T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^-$  funcionales (es decir, de pacientes de cáncer) para la terapia celular adoptiva autóloga o alogénica. El procedimiento es lo suficientemente sólido para enriquecer (> 60 %) y expandir (hasta 2.000 veces) las células T V $\delta 1^+$  de muestras altamente sin purificar obtenidas de pacientes con LLC, diferenciándolas en células T TCR $\gamma\delta^+$  que expresan NKR y que son altamente citotóxicas.

Es importante destacar que las pruebas preliminares también demostraron la reactividad *in vitro* de las células T TCR $\gamma\delta^+$  cultivadas contra las células tumorales de otros orígenes tisulares (**Figura 11**), lo que sugirió que las células T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^-$  expandidas y diferenciadas también se pueden usar para el tratamiento de estas condiciones.

**Tabla 6**

| Linaje celular:<br>Donante | Células B<br>(células CD19 <sup>+</sup><br>CD20 <sup>+</sup> ) | Células NK<br>(células CD56 <sup>+</sup><br>CD3 <sup>-</sup> ) | Células T<br>(células CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>TCR $\alpha\beta^+$<br>(células TCR $\alpha\beta^+$<br>CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>TCR $\gamma\delta^+$<br>(células TCR $\gamma\delta^+$<br>CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>V $\delta 1^+$ (células TCRV $\delta 1^+$<br>CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>V $\delta 2^+$ (células TCRV $\delta 2^+$<br>CD3 <sup>+</sup> ) | Viabilidad celular total<br>(células de azul de tripano <sup>-</sup> ) |
|----------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| A                          | 24,6   | 9,92   | 43,5                                     | 0,01   | 41,9   | 13,5   | 23,6   | 79,4   |
| B                          | 6,69   | 0,07   | 75,0                                     | 0,71   | 63,2   | 21,6   | 30,0   | 80,1   |
| C                          | 1,36   | 0,36   | 95,3                                     | 0,37   | 94,5   | 1,25   | 92,6   | 95,2   |
| D                          | 13,9   | 6,79   | 41,2                                     | 0,76   | 40,2   | 18,3   | 21,5   | 89,1   |
| E                          | 17,0   | 1,84   | 65,8                                     | 2,80   | 59,6   | 17,7   | 40,9   | 89,9   |
| F                          | 0,28   | 8,14   | 91,4                                     | 0,81   | 90,0   | 2,05   | 86,1   | 93,7   |
| G                          | 7,32   | 0,25   | 87,5                                     | 0,58   | 81,8   | 24,0   | 45,0   | 84,0   |
| H                          | 3,51   | 0,10   | 88,8                                     | 0,80   | 84,8   | 44,0   | 27,0   | 86,0   |

**Tabla 7**

| Linaje celular:<br>Donante | Células B<br>(células CD19 <sup>+</sup><br>CD20 <sup>+</sup> ) | Células NK<br>(células CD56 <sup>+</sup><br>CD3 <sup>-</sup> ) | Células T<br>(células CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>TCR $\alpha\beta^+$<br>(células TCR $\alpha\beta^+$<br>CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>TCR $\gamma\delta^+$<br>(células TCR $\gamma\delta^+$<br>CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>V $\delta 1^+$ (células TCRV $\delta 1^+$<br>CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>V $\delta 2^+$ (células TCRV $\delta 2^+$<br>CD3 <sup>+</sup> ) | Viabilidad celular total<br>(células de azul de tripano <sup>-</sup> ) |
|----------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| A                          | 0  | 0,50   | 99,5                                     | 0,01   | 99,3   | 82,6   | 3,9  | 89,0   |
| B                          | 0  | 0,02   | 99,7                                     | 0,06   | 99,5   | 80,8   | 3,7  | 93,3   |
| C                          | 0  | 0,50   | 96,3                                     | 0,03   | 92,8   | 69,9   | 4,2  | 90,3   |
| D                          | 0  | 0,03   | 99,6                                     | 0,02   | 99,1   | 62,2   | 2,3  | 94,5   |

| Linaje celular: | Células B<br>(células CD19 <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup> ) | Células NK<br>(células CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> ) | Células T<br>(células CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>TCRαβ <sup>+</sup><br>(células TCRαβ <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>TCRγδ <sup>+</sup><br>(células TCRγδ <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>Vδ1 <sup>+</sup> (células TCRVδ1 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>Vδ2 <sup>+</sup> (células TCRVδ2 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ) | Viabilidad celular total<br>(células de azul de tripano <sup>-</sup> ) |
|-----------------|---|---|--|---|---|---|---|--|
| Donante         |   |   |  |   |   |   |   |  |
| E               | 0   | 0,11  | 99,5                                     | 0,01  | 99,2  | 63,3  | 3,3   | 95,9   |
| F               | 0   | 0   | 99,9                                     | 0,02  | 98,0  | 73,3  | 4,3   | 93,2   |
| G               | 0   | 0,10  | 99,4                                     | 0,01  | 98,4  | 71,7  | 3,5   | 90,0   |
| H               | 0   | 0,40  | 97,5                                     | 0   | 98,2  | 72,0  | 1,6   | 89,0   |

Tabla 8

| Donante | Receptor de activación | Día 0 | Día 16 | Día 21 |
|---------|------------------------|-------|--------|--------|
| A       | NKp30                  | 0,51  | 66,8   | 65,0   |
|         | NKp44                  | 0,30  | 18,3   | 23,3   |
|         | NKG2D                  | 46,0  | 96,5   | 98,0   |
| B       | NKp30                  | 0,56  | 71,6   | 68,0   |
|         | NKp44                  | 0     | 37,2   | 38,7   |
|         | NKG2D                  | 55,0  | 90,7   | 95,1   |

Tabla 9

| Linaje celular:                   | Células B<br>(células CD19 <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup> ) | Células NK<br>(células CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> ) | Células T<br>(células CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>TCRαβ <sup>+</sup><br>(células TCRαβ <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>TCRγδ <sup>+</sup><br>(células TCRγδ <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>Vδ1 <sup>+</sup><br>(células TCRVδ1 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ) | Viabilidad celular<br>(Células de azul de tripano <sup>-</sup> ) |
|-----------------------------------|---|---|--|---|---|--|--|
| Donante                           |   |   |  |   |   |  |  |
| <b>Antes de la MACS (día 0)</b>   |   |   |  |   |   |  |  |
| LLC-1                             | 63,4  | 1,22  | 30,4                                     | 27,5  | 0,66  | 0,22   | 92,0   |
| LLC-2                             | 85,7  | 0,92  | 8,35                                     | 6,97  | 0,43  | 0,03   | 90,0   |
| LLC-3                             | 90,4  | 0,15  | 3,74                                     | 3,31  | 0,35  | 1,9 × 10 <sup>-3</sup>   | 87,0   |
| <b>Después de la MACS (Día 0)</b> |   |   |  |   |   |  |  |
| LLC-1                             | 38,0  | 0,72  | 37,2                                     | 0,19  | 7,32  | 4,00   | 88,0   |
| LLC-2                             | 35,4  | 0,26  | 61,3                                     | 0,05  | 36,7  | 1,70   | 83,0   |
| LLC-3                             | 57,0  | 0,45  | 39,5                                     | 0,02  | 10,4  | 0,28   | 80,0   |

5

Tabla 10

| Fenotipo celular después del cultivo <i>in vitro</i> (día 21) |   |   |  |   |   |  |  |  |      |
|---|---|---|--|---|---|--|--|--|------|
| Linaje celular:   | Células B<br>(células CD19 <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup> ) | Células NK<br>(células CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> ) | Células T<br>(células CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>TCRαβ <sup>+</sup><br>(células TCRαβ <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>TCRγδ <sup>+</sup><br>(células TCRγδ <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>Vδ1 <sup>+</sup><br>(células TCRVδ1 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ) | Células T<br>NKp30 <sup>+</sup> Vδ1 <sup>+</sup><br>(precontroladas) | Células T<br>NKG2D <sup>+</sup> Vδ1 <sup>+</sup><br>(precontroladas) |      |
| Donante   |   |   |  |   |   |  |  |  |      |
| LLC-1   | 0,04  | 0,11  | 96,8                                     | 0,08  | 94,1  | 60,1   | 23,0   |  | 95,6 |
| LLC-2   | 0,07  | 0,01  | 99,5                                     | 0,02  | 97,4  | 80,0   | 11,0   |  | 98,9 |
| LLC-3   | 0,05  | 0,01  | 99,8                                     | 0,01  | 99,6  | 70,1   | 13,4   |  | 97,2 |

**Estudios *in vivo* de células T TCRγδ<sup>+</sup> expandidas**

- 10 Habiendo desarrollado exitosamente un procedimiento para generar grandes números de células T TCRγδ<sup>+</sup> funcionales, a las que denominamos "células DOT", a continuación, investigamos su alojamiento y su actividad antileucémica *in vivo*. Aprovechamos un modelo de xenoinjerto de LLC humano, que se mostró anteriormente para reproducir varios aspectos de la enfermedad y se usa para probar la eficacia de otras terapias celulares, incluyendo a las células CAR-T.<sup>51, 52</sup> El modelo se basa en la transferencia adoptiva de células MEC-1 derivada de una LLC/un LLP a animales Balb/c Rag<sup>-/-</sup> y c-

<sup>-/-</sup> (BRG), que carecen de todos los linfocitos y, por consiguiente, no rechazan de inmediato las células humanas. Sin embargo, todavía se produce cierto rechazo mediado por el linaje mieloide de los xenoinjertos humanos. Este rechazo varía en su magnitud según la cepa de ratón utilizada, debido a diferentes alelos que codifican SIRP- $\alpha$ <sup>53</sup>. Por consiguiente, hemos adaptado aún más el modelo para caracterizar las células T TCR $\gamma\delta^+$  en puntos de tiempo tardíos después de la transferencia, usando animales NOD-SCID  $\gamma c^{-/-}$  (NSG) como huéspedes. De hecho, tras la transferencia a huéspedes NSG con tumores, pudimos recuperar las células T TCR $\gamma\delta^+$  en todos los tejidos analizados, 30 días después de la transferencia, con un fuerte enriquecimiento de las células T CD3<sup>+</sup>V $\delta$ 1<sup>+</sup> (**Figura 12**). Es importante destacar que detectamos la expresión de NKp30 y NKG2D en las células T TCR $\gamma\delta^+$  recuperadas, lo que demuestra que las mismas preservan sus características de manera estable *in vivo*. Cabe señalar que, tras la transferencia a animales BRG no pudimos recuperar las células T TCR $\gamma\delta^+$  en puntos de tiempo tan tardíos, pero los observamos tanto en el pulmón como en el hígado a las 72 horas después de la transferencia (**Figura 12**). Estos experimentos confirman la mejor aptitud de las células xenoinjertadas humanas en animales NSG, al tiempo que nos permiten tener dos modelos diferentes para probar las propiedades antitumorales de las células T V $\delta$ 2-  $\gamma\delta$  expandidas *in vivo*.

A fin de seguir de manera dinámica el crecimiento tumoral mediante el uso de bioluminiscencia, transducimos células MEC-1 con GFP de luciferasa de luciérnaga y transferimos 10<sup>7</sup> células MEC-1 por vía subcutánea a los animales BRG. Después de 7 días inyectamos luciferina IP para determinar la carga tumoral en función de la luminiscencia, antes de atribuir el tratamiento (o control PBS) a los animales. Realizamos dos transferencias de células T TCR $\gamma\delta^+$  en 5 días. A continuación, medimos el tamaño del tumor en función del tiempo utilizando un calibrador; es importante destacar que detectamos una clara reducción en el tamaño del tumor primario en los animales tratados en comparación con los controles (**Figura 13**). Esta reducción fue significativa 9 días después de la segunda transferencia de células T TCR $\gamma\delta^+$ . Este resultado demostró que las células T TCR $\gamma\delta^+$  son efectivas *in vivo*, incluso cuando se ha excluido una caracterización más abarcativa de sus propiedades antitumorales por la corta vida útil de las células humanas en los huéspedes BRG. Para superar esta limitación, a continuación, realizamos un experimento similar utilizando animales NSG como huéspedes.

El crecimiento de progresión tumoral fue más rápido en los huéspedes NSG, lo que aparentemente impidió que las células T TCR $\gamma\delta^+$  interfirieran con el crecimiento tumoral primario (**Figura 14**). Sin embargo, en este modelo, el tumor se disemina a varios órganos en puntos de tiempo tardíos y descubrimos que las células T TCR $\gamma\delta^+$  eran sorprendentemente capaces de limitar la propagación del tumor según lo documentado mediante la citometría de flujo y el análisis histológico de una matriz de tejidos (**Figura 14B-D**). Esto incluyó sitios de diseminación como la médula ósea y el hígado. Los datos obtenidos en los dos modelos de xenoinjerto de manera colectiva muestran la eficacia *in vivo* de las células T TCR $\gamma\delta^+$  para reducir el tamaño de un tumor primario (en huéspedes BRG; **Figura 13**) y para controlar la diseminación tumoral hacia órganos diana (en huéspedes NSG; **Figura 14**).

El examen de la progenie de las células T TCR $\gamma\delta^+$  al final del experimento en el modelo NSG confirmó una sólida infiltración en el tejido tumoral (**Figura 15A**); y la expresión estable de NKp30 y NKG2D en las células T TCR $\gamma\delta^+$  (**Figura 15B**). Curiosamente, detectamos una alta expresión del marcador de activación temprana CD69 específicamente en células T TCR $\gamma\delta^+$  que infiltran los tumores, lo que sugirió una activación óptima de las células T TCR $\gamma\delta^+$  dentro del tumor (**Figura 15B**). Es importante destacar que no observamos ninguna toxicidad asociada al tratamiento en los análisis histológicos (de múltiples órganos); o análisis bioquímico de sangre recolectada en el momento de la necropsia (**Figura 16**).

De manera colectiva, estos datos *in vivo* proporcionan una gran confianza en la seguridad y la eficacia de las células T TCR $\gamma\delta^+$  generadas para el tratamiento de la LLC, inspirando, por consiguiente, su aplicación clínica.

**En conclusión**, hemos desarrollado un procedimiento nuevo y sólido (altamente reproducible) de grado clínico, desprovisto de células alimentadoras, para la expansión y diferenciación selectiva y a gran escala de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>-</sup> citotóxicas; y probamos su potencial terapéutico en modelos preclínicos de leucemia linfocítica crónica (LLC). Nuestro producto celular, llamado células DOT, no involucra ninguna manipulación genética; y está dirigido específicamente a células leucémicas, pero no a células sanas, *in vitro*; e impide la diseminación tumoral a amplia escala hacia los órganos periféricos *in vivo*, sin ningún signo de daño al tejido sano. Nuestros resultados proporcionan nuevos medios y la prueba de principio para la aplicación clínica de las células DOT en la inmunoterapia adoptiva del cáncer.

## 55 Dato complementario

La siguiente sección divulga datos adicionales generados con el uso de la invención descrita anteriormente. Los datos contenidos en esta invención confirmaron los resultados anteriores y ampliaron las observaciones anteriores y deben usarse como información de apoyo para una mejor comprensión del tema.

Como se explicó anteriormente, la combinación de interleucina-2 (IL-2) e interleucina-4 (IL-4) se utilizó con algo de éxito para expandir las células T V $\delta$ 1<sup>+</sup> *in vitro*. Sin embargo, descubrimos que la presencia de IL-4 en el medio de cultivo inducía una fuerte regulación a la baja de los receptores de activación de asesinas naturales (NK) (como NKG2D, NKp30 y NKp44) en las células T TCR $\gamma\delta^+$ , debilitando sus respuestas antitumorales.

Nuestros resultados anteriores de los experimentos 1-4 se presentan nuevamente aquí con más detalles (véase la **Tabla**

11). Se muestran resultados adicionales obtenidos en condiciones de cultivo en paralelo (marcados con un asterisco), para una comprensión más completa de los resultados. En esta invención también se describe el porcentaje de células T NKp30<sup>+</sup>Vδ1<sup>+</sup> observado después del cultivo celular con cada condición. La regulación a la baja observada de la expresión de NKp30 en células cultivadas confirmó además que los potentes efectos inhibidores de la IL-4 en células T γδ Vδ2<sup>-</sup> también ocurrieron cuando la IL-2 estaba presente en el medio de cultivo (es decir, cuando el medio de cultivo contenía tanto IL-2 como IL-4). Estos datos confirmaron que los efectos inhibitorios de IL-4 son dominantes sobre los efectos de activación de IL-2 en cultivos de células T TCRγδ<sup>+</sup> y destacó la importancia de eliminar la IL-4 en la segunda etapa de cultivo.

Como se explicó anteriormente, si bien muchas concentraciones y combinaciones diferentes de IL-2, IL-7 e IL-15 se probaron en paralelo, se descubrió de manera consistente que el IFN-γ es un reactivo mucho más efectivo para promover la expansión selectiva de las células T Vδ1<sup>+</sup> en cultivo (cuando se usa en presencia de IL-4 y un mitógeno de células T, tal como el mAb anti-CD3). Como se sugirió anteriormente (pero no se demostró formalmente), el uso de IFN-γ solo fue más efectivo (en la promoción de la expansión celular en cultivo), que la combinación de IFN-γ con IL-2, IL-7 o IL-15, o que la combinación de IL-2 con IL-15 o IL-7 (**Tabla 12**). Estos datos confirmaron que la IL-15, la IL-2 y la IL-7 tienen un efecto perjudicial sobre la expansión de las células T TCRγδ<sup>+</sup>, cuando las células se cultivan en presencia de IL-4 e IFN-γ.

Como se explicó anteriormente, tal como se esperaba, las expansiones en cantidad de veces en bolsas de cultivo celular grandes fueron de menor magnitud que las de las placas de 96 pocillos, pero aun así generaron números relevantes para la traducción clínica. Los números totales absolutos de células obtenidos después del cultivo celular a gran escala en bolsas de células de grado clínico ahora se detallan en la **Tabla 13**.

Como se explicó anteriormente, el protocolo de cultivo celular obtenido con el procedimiento descrito anteriormente es adecuado para su uso en aplicaciones clínicas. De hecho, varios materiales y reactivos han sido aprobados por al menos una agencia reguladora (como la Agencia Europea de Medicamentos o la Administración de Alimentos y Medicamentos) para su uso en aplicaciones clínicas. La lista completa se detalla en la **Tabla 14**.

Como se describió anteriormente, el procedimiento de 2 etapas de aislamiento celular propuesto por la invención descrita genera muestras de células enriquecidas en células T TCRγδ<sup>+</sup> que son viables y se pueden cultivar adicionalmente. La **Figura 17** muestra con más detalle los gráficos FACS del enriquecimiento de los PBL TCRγδ<sup>+</sup> después de la clasificación MACS de dos etapas.

Como se explicó anteriormente, se logró una expansión muy reproducible con el procedimiento de cultivo de la presente invención, y la composición del producto celular final fue notablemente similar entre múltiples donantes.

Para una caracterización más completa de las células obtenidas con la innovación del procedimiento y el producto celular resultante, realizamos un fenotipado de amplio espectro de 332 marcadores de superficie celular diferentes (**Figura 18**). Las células T Vδ1<sup>+</sup> se compararon al inicio (día 0) y al final (día 21) del procedimiento de cultivo celular. Observamos una marcada regulación al alza de los marcadores de activación CD69 y CD25 y HLA-DR, así como de los receptores coestimuladores CD27, CD134/OX-40 y CD150/SLAM, indicadores de potencial proliferativo mejorado de células T Vδ1<sup>+</sup> generadas *in vitro* (en comparación con las contrapartidas de células T Vδ1<sup>+</sup> de línea de base. Además, las células T Vδ1<sup>+</sup> expandidas aumentaron la expresión de los receptores de citotoxicidad/activación asociados a las células NK, es decir, NKp30, NKp44, NKG2D, DNAM-1 y 2B4, todas las cuales habían demostrado anteriormente ser importantes en la selección de células tumorales. Por el contrario, las moléculas inhibitorias clave y asociadas con el agotamiento, como PD-1, CTLA-4 o CD94, se expresaron en niveles muy bajos o no se expresaron en absoluto, lo que demuestra una sorprendente "aptitud" de las células T TCRγδ<sup>+</sup> expandidas y diferenciadas incluso después de 21 días de cultivo en condiciones de estimulación. En particular, la regulación positiva de múltiples moléculas involucradas en la adhesión celular (por ejemplo, CD56, CD96, CD172a/SIRPα, Integrina-β7 e ICAM-1) y receptores de quimiocinas (CD183/CXCR3, CD196/CCR6, y CX3CR1) sugirió un alto potencial para migrar y recircular entre la sangre y los tejidos. Cabe señalar que la IL-18Rα y el Notch1, que se sabe que promueven respuestas de tipo 1 (productoras de interferón-γ), también fueron altamente expresados por las células T TCRγδ<sup>+</sup> expandidas y diferenciadas. Es importante destacar que, en apoyo a la solidez de nuestro procedimiento, descubrimos fenotipos celulares sorprendentemente similares en los 4 donantes probados, como se ilustra en el mapa de calor (**Figura 18B**). Estos datos caracterizan colectivamente células T TCRγδ<sup>+</sup> expandidas y diferenciadas como un producto celular altamente reproducible de linfocitos activados (no agotados) dotados de potencial migratorio y maquinaria natural de citotoxicidad.

Como se explicó anteriormente, los experimentos preliminares con el uso de anticuerpos bloqueantes contra receptores de activación expresados en células T TCRγδ<sup>+</sup> mostraron que la citotoxicidad antitumoral se basó parcialmente en los receptores NKG2D y NKp30 expresados por las células T TCRγδ<sup>+</sup> expandidas. Experimentos adicionales presentados en esta invención también revelaron un papel para el γδTCR en el reconocimiento de células tumorales (**Figura 19**).

Como se explicó anteriormente, la expresión de los receptores de activación de citotoxicidad natural (NCR, incluyendo NKp30 y NKp44) y NKG2D se indujo de manera sólida en cultivos de células T Vδ1<sup>+</sup> en cultivo a largo plazo. Aquí mostramos que se observó el mismo efecto en el subconjunto de células Vδ1<sup>+</sup>Vδ2<sup>-</sup>. Cuando aplicamos un control (en el análisis del gráfico FACS) al subconjunto celular de CD3<sup>+</sup>Vδ1<sup>+</sup>Vδ2<sup>-</sup> en los mismos cultivos, observamos que estas células

- 5 expresaban alrededor de los mismos niveles de NCR que las células Vδ1<sup>+</sup> expandidas y diferenciadas (**Figura 20**). Estos datos confirmaron además que el protocolo de 2 etapas descrito en la presente invención puede expandir y diferenciar subconjuntos de células T TCRγδ<sup>+</sup> tanto Vδ1<sup>+</sup> como Vδ1<sup>-</sup> y Vδ2<sup>-</sup>. En la primera etapa de cultivo, en presencia de un mitógeno de células T e IL-4 (y en ausencia de IL-15, IL-2 o IL-7), los subconjuntos de células T TCRγδ<sup>+</sup> tanto Vδ1<sup>+</sup> como Vδ1<sup>-</sup> y Vδ2<sup>-</sup> se expandieron en cultivo, pero no pudieron diferenciarse hacia un fenotipo citotóxico. Cuando las células obtenidas se subcultivaron en un segundo medio de cultivo en presencia de un mitógeno de células T e IL-2, IL-7 o IL-15 (y en ausencia de IL-4), ambos subconjuntos de células se diferenciaron expresando altos niveles de receptores de activación NK que, a su vez, mediaron en la muerte de las células tumorales.
- 10 Como se explicó anteriormente, las células Vδ1<sup>+</sup> expandidas y diferenciadas, obtenidas con el procedimiento de la presente invención fueron altamente citotóxicas contra las células de leucemia *in vitro*. Aquí mostramos con más detalle que el subconjunto de células Vδ1<sup>+</sup>Vδ2<sup>-</sup> expandido y diferenciado también es altamente citotóxico contra dianas tumorales. Clasificamos células CD3<sup>+</sup>Vδ1<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>Vδ1<sup>-</sup>Vδ2<sup>-</sup> de las mismas muestras celulares cultivadas mediante citometría de flujo y cultivamos conjuntamente cada conjunto con células tumorales diana, *in vitro*. Observamos que ambos subconjuntos
- 15 podrían eliminar de manera eficiente las células diana. (**Figura 21**).

**Tabla 11**

| Exp. | Cond. No. | Condición:  |   | Células T Vδ1 <sup>+</sup> | Aumento en cantidad de veces de las células T Vδ1 <sup>+</sup> | Células T NKp30+ Vδ1 <sup>+</sup> |
|------|-----------|---|---|----------------------------|--|-----------------------------------|
|      |           | (cultivadas en 1 millón de células/ml durante 14 días en placas de 96 pocillos) |   |                            |  |                                   |
| 1    | 1         | 20 ng/ml de   | IL-2 + 1 µg/ml de PHA + 20 ng/ml de IL-4                        | 31,6                       | 77   | 0,5                               |
|      | 2*        | 20 ng/ml de   | IL-2 + 1 µg/ml de mAb TCR α-Vδ1                                 | 4,7                        | 8  | 6,2                               |
|      | 3         | 500 ng/ml de  | IL-2 + 1 µg/ml de PHA   | 10,5                       | 4  | 13,4                              |
|      | 4*        | 20 ng/ml de   | IL-2 + 1 µg/ml de mAb α-CD3                                     | 5,3                        | 2  | 9,1                               |
|      | 5         | 20 ng/ml de   | IL-2 + 1 µg/ml de PHA (control)                                 | 1,9                        | 1  | 10,6                              |
| 2    | 1         | 20 ng/ml de   | IL-2 + 1 µg/ml de mAb α-CD3 + 20 ng/ml de IL-4                  | 51,7                       | 75   | 0,0                               |
|      | 2         | 20 ng/ml de   | IL-2 + 1 µg/ml de mAb TCR α-Vδ1 + 20 ng/ml de IL-4              | 55,9                       | 69   | 0,2                               |
|      | 3         | 5 ng/ml de  | IL-2 + 1 µg/ml de PHA + 20 ng/ml de IL-4                        | 61,9                       | 62   | 0,0                               |
|      | 4*        |   | 1 µg/ml de PHA + 20 ng/ml de IL-4                               | 79,6                       | 38   | 0,3                               |
|      | 5         | 20 ng/ml de   | IL-2 + 1 µg/ml de PHA + 20 ng/ml de IL-4 (mejor anterior)       | 45,3                       | 27   | 0,2                               |
|      | 6         | 100 ng/ml de  | IL-2 + 1 µg/ml de PHA + 20 ng/ml de IL-4                        | 55,7                       | 22   | 0,4                               |
|      | 7         | 300 ng/ml de  | IL-2 + 1 µg/ml de PHA + 20 ng/ml de IL-4                        | 57,0                       | 21   | 1,6                               |
|      | 8*        | 20 ng/ml de   | IL-2 + 20 ng/ml de IL-4   | 2,4                        | 2  | 0,0                               |
| 3    | 1         | 5 ng/ml de  | IL-15 + 1 µg/ml de mAb α-CD3 + 20 ng/ml de IL-4                 | 61,4                       | 138  | 0,3                               |
|      | 2         | 5 ng/ml de  | IL-2 + 1 µg/ml de mAb α-CD3 + 20 ng/ml de IL-4                  | 59,4                       | 124  | 1,2                               |
|      | 3         | 20 ng/ml de   | IL-2 + 1 µg/ml de mAb α-CD3 + 20 ng/ml de IL-4 (mejor anterior) | 45,4                       | 105  | 1,0                               |
|      | 4         | 5 ng/ml de  | IL-15 + 1 µg/ml de PHA + 20 ng/ml de IL-4                       | 76,2                       | 21   | 1,2                               |
|      | 5         | 5 ng/ml de  | IL-2 + 1 µg/ml de PHA + 20 ng/ml de IL-4                        | 69,1                       | 19   | 1,6                               |
|      | 6         | 20 ng/ml de   | IL-15 + 1 µg/ml de PHA + 20 ng/ml de IL-4                       | 69,9                       | 13   | 1,3                               |
|      | 7         | 20 ng/ml de   | IL-2 + 1 µg/ml de PHA + 20                                      | 67,7                       | 11   | 1,0                               |

| Exp. | Cond. No. | Condición:  |  | Células T Vδ1+ | Aumento en cantidad de veces de las células T Vδ1+ | Células T NKp30+ Vδ1+ |
|------|-----------|---|--|----------------|--|-----------------------|
|      |           | (cultivadas en 1 millón de células/ml durante 14 días en placas de 96 pocillos) |  |                |  |                       |
|      |           |   | ng/ml de <b>IL-4</b>   |                |  |                       |
| 4    | 1         | 20 ng/ml de   | <b>IFN-γ</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>                           | 79,5           | 1 349  | 0,8                   |
|      | 2         | 3 ng/ml de  | <b>IFN-γ</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>                           | 67,4           | 1 014  | 0,4                   |
|      | 3         | 2 ng/ml de  | <b>IL-15</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b>                           | 81,6           | 909  | 1,8                   |
|      | 4         | 5 ng/ml de  | <b>IL-15</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 20 ng/ml de <b>IL-4</b> ( <i>mejor anterior</i> ) | 69,4           | 624  | 1,9                   |

**Tabla 12**

| Cond. No. | Condición:  |   | Células vivas totales | Células Vδ1+ (%) | Aumento en cantidad de veces de las células T Vδ1+ |
|-----------|---|---|-----------------------|------------------|--|
|           | (cultivadas en 1 millón de células/ml durante 14 días en placas de 96 pocillos) |   |                       |                  |  |
| 1         | 20 ng/ml de   | <b>IFN-γ</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 100 ng/ml de <b>IL-4</b>                             | 85,9                  | 80,1             | 12 166   |
| 2         | 7 ng/ml de  | <b>IFN-γ</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 100 ng/ml de <b>IL-4</b>                             | 89,9                  | 93,0             | 10 757   |
| 3         | 2 ng/ml de  | <b>IFN-γ</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 100 ng/ml de <b>IL-4</b>                             | 87,3                  | 75,2             | 9 394  |
| 4         | 0,3 ng/ml de  | <b>IL-15</b> + 2 ng/ml de <b>IFN-γ</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 100 ng/ml de <b>IL-4</b>   | 77,1                  | 59,7             | 4 361  |
| 5         | 0,3 ng/ml de  | <b>IL-15</b> + 2 ng/ml de <b>IFN-γ</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 100 ng/ml de <b>IL-4</b>   | 90,0                  | 67,0             | 811  |
| 6         | 0,3 ng/ml de  | <b>IL-15</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 100 ng/ml de <b>IL-4</b>                             | 89,7                  | 75,5             | 614  |
| 7         | 7 ng/ml de  | <b>IFN-γ</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 60 ng/ml de <b>IL-4</b>                              | 85,7                  | 83,2             | 10 083   |
| 8         | 2 ng/ml de  | <b>IL-2</b> + 2 ng/ml de <b>IL-15</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 60 ng/ml de <b>IL-4</b>     | 87,5                  | 59,4             | 7 208  |
| 9         | 2 ng/ml de  | <b>IL-2</b> + 7 ng/ml de <b>IFN-γ</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 60 ng/ml de <b>IL-4</b>     | 80,4                  | 71,6             | 7 151  |
| 10        | 7 ng/ml de  | <b>IL-7</b> + 2 ng/ml de <b>IL-15</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 60 ng/ml de <b>IL-4</b>     | 91,1                  | 65,6             | 6 193  |
| 11        | 2 ng/ml de  | <b>IL-2</b> + 1 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 60 ng/ml de <b>IL-4</b>                               | 88,7                  | 70,5             | 5 192  |
| 12        | 1 μg/ml de  | <b>mAb α-CD3</b> + 60 ng/ml de <b>IL-4</b>  | 89,0                  | 68,3             | 1 890  |
| 13        | 0,3 ng/ml de  | <b>IFN-γ</b> + 2 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 100 ng/ml de <b>IL-4</b>                             | 82,7                  | 59,9             | 6 139  |
| 14        | 2 ng/ml de  | <b>IL-7</b> + 0,3 ng/ml de <b>IFN-γ</b> + 2 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 100 ng/ml de <b>IL-4</b>  | 87,6                  | 72,9             | 5 290  |
| 15        | 0,3 ng/ml de  | <b>IL-15</b> + 0,3 ng/ml de <b>IFN-γ</b> + 2 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 100 ng/ml de <b>IL-4</b> | 85,9                  | 80,1             | 4 840  |
| 16        | 0,3 ng/ml de  | <b>IL-15</b> + 2 μg/ml de <b>mAb α-CD3</b> + 100 ng/ml de <b>IL-4</b>                             | 90,0                  | 64,2             | 2 943  |
| 17        | 2 μg/ml de  | <b>mAb α-CD3</b> + 100 ng/ml de <b>IL-4</b>   | 85,8                  | 73,0             | 1 826  |

Tabla 13

| Total de células vivas generadas a partir de 1 conjunto de capa leucocitaria:<br>(millones de células) |       |         |
|--|-------|---------|
| Donante:   | Día 0 | Día 21  |
| A  | 2,4   | 968,0   |
| B  | 4,8   | 1 004,0 |
| C  | 83,3  | 440,0   |
| D  | 5,7   | 1 152,0 |
| E  | 9,2   | 1 024,0 |
| F  | 25,0  | 1 564,0 |
| G  | 4,0   | 1 604,0 |
| H  | 2,0   | 1 276,0 |

Tabla 14

| Reactivo/material   | Fabricante        | Referencia producto | del         | Sistema de calidad de fabricación*                    |
|---|-------------------|---------------------|-------------|---|
| <b>Para el agotamiento magnético de células TCR<math>\alpha</math>/<math>\beta</math><sup>+</sup>:</b>  |                   |                     |             |   |
| Instrumento CliniMACS <sup>®</sup> Plus   | Miltenyi GmbH     | Biotec,             | 151-01      | cGMP, cumple con la ISO 13485                         |
| Kit CliniMACS <sup>®</sup> TCR $\alpha$ / $\beta$   |                   |                     | 200-070-407 |   |
| Juego de tubos de agotamiento CliniMACS <sup>®</sup>  |                   |                     | 261-01      |   |
| Tampón de PBS/EDTA CliniMACS <sup>®</sup>   |                   |                     | 700-25      |   |
| <b>Para el enriquecimiento magnético de las células CD3<sup>+</sup>:</b>  |                   |                     |             |   |
| Reactivo de CD3 CliniMACS <sup>®</sup>  | Miltenyi GmbH     | Biotec,             | 273-01      | cGMP, ISO 13485                                       |
| Juego de tubos TS CliniMACS <sup>®</sup>  |                   |                     | 161-01      | cumple  |
| <b>Para el cultivo celular:</b>   |                   |                     |             |   |
| Cassettes de cultivo celular  | Saint-Gobain      |                     | CC-0500     | cGMP, cumple con la norma 21 CFR 820                  |
| Abrazaderas   | Saint-Gobain      |                     | 1C-0022     |   |
| Bolsa FEP de cultivo celular VueLife <sup>®</sup>   | Saint-Gobain      |                     | 750-C1      |   |
| Medio de expansión de células T OpTmizer <sup>™</sup>   | Thermo Scientific | Fisher              | A10485-01   | cGMP, cumple con la ISO 13485:2003 o la ISO 9001:2008 |
| L-glutamina   | Thermo Scientific | Fisher              | 25030-032   |   |
| mAb anti-CD3 humano (Clon OKT-3)  | Miltenyi GmbH     | Biotec,             | 170-076-116 |   |
| IL-4 humana recombinante  | CellGenix GmbH    |                     | 1003-050    |   |
| IL-21 humana recombinante   | CellGenix GmbH    |                     | 1019-050    |   |
| IFN- $\gamma$ humano recombinante   | R&D Systems       |                     | 285-GMP     |   |
| IL-1 $\beta$ humana recombinante  | CellGenix GmbH    |                     | 1011-050    |   |
| IL-15 humana recombinante   | CellGenix GmbH    |                     | 1013-050    |   |
| *Nota: Algunos productos se venden como dispositivos médicos certificados para su uso en la UE y/o los EE. UU. Todos los demás productos se venden para la fabricación de productos basados en células para investigación clínica. Se pueden usar en ensayos clínicos bajo aplicaciones de investigación de nuevos medicamentos (IND) o de investigación de dispositivos (IDE). |                   |                     |             |   |

## CITAS COMPLETAS PARA LAS REFERENCIAS MENCIONADAS EN LA MEMORIA DESCRIPTIVA

5

1. Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* 2009; 31(2): 184-96.
2. Pang D.J., Neves J.F., Sumaria N., Pennington D.J. Understanding the complexity of gammadelta T-cell subsets in

mouse and human. *Immunology* 2012; 136(3): 283-90.

3. Deniger D.C., Maiti S., Mi T., y col. Activating and propagating polyclonal gamma delta T cells with broad specificity for malignancies. *Clin Cancer Res* 2014.

4. Halary F., Pitard V., Dlubek D., y col. Shared reactivity of V $\delta$ 2(neg)  $\gamma\delta$  T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2005; 201(10): 1567-78.

5. Bennouna J., Bompas E., Neidhardt E.M. y col. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma $\delta$ 2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57(11): 1599-609.

6. Fisher J.P., Heuierjans J., Yan M., Gustafsson K., Anderson J. gammadelta T cells for cancer immunotherapy: A systematic review of clinical trials. *Oncoimmunology* 2014; 3(1): e27572.

7. Dieli F., Vermijlen D., Fulfaro F. y col. Targeting human  $\gamma\delta$  T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67(15): 7450-7.

8. Gomes A.Q., Martins D.S., Silva-Santos B. Targeting gammadelta T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application. *Cancer Res* 2010; 70(24): 10024-7.

9. Zocchi M.R., Ferrarini M., Migone N., Casorati G. T-cell receptor V. delta gene usage by tumour reactive gamma delta T lymphocytes infiltrating human lung cancer. *Immunology* 1994; 81(2): 234-9.

10. Maeurer M.J., Martin D., Walter W. y col. Human intestinal Vdelta1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin. *J Exp Med* 1996; 183(4): 1681-96.

11. Choudhary A., Davodeau F., Moreau A., Peyrat M.A., Bonneville M., Jotereau F. Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *J Immunol* 1995; 154(8): 3932-40.

12. Cordova A., Toia F., La Mendola C. y col. Characterization of human gammadelta T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas. *PLoS One* 2012; 7(11): e49878.

13. Donia M., Ellebaek E., Andersen M.H., Straten P.T., Svane I.M. Analysis of Vdelta T cells in clinical grade melanoma-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology* 2012; 1(8): 1297-304.

14. Godder K.T., Henslee-Downey P.J., Mehta J. y col. Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39(12): 751-7.

15. Lamb L.S., Jr., Henslee-Downey P.J., Parrish R.S. y col. Increased frequency of TCR gamma delta + T cells in disease-free survivors following T cell-depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia. *J Hematother* 1996; 5(5): 503-9.

16. Catellani S., Poggi A., Bruzzone A., y col. Expansion of Vdelta T lymphocytes producing IL-4 in low-grade non-Hodgkin lymphomas expressing UL-16-binding proteins. *Blood* 2007; 109(5): 2078-85.

17. Bartkowiak J., Kulczyk-Wojdala D., Blonski J.Z., Robak T. Molecular diversity of gammadelta T cells in peripheral blood from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Neoplasma* 2002; 49(2): 86-90.

18. Poggi A., Venturino C., Catellani S., y col. Vdelta T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid. *Cancer Res* 2004; 64(24): 9172-9.

19. De Maria A., Ferrazin A., Ferrini S., Ciccone E., Terragna A., Moretta L. Selective increase of a subset of T cell receptor gamma delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *The Journal of infectious diseases* 1992; 165(5): 917-9.

20. Hviid L., Kurtzhals J.A., Adabayeri V. y col. Perturbation and proinflammatory type activation of V delta 1(+) gamma delta T cells in African children with Plasmodium falciparum malaria. *Infection and immunity* 2001; 69(5): 3190-6.

21. Dechanet J., Merville P., Lim A. y col. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest* 1999; 103(10): 1437-49.

22. Siegers G.M., Lamb L.S., Jr. Cytotoxic and regulatory properties of circulating Vdelta1+ gammadelta T cells: a new player on the cell therapy field? *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2014; 22(8): 1416-22.

23. Meeh P.F., King M., O'Brien R.L. y col. Characterization of the gammadelta T cell response to acute leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55(9): 1072-80.

24. Knight A., Mackinnon S., Lowdell M.W. Human Vdelta1 gamma-delta T cells exert potent specific cytotoxicity against primary multiple myeloma cells. *Cytotherapy* 2012.

25. Merims S., Dokouhaki P., Joe B., Zhang L. Human Vdelta1-T cells regulate immune responses by targeting autologous immature dendritic cells. *Hum Immunol* 2011; 72(1): 32-6.

26. Wu D., Wu P., Wu X. y col. expanded human circulating Vdelta1 gammadeltaT cells exhibit favorable therapeutic potential for colon cancer. *Oncoimmunology* 2015; 4(3): e992749.

27. Siegers G.M., Dhamko H., Wang X.H. y col. Human Vdelta1 gammadelta T cells expanded from peripheral blood exhibit specific cytotoxicity against B-cell chronic lymphocytic leukemia-derived cells. *Cytotherapy* 2011; 13(6): 753-64.

28. Siegers G.M., Ribot E.J., Keating A., Foster P.J. Extensive expansion of primary human gamma delta T cells generates cytotoxic effector memory cells that can be labeled with Feraheme for cellular MRI. *Cancer Immunol Immunother* 2012.

29. Correia D.V., Fogli M., Hudspeth K., da Silva M.G., Mavilio D., Silva-Santos B. Differentiation of human peripheral blood Vdelta1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. *Blood* 2011; 118(4): 992-1001.

30. Mangan B.A., Dunne M.R., O'Reilly V.P. y col. Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human Vdelta3 T cells. *J Immunol* 2013; 191(1): 30-4.

31. Kabelitz D., Hinz T., Dobmeyer T. y col. Clonal expansion of Vgamma3/Vdelta3-expressing gammadelta T cells in

- an HIV-1/2-negative patient with CD4 T-cell deficiency. *Br J Haematol* 1997; 96(2): 266-71.
32. Kenna T., Golden-Mason L., Norris S., Hegarty J.E., O'Farrelly C., Doherty D.G. Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. *Clin Immunol* 2004; 113(1): 56-63.
- 5 33. Zhou J., Kang N., Cui L., Ba D., He W. Anti-gammadelta TCR antibody-expanded gammadelta T cells: a better choice for the adoptive immunotherapy of lymphoid malignancies. *Cellular & molecular immunology* 2012; 9(1): 34-44.
34. Lopez R.D., Xu S., Guo B., Negrin R.S., Waller E.K. CD2-mediated IL-12-dependent signals render human gamma delta-T cells resistant to mitogen-induced apoptosis, permitting the large-scale ex vivo expansion of functionally distinct lymphocytes: implications for the development of adoptive immunotherapy strategies. *Blood* 2000; 96(12): 3827-37.
- 10 35. Fisher J.P., Yan M., Heuvelink J., y col. Neuroblastoma killing properties of Vdelta2 and Vdelta2-negative gammadeltaT cells following expansion by artificial antigen-presenting cells. *Clin Cancer Res* 2014; 20(22): 5720-32.
36. Fisher J., Kramer A.M., Gustafsson K., Anderson J. Non-V delta 2 gamma delta T lymphocytes as effectors of cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2015; 4(3): e973808.
37. Deniger D.C., Maiti S.N., Mi T. y col. Activating and propagating polyclonal gamma delta T cells with broad specificity for malignancies. *Clin Cancer Res* 2014; 20(22): 5708-19.
- 15 38. Siegers G.M., Felizardo T.C., Mathieson A.M. y col. Anti-leukemia activity of in vitro-expanded human gamma delta T cells in a xenogeneic Ph+ leukemia model. *PLoS One* 2011; 6(2): e16700.
39. Wilhelm M., Kunzmann V., Eckstein S. y col. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003; 102(1): 200-6.
- 20 40. von Lilienfeld-Toal M., Nattermann J., Feldmann G., y col. Activated gammadelta T cells express the natural cytotoxicity receptor natural killer p 44 and show cytotoxic activity against myeloma cells. *Clin Exp Immunol* 2006; 144(3): 528-33.
41. Deniger D.C., Moyes J.S., Cooper U. Clinical applications of gamma delta T cells with multivalent immunity. *Front Immunol* 2014; 5: 636.
- 25 42. Mao Y., Yin S., Zhang J. y col. A new effect of IL-4 on human gammadelta T cells: promoting regulatory Vdelta1 T cells via IL-10 production and inhibiting function of Vdelta2 T cells. *Cellular & molecular immunology* 2015.
43. Silva-Santos B., Serre K., Norell H. gammadelta T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(11): 683-91.
44. Wu P., Wu D., Ni C. y col. GammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity* 2014; 40(5): 785-800.
- 30 45. Mao Y., Yin S., Zhang J. y col. A new effect of IL-4 on human gammadelta T cells: promoting regulatory Vdelta1 T cells via IL-10 production and inhibiting function of Vdelta2 T cells. *Cellular & molecular immunology* 2016; 13(2): 217-28.
46. Stacchini A., Aragno M., Vallario A. col. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leukemia research* 1999; 23(2): 127-36.
- 35 47. Traggiai E., Chicha L., Mazzucchelli L. y col. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 2004; 304(5667): 104-7.
48. Shultz L.D., Lyons B.L., Burzenski L.M., y col. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 2005; 174(10): 6477-89.
49. Tomayko M.M., Reynolds C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1989; 24(3): 148-54.
- 40 50. Gray P.W., Goeddel D.V. Structure of the human immune interferon gene. *Nature* 1982; 298(5877): 859-63.
51. Bertilaccio M.T., Scielzo C., Simonetti G. y col. A novel Rag2-/-gammac-/-xenograft model of human CLL. *Blood* 2010; 115(8): 1605-9.
52. Giordano Attianese G.M., Marin V., Hoyos V. y col. In vitro and in vivo model of a novel immunotherapy approach for chronic lymphocytic leukemia by anti-CD23 chimeric antigen receptor. *Blood* 2011; 117(18): 4736-45.
- 45 53. Takenaka K., Prasolava T.K., Wang J.C. y col. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 2007; 8(12): 1313-23.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para expandir las células T Vδ2<sup>-</sup> TCRγδ<sup>+</sup> en una muestra que comprende:
  - 5 (1) cultivar las células de la muestra en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T e interleucina-4, donde no hay interleucina-15, interleucina-2 ni interleucina-7 presentes en el primer medio; y
  - (2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende un mitógeno de células T y un factor de crecimiento seleccionado de entre interleucina-15, interleucina-2 e interleucina-7, donde la interleucina-4 no está presente en el segundo medio de cultivo.
- 10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde el factor de crecimiento de la etapa (2) es interleucina-15.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o 2, donde el primero o el segundo medio de cultivo, o ambos
- 15 4. Un procedimiento según la reivindicación 3, donde dicho segundo factor de crecimiento es interferón-γ o un mimético o equivalente funcional del mismo.
- 20 5. Un procedimiento según la reivindicación 1 o 2, donde el primero o el segundo medio de cultivo, o ambos medios de cultivo, comprenden además un segundo y un tercer factor de crecimiento, preferiblemente donde dichos factores de crecimiento son interferón-γ e interleucina-21 o un mimético o equivalente funcional del mismo.
- 25 6. Un procedimiento según la reivindicación 1 o 2, donde el primero o el segundo medio de cultivo, o ambos medios de cultivo, comprenden además un tercero y un cuarto factor de crecimiento, preferiblemente donde dichos factores de crecimiento son interferón-γ, interleucina-21 e interleucina-1β o un mimético o equivalente funcional del mismo.
- 30 7. Un procedimiento según la reivindicación 1 o 2, donde el primero o el segundo medio de cultivo, o ambos medios de cultivo, comprenden además una molécula coestimuladora de células T TCRγδ<sup>+</sup> Vδ2<sup>-</sup>, preferiblemente donde la molécula coestimuladora es un ligando molecular o un agonista del receptor SLAM, un ligando molecular o un agonista del receptor CD27, o un ligando molecular o un agonista del receptor CD7.
- 35 8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el primero y el segundo medio de cultivo contienen además suero o plasma.
9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde, antes de la etapa (1), las células de la muestra se enriquecen en células T.
- 40 10. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde, antes de la etapa (1), las células de la muestra se enriquecen en células T TCRγδ<sup>+</sup>.
11. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde, antes de la etapa (1), las células de la muestra se agotan en células T TCRαβ<sup>+</sup>.
- 45 12. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde, antes de la etapa (1) las células de la muestra se agotan primero en células T TCRαβ<sup>+</sup> y, a continuación, se enriquecen en células CD3<sup>+</sup>.
13. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde, antes de la etapa (1), las células de la muestra se enriquecen en células T no TCRγδ<sup>+</sup>.
- 50 14. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la muestra es sangre, tejido o fracciones del mismo, preferiblemente donde la muestra se selecciona de sangre periférica, sangre de cordón umbilical, tejido linfoide, epitelio, timo, médula ósea, bazo, hígado, tejido canceroso, tejido infectado, tejido de nódulo linfático o fracciones del mismo, más preferiblemente donde la muestra de partida es sangre periférica humana o una fracción de la
- 55 misma.
15. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la muestra consiste en células mononucleares de baja densidad (LDMC) o células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
- 60 16. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde, en el primer medio de cultivo, el mitógeno de células T está presente en una cantidad de alrededor de 10 a alrededor de 5000 ng/ml y la interleucina-4 está presente en una cantidad de alrededor de 1 a alrededor de 1000 ng/ml, preferiblemente donde, en el primer medio de cultivo, el mitógeno de células T está presente en una cantidad de alrededor de 20 a alrededor de 2000 ng/ml y la interleucina-4 está presente en una cantidad de alrededor de 5 a alrededor de 500 ng/ml, más preferiblemente donde, en el primer medio de cultivo, el mitógeno de células T está presente en una cantidad de alrededor de 50 a alrededor de
- 65 1000 ng/ml; y la interleucina-4 está presente en una cantidad de alrededor de 20 a alrededor de 200 ng/ml, aún más

preferiblemente donde el primer medio de cultivo comprende 70 ng/ml de un mitógeno de células T y 100 ng/ml de interleucina-4.

- 5 17. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde en el segundo medio de cultivo el mitógeno de células T está presente en una cantidad de alrededor de 0,1 a alrededor de 50  $\mu\text{g/ml}$  y la interleucina-15, interleucina-2 o interleucina-7 está presente en una cantidad de alrededor de 1 a alrededor de 1000 ng/ml, preferiblemente donde en el segundo medio de cultivo el mitógeno de células T está presente en una cantidad de alrededor de 0,3 a alrededor de 10  $\mu\text{g/ml}$  y la interleucina-15, interleucina-2 o interleucina-7 está presente en una cantidad de alrededor de 2 a alrededor de 500 ng/ml, más preferiblemente donde en el segundo medio de cultivo el mitógeno de células T está presente en una cantidad de alrededor de 0,5 a alrededor de 5  $\mu\text{g/ml}$  y la interleucina-15, interleucina-2 o interleucina-7 está presente en una cantidad de alrededor de 20 a alrededor de 200 ng/ml, aún más preferiblemente donde el segundo medio de cultivo comprende 1  $\mu\text{g/ml}$  de un mitógeno de células T y 70 ng/ml de interleucina-15, interleucina-2 o interleucina-7.
- 10
- 15 18. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde en el primero o el segundo medio de cultivo, o en ambos medios de cultivo, el interferón- $\gamma$  está presente en una cantidad de alrededor de 1 a alrededor de 1000 ng/ml; y la interleucina-21 y la interleucina-1 $\beta$  están presentes en una cantidad de 1 a alrededor de 500 ng/ml, preferiblemente donde, en el primero o el segundo medio de cultivo, o en ambos medios de cultivo, el interferón- $\gamma$  está presente en una cantidad de alrededor de 2 a alrededor de 500 ng/ml; y la interleucina-21 y la interleucina-1 $\beta$  están presentes en una cantidad de 2 a alrededor de 200 ng/ml, más preferiblemente donde, en el primero o el segundo medio de cultivo, o en ambos medios de cultivo, el interferón- $\gamma$  está presente en una cantidad de alrededor de 20 a alrededor de 200 ng/ml; y la interleucina-21 y la interleucina-1 $\beta$  están presentes en una cantidad de 5 a alrededor de 100 ng/ml, aún más preferiblemente donde el primero o el segundo medio de cultivo, o ambos medios de cultivo, comprenden además 70 ng/ml de interferón- $\gamma$ ; 15 ng/ml de interleucina-21; y 15 ng/ml interleucina-1 $\beta$ .
- 20
- 25 19. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el mitógeno de células T es un anticuerpo o un fragmento del mismo, preferiblemente donde el anticuerpo se une a CD3 o un fragmento del mismo.
- 30 20. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 19, donde el suero o plasma está presente en una cantidad de alrededor del 0,5 a alrededor del 25 % en volumen, preferiblemente donde el suero o plasma está presente en una cantidad de alrededor del 2 a alrededor del 20 % en volumen, más preferiblemente donde el suero o el plasma está presente en una cantidad de alrededor del 2,5 a alrededor del 10 % en volumen, aún más preferiblemente donde el suero o el plasma está presente en una cantidad de alrededor del 5 % por volumen.

Figura 1

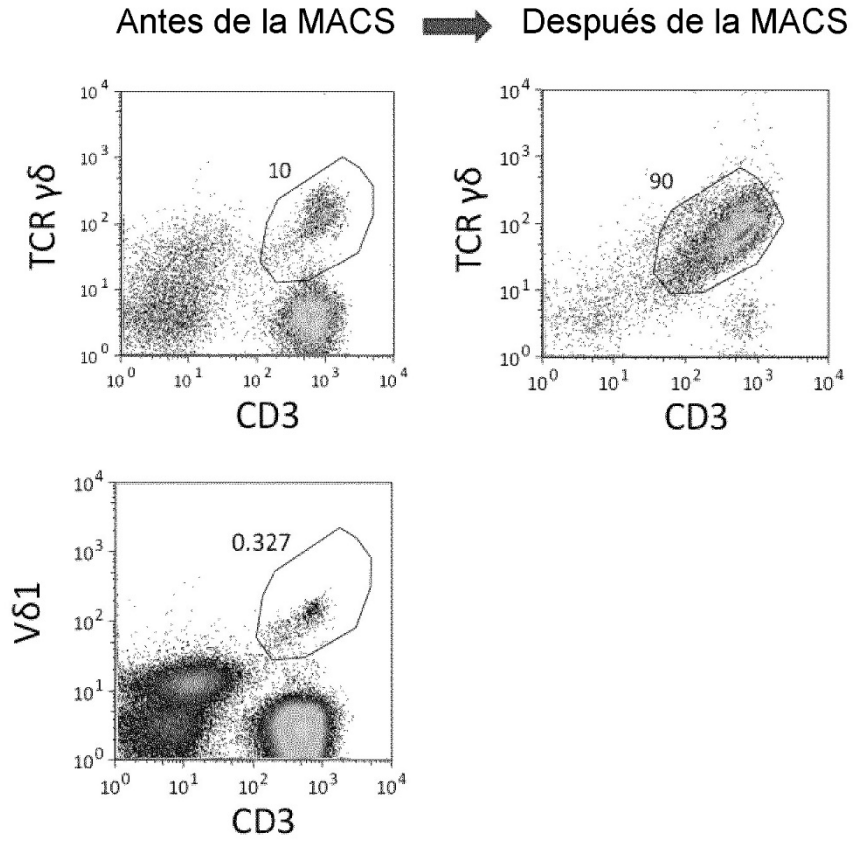


Figura 2

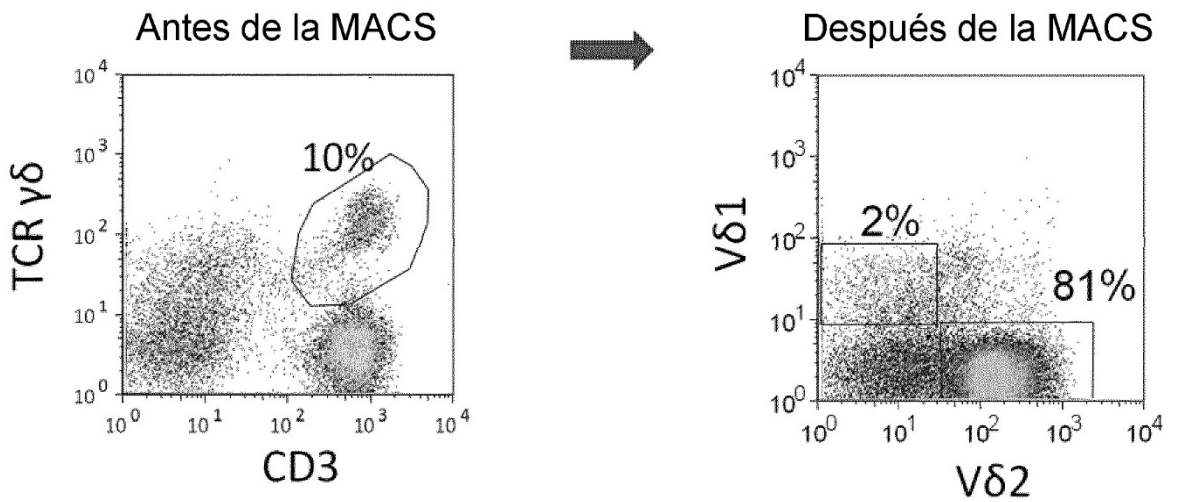
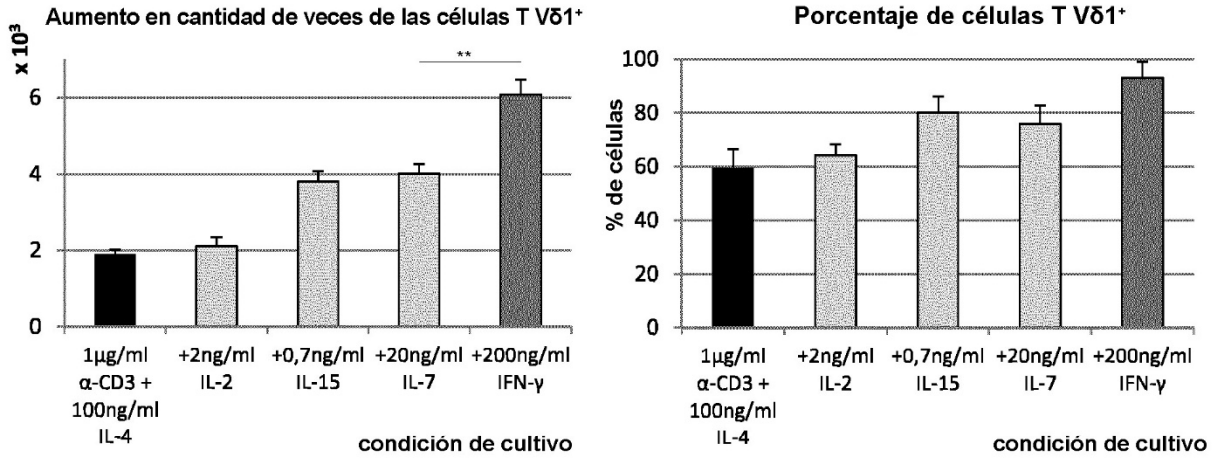
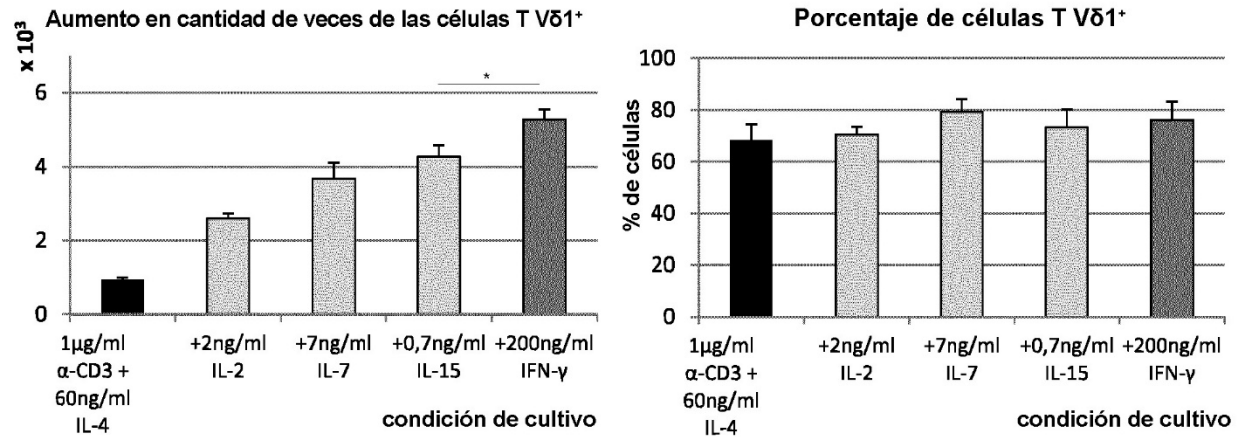


Figura 3

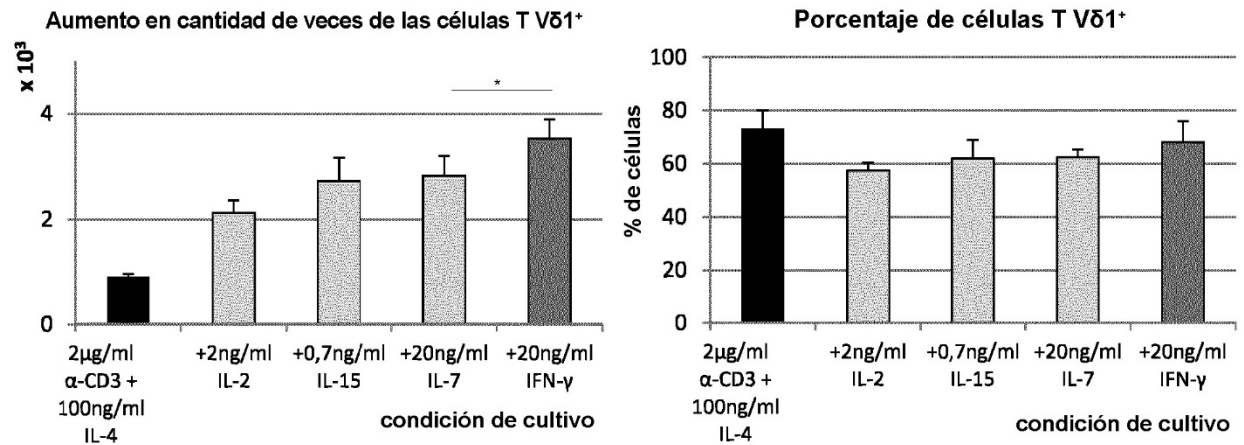
A



B



C



D

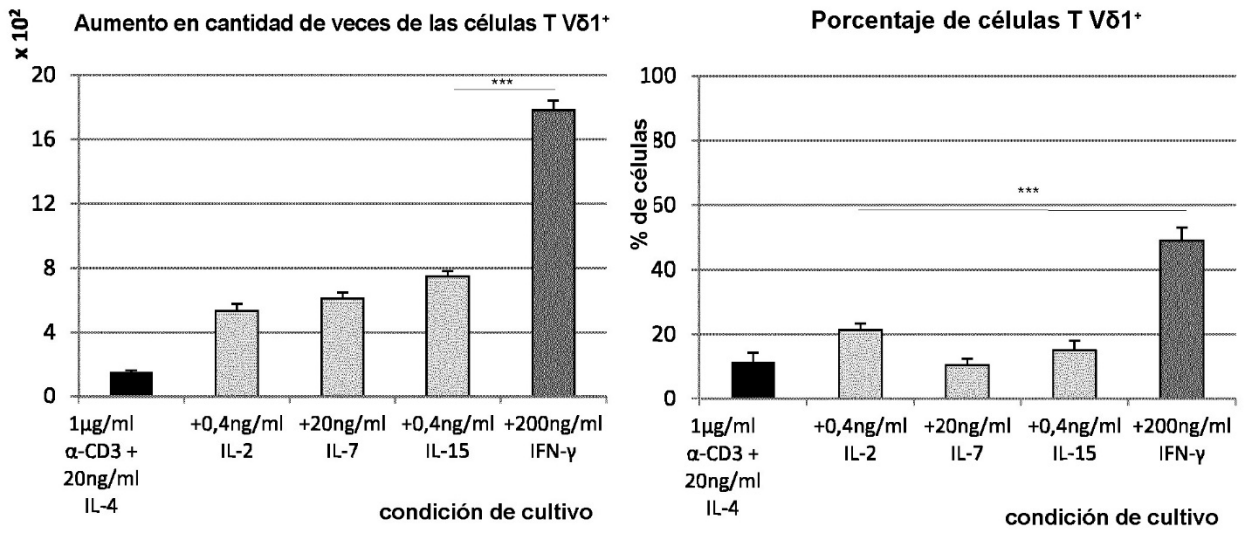


Figura 4

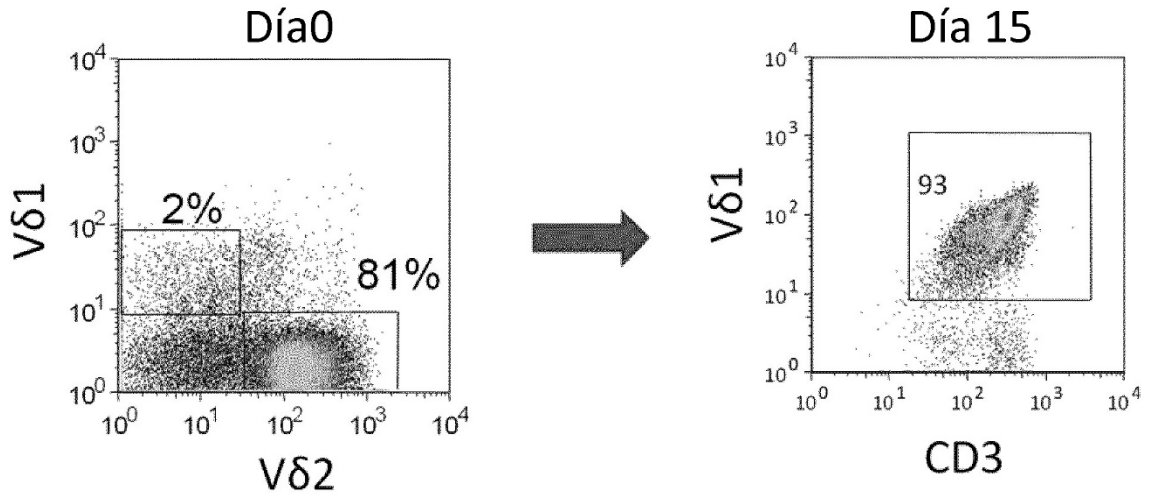


Figura 5

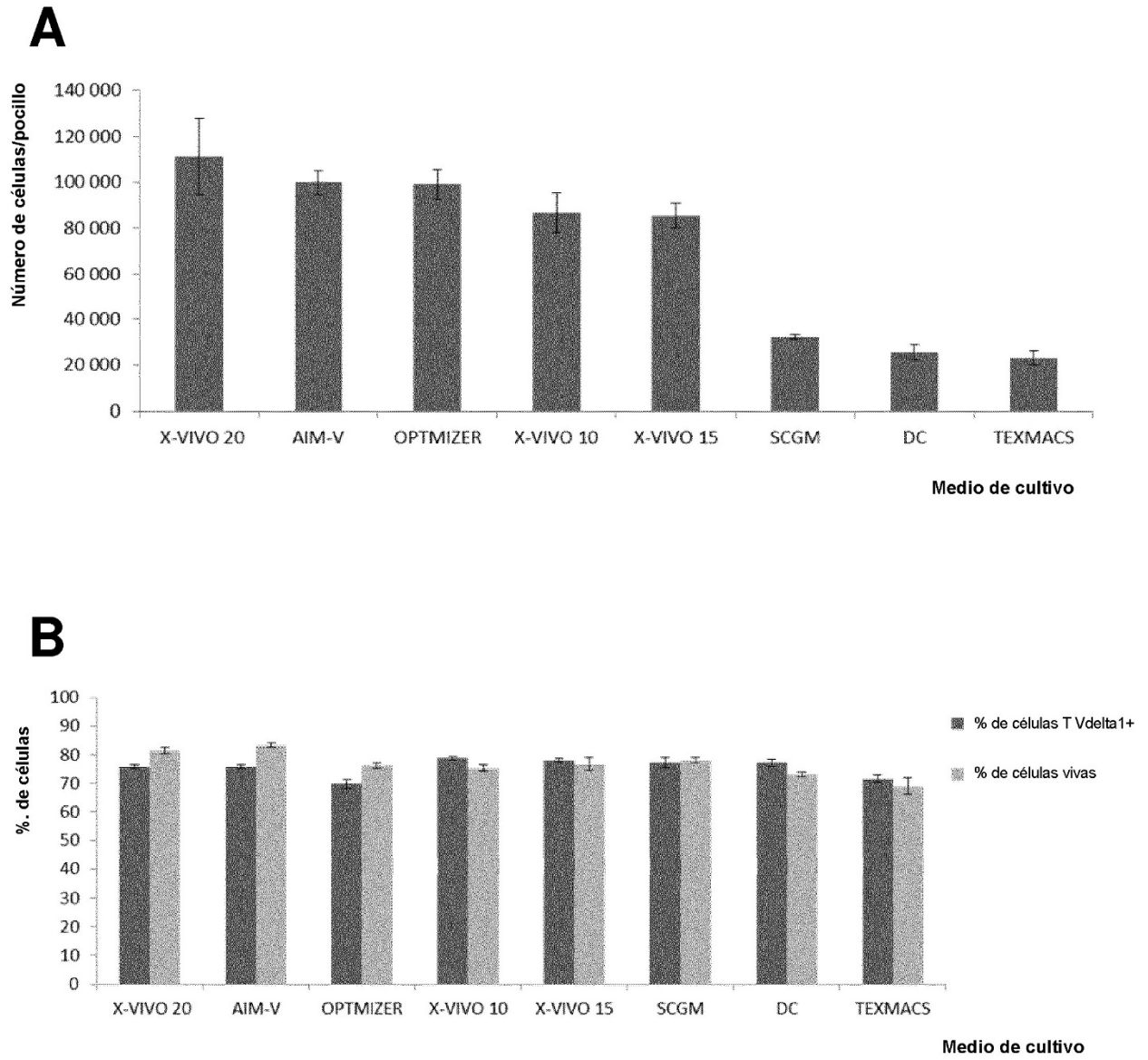


Figura 6

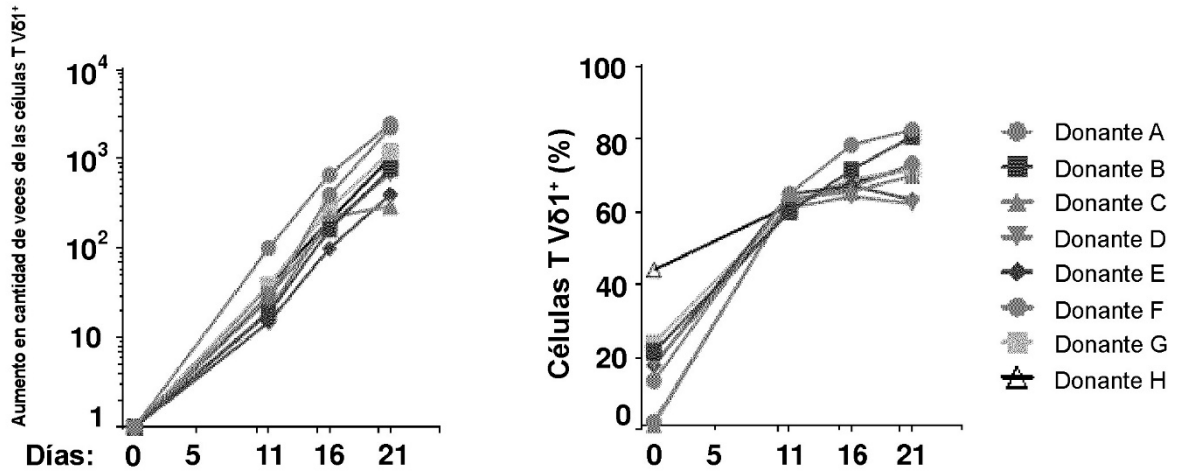


Figura 7

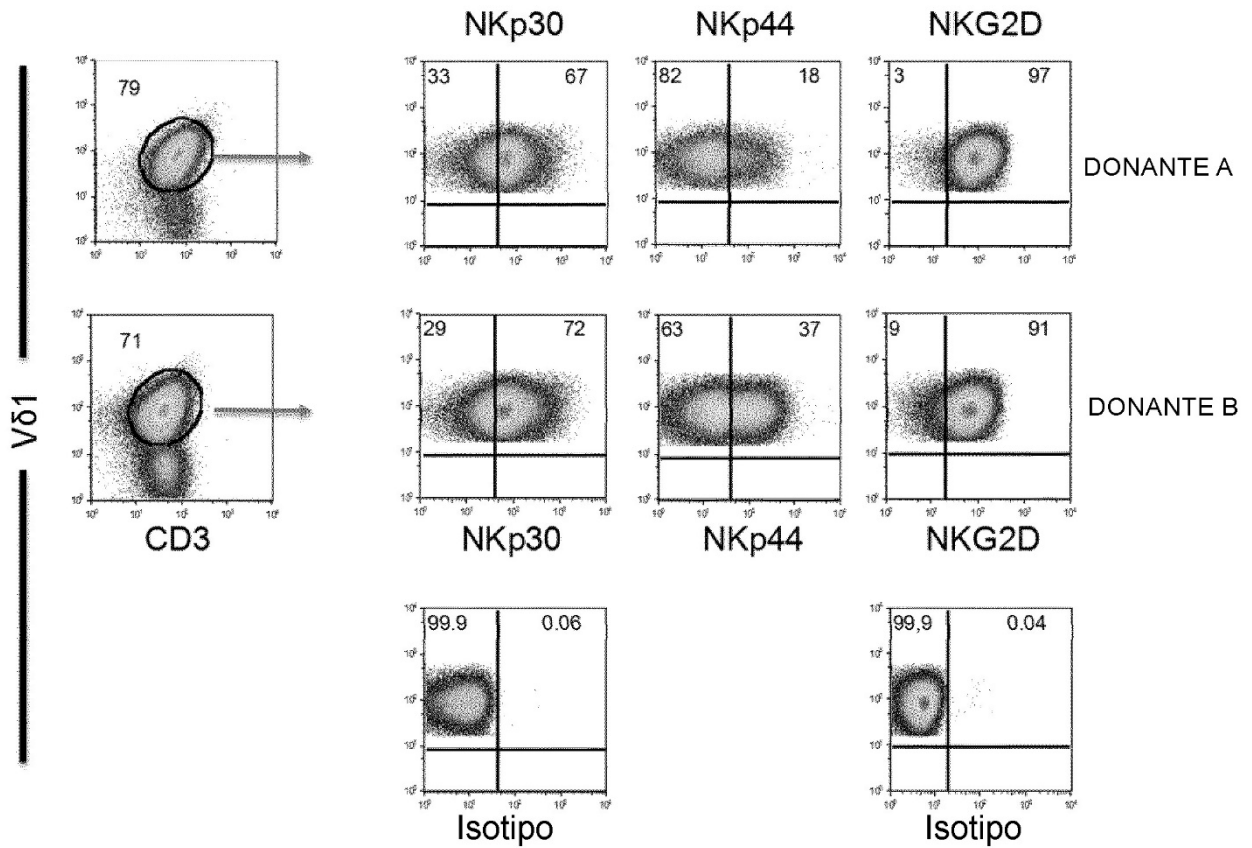


Figura 8

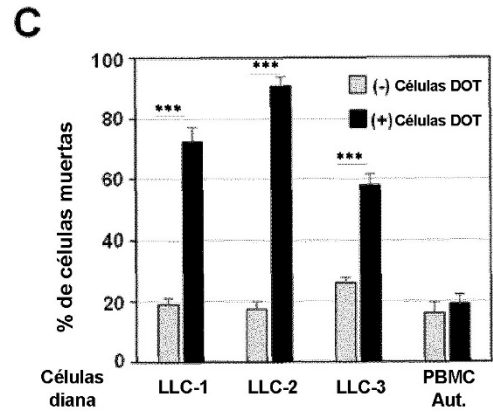
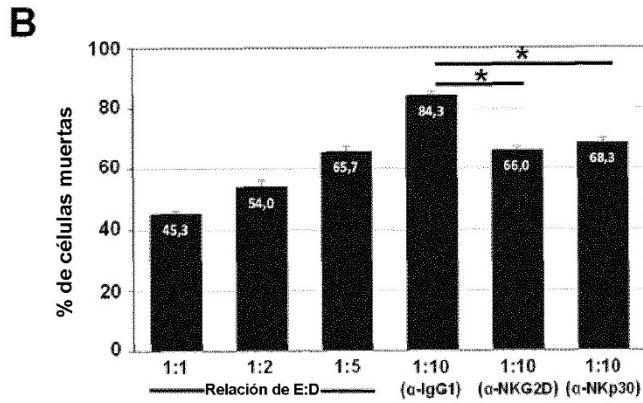
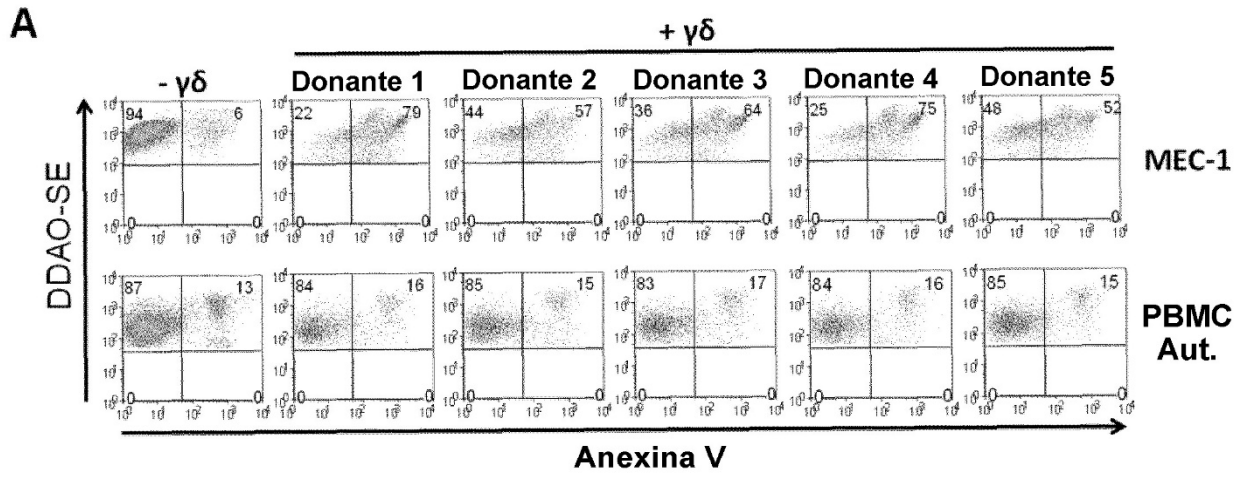


Figura 9

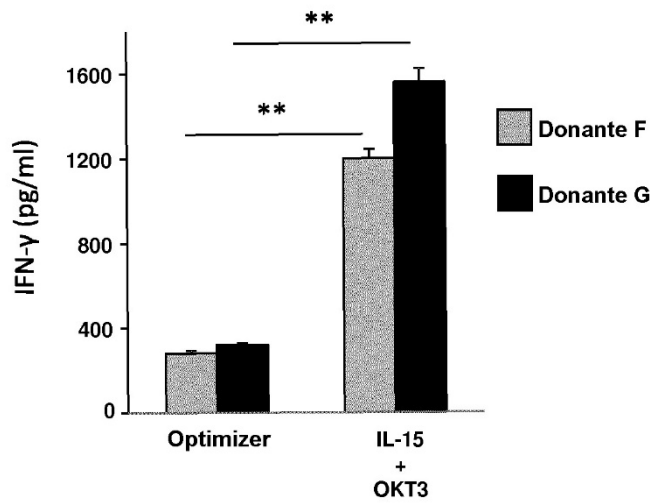


Figura 10

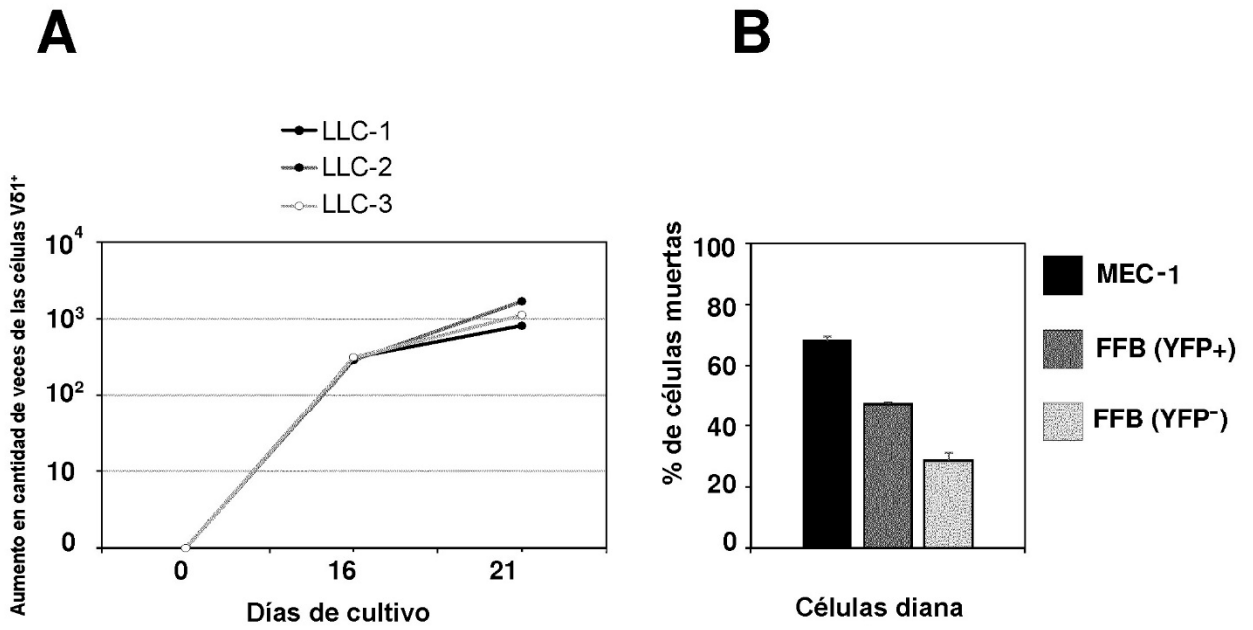


Figura 11

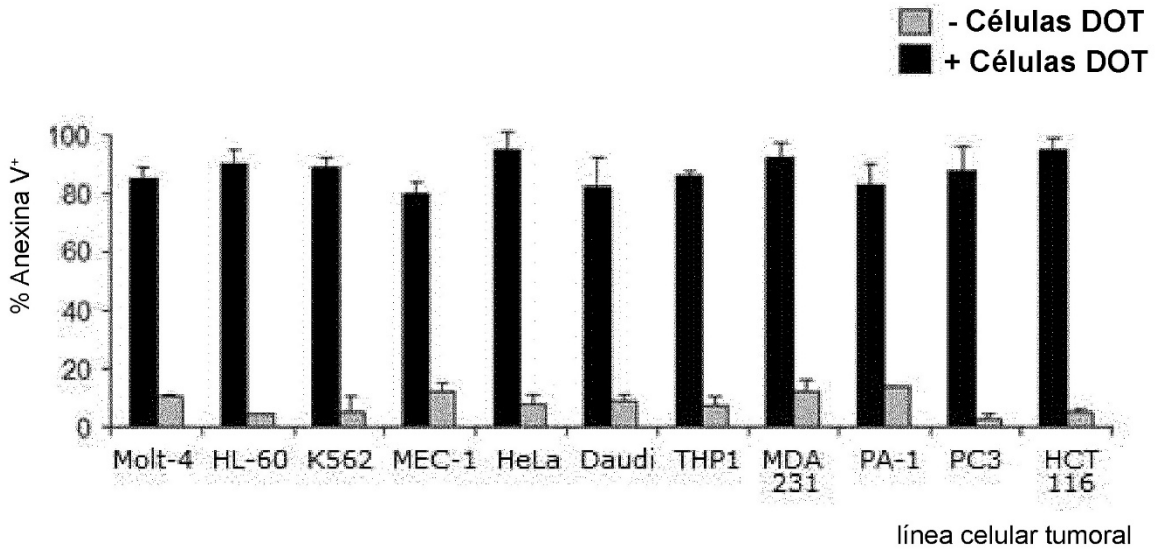
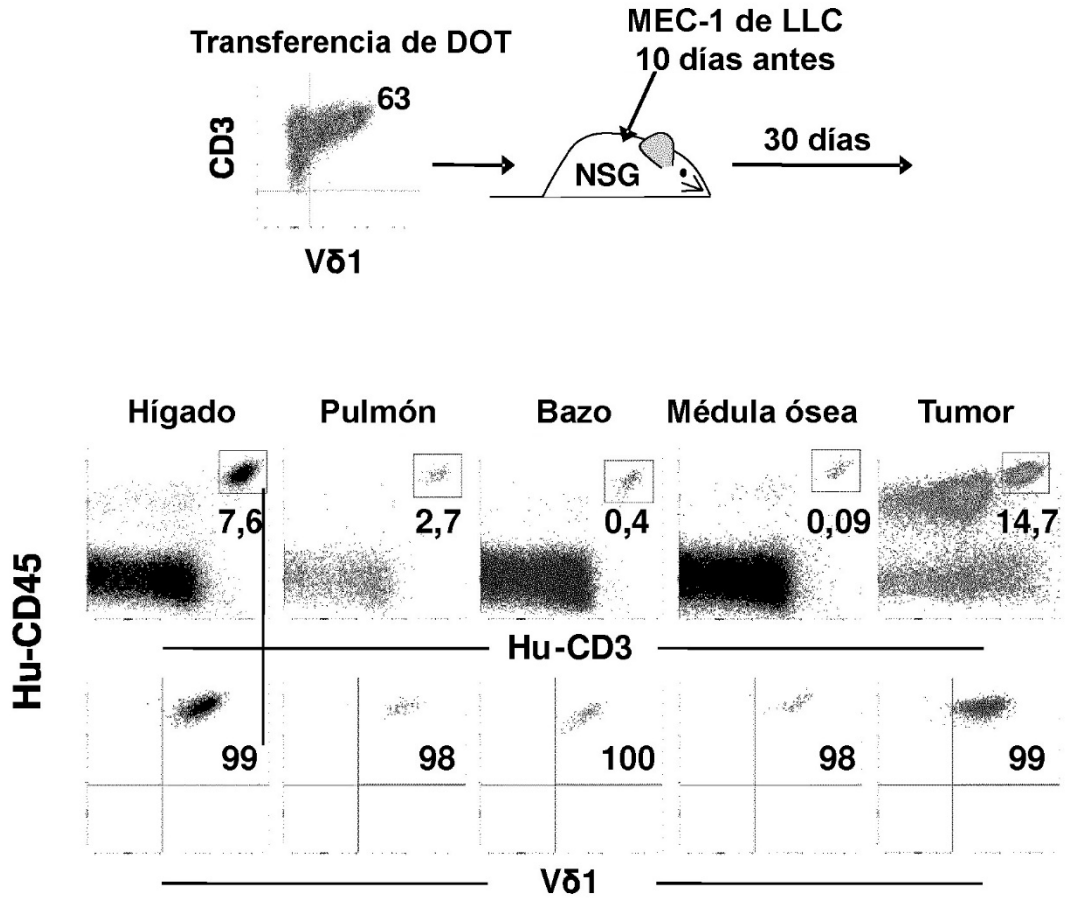
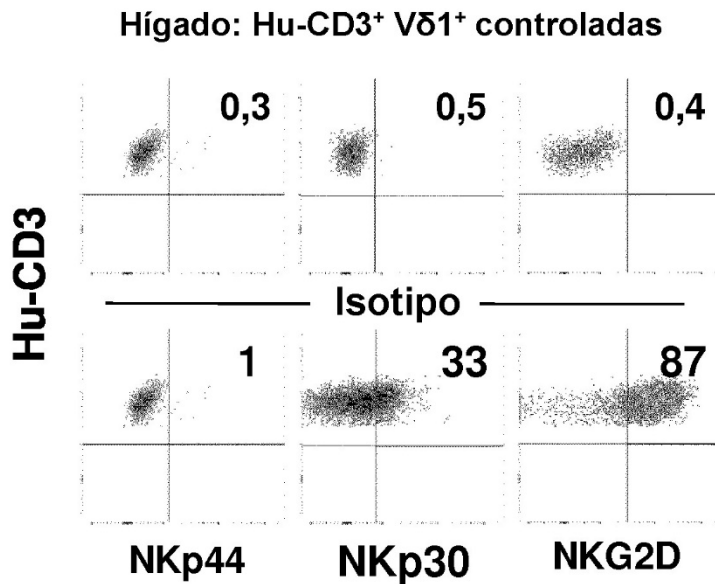


Figura 12

**A**



**B**



C

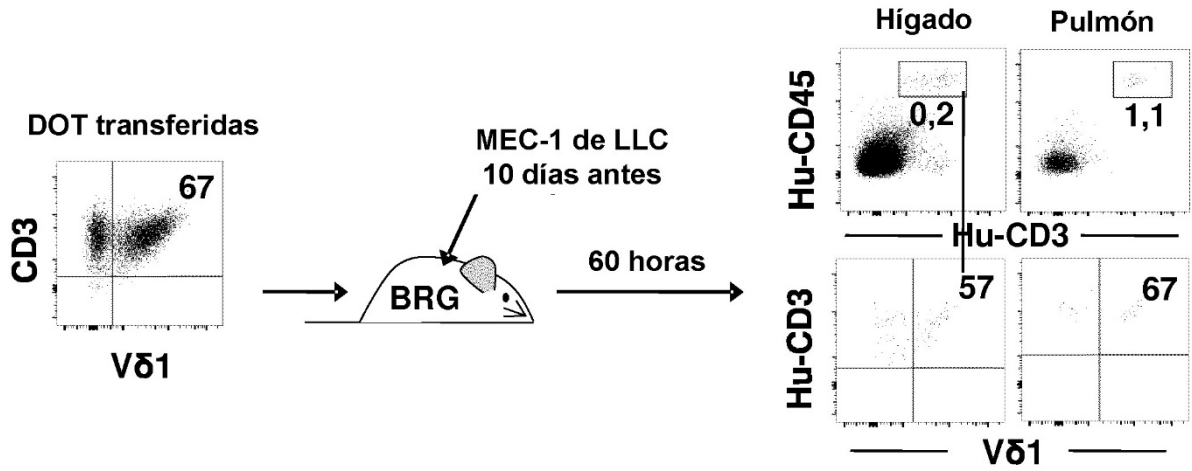


Figura 13

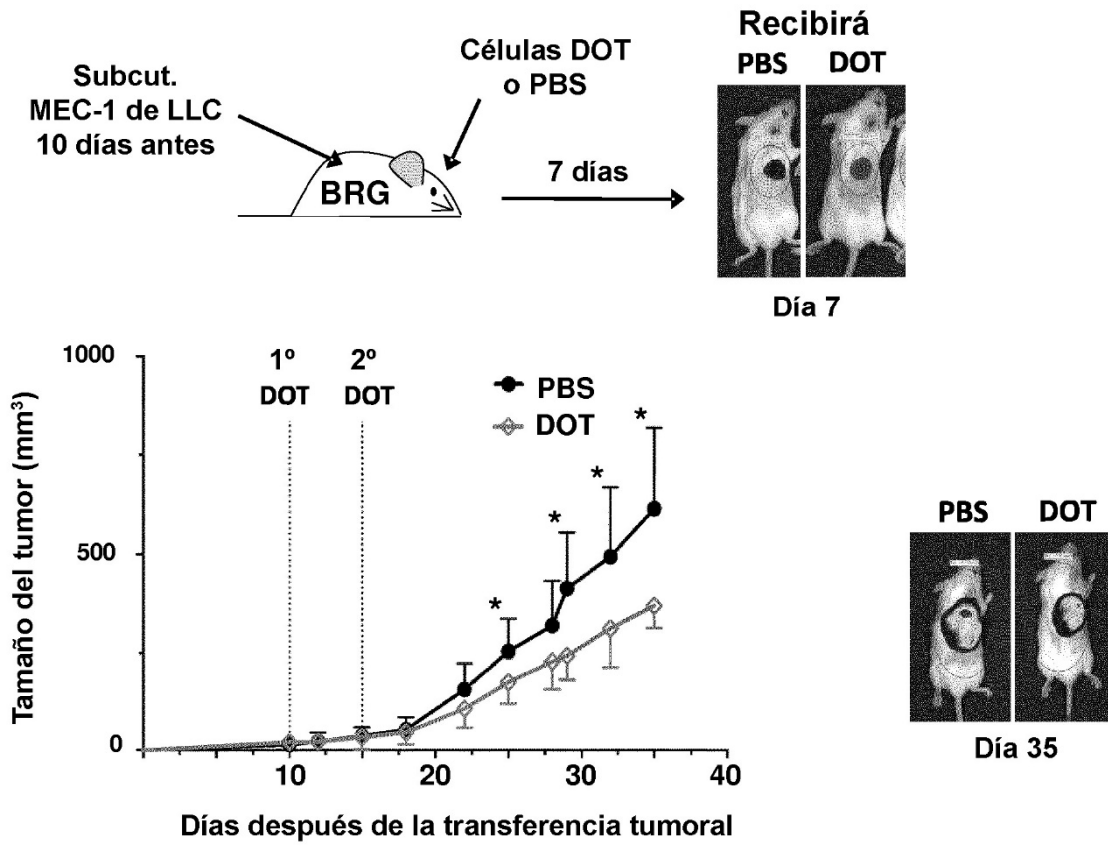
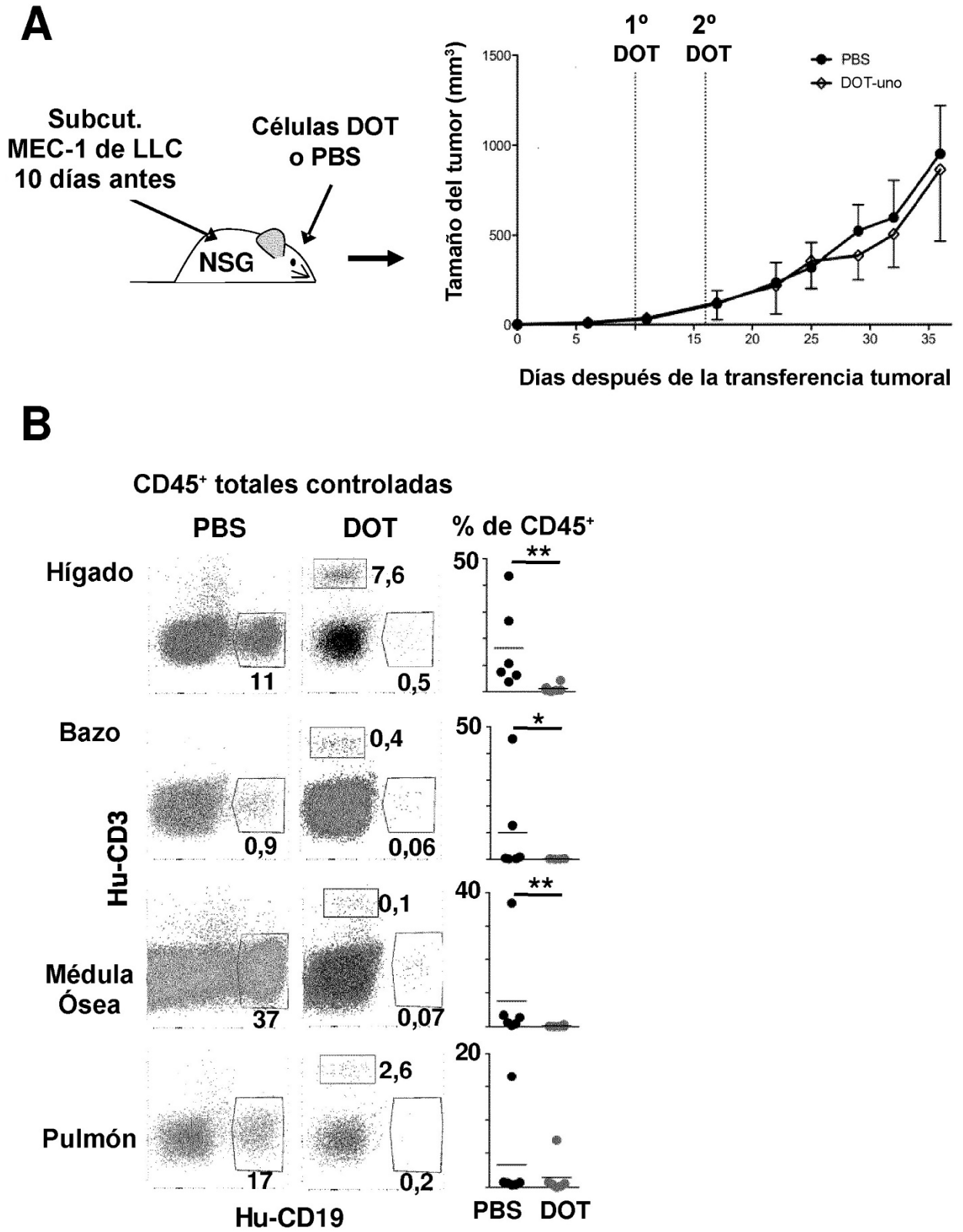
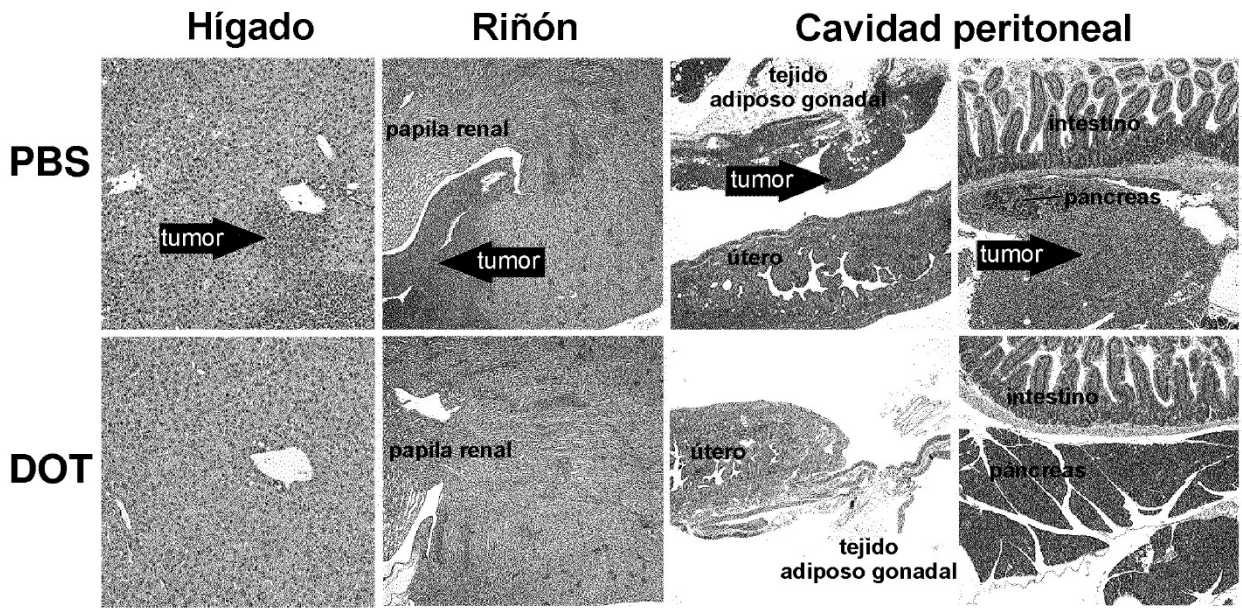


Figura 14



**C**



**D**

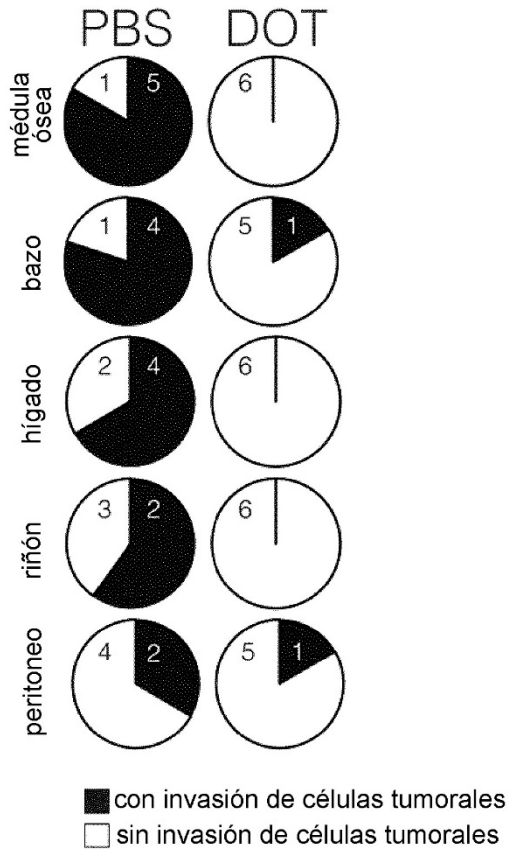


Figura 15

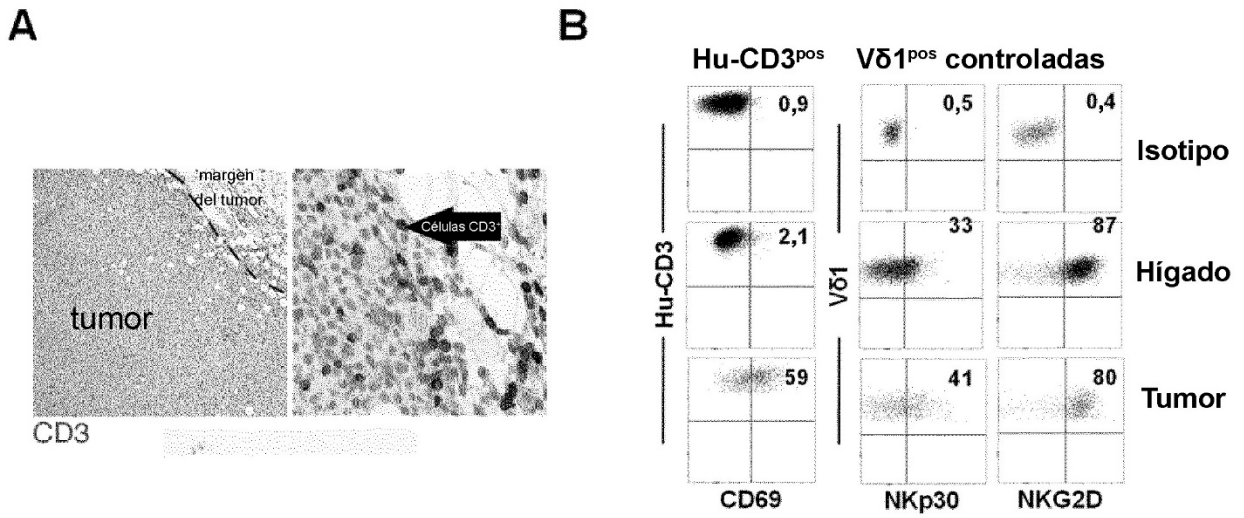


Figura 16

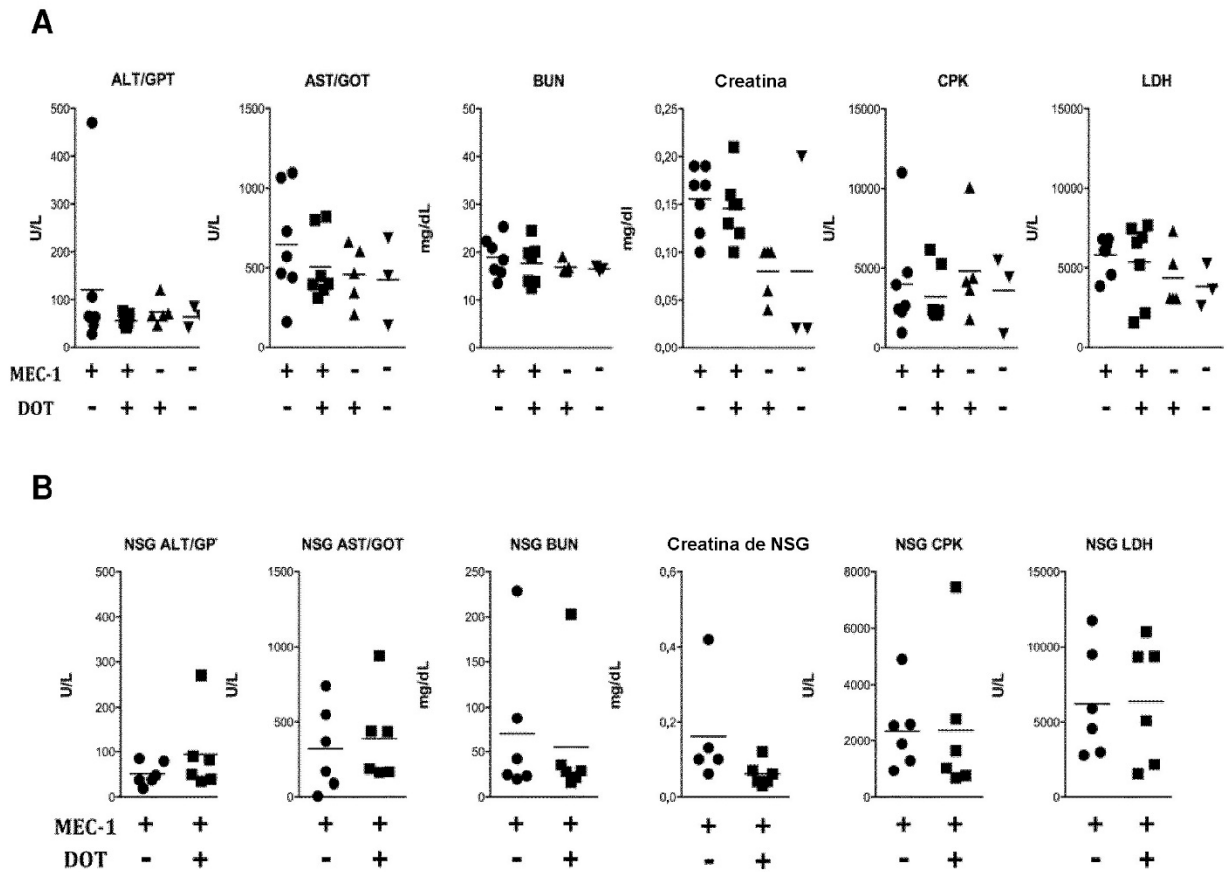


Figura 17

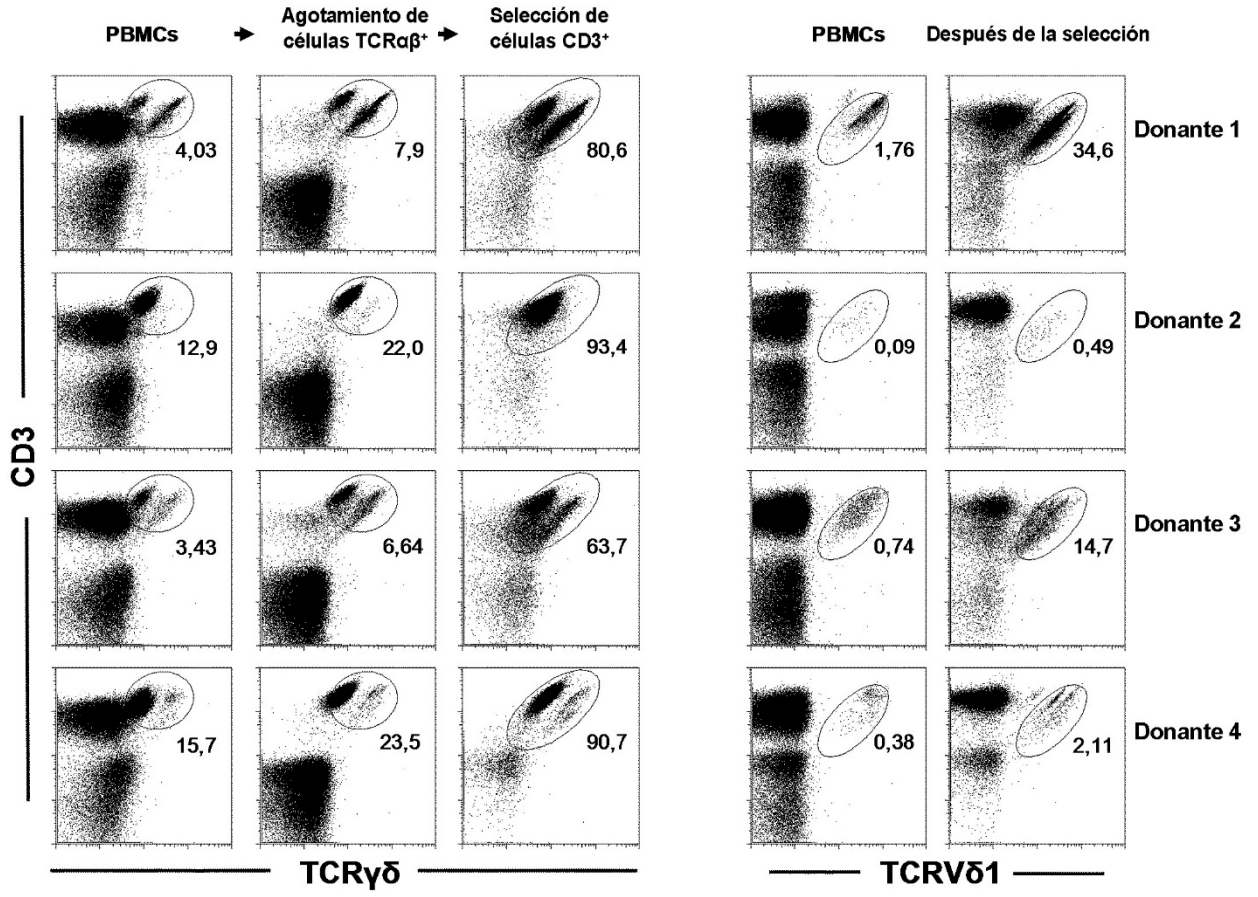
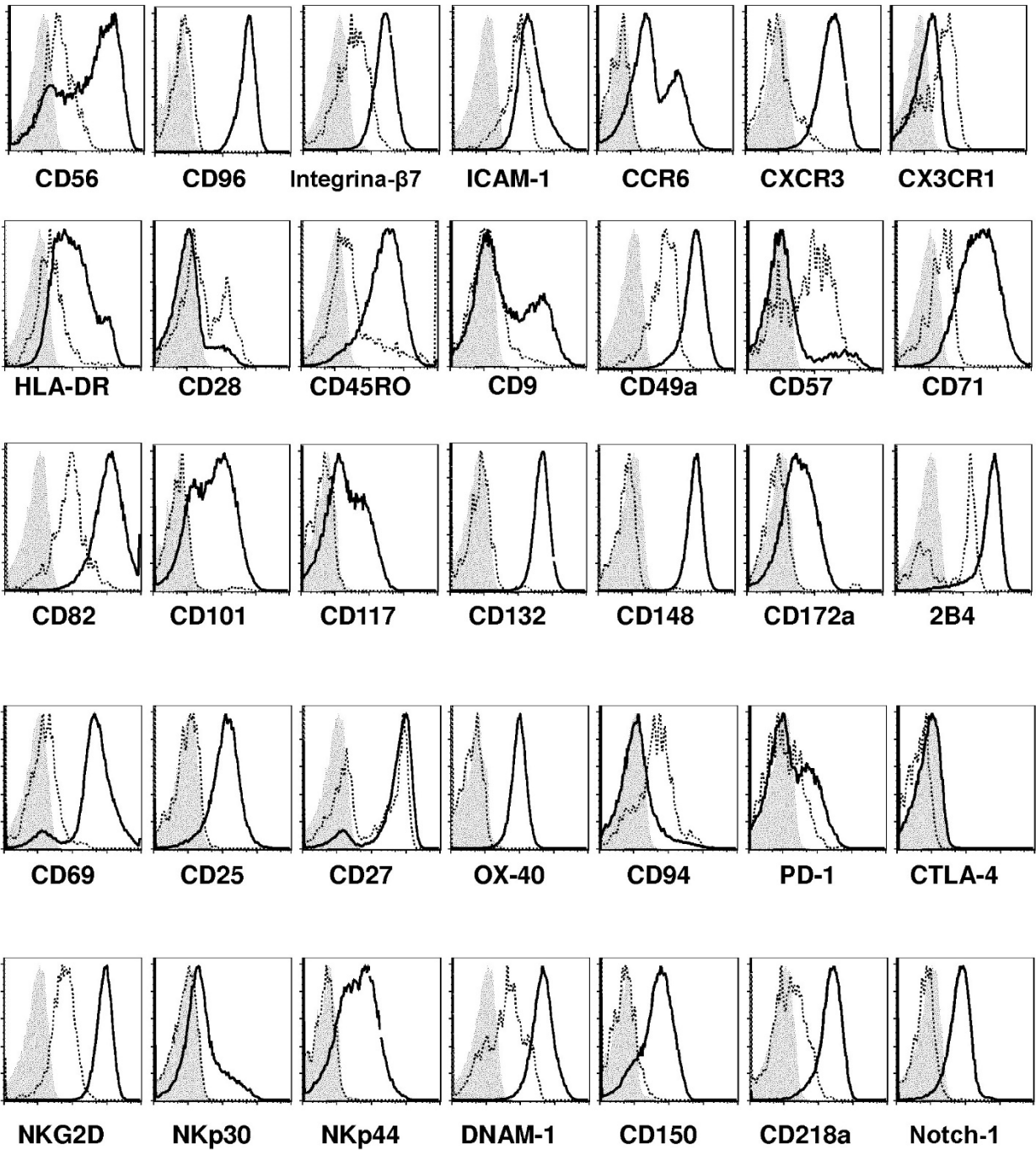


Figura 18

**A**



**B**

Fresco 1 Fresco 2 Cult.-1 Cult.-2 Cult.-3 Cult.-4

| Fresco 1 | Fresco 2 | Cult.-1 | Cult.-2 | Cult.-3 | Cult.-4 |         |
|----------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
|          |          |         |         |         |         | CD69    |
|          |          |         |         |         |         | CD25    |
|          |          |         |         |         |         | CD27    |
|          |          |         |         |         |         | OX-40   |
|          |          |         |         |         |         | CD94    |
|          |          |         |         |         |         | PD-1    |
|          |          |         |         |         |         | CTLA-4  |
|          |          |         |         |         |         | HLA-DR  |
|          |          |         |         |         |         | CD28    |
|          |          |         |         |         |         | CD45RO  |
|          |          |         |         |         |         | CD9     |
|          |          |         |         |         |         | CD49a   |
|          |          |         |         |         |         | CD57    |
|          |          |         |         |         |         | CD71    |
|          |          |         |         |         |         | NKG2D   |
|          |          |         |         |         |         | NKp30   |
|          |          |         |         |         |         | NKp44   |
|          |          |         |         |         |         | DNAM-1  |
|          |          |         |         |         |         | CD150   |
|          |          |         |         |         |         | CD218a  |
|          |          |         |         |         |         | Notch 1 |
|          |          |         |         |         |         | CD56    |
|          |          |         |         |         |         | CD96    |
|          |          |         |         |         |         | Int..β7 |
|          |          |         |         |         |         | ICAM-1  |
|          |          |         |         |         |         | CCR6    |
|          |          |         |         |         |         | CXCR3   |
|          |          |         |         |         |         | CX3CR1  |
|          |          |         |         |         |         | CD82    |
|          |          |         |         |         |         | CD101   |
|          |          |         |         |         |         | CD117   |
|          |          |         |         |         |         | CD132   |
|          |          |         |         |         |         | CD148   |
|          |          |         |         |         |         | CD172a  |
|          |          |         |         |         |         | 2B4     |



Figura 19

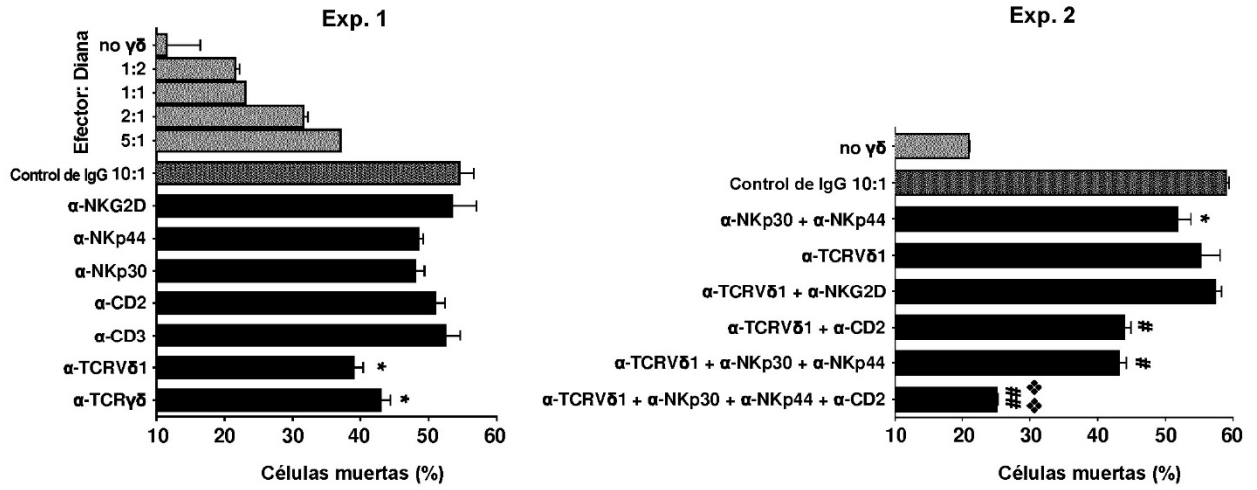


Figura 20

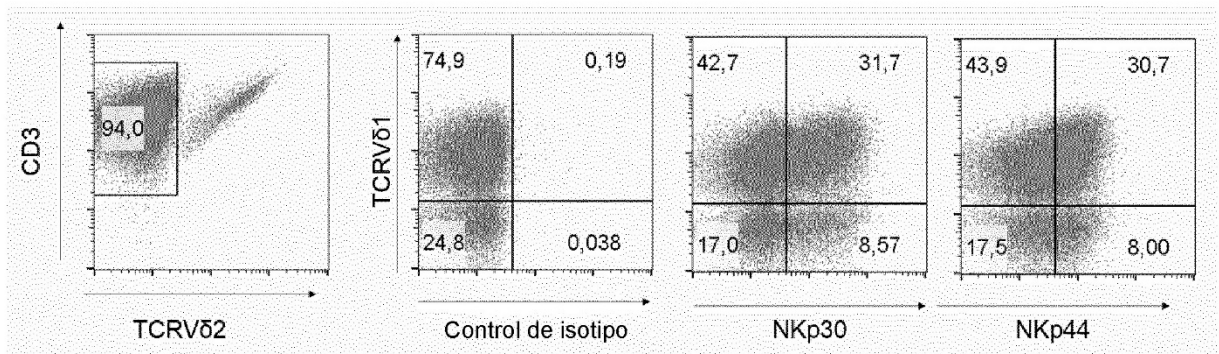


Figura 21

