

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 441**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 35/17 (2015.01)

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2016 PCT/GB2016/051050**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16166544**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2016 E 16721208 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024 EP 3283620**

54 Título: **Células T γδ modificados y usos de los mismos**

30 Prioridad:

15.04.2015 GB 201506423
08.07.2015 WO PCT/GB2015/051985

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.12.2024

73 Titular/es:

TC BIOPHARM LTD. (100.00%)
Maxim 12 Parklands Way
EurocentralHolytown ML1 4WR, GB

72 Inventor/es:

LEEK, MICHAEL DAVID;
HANNIGAN, ADELE;
PATAKAS, AGAPITOS y
PARUZINA, DARIA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 993 441 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

Células T $\gamma\delta$ modificados y usos de los mismos

Campo de la invención

Esta solicitud se refiere a métodos para preparar y usar células T gamma delta (células T $\gamma\delta$), adecuadamente al uso de células T gamma delta en sujetos destinatarios alogénicos o autólogos para el tratamiento de afecciones que incluyen infección vírica, infección fúngica, infección protozoaria y cáncer, específicamente al uso de células T $\gamma\delta$ modificados con receptores de antígeno quiméricos (CAR). La invención también se refiere a procesos para la generación de células T $\gamma\delta$ que expresan receptores de antígeno quiméricos y para detectar la expresión de CAR. Además, la presente invención se refiere al uso farmacéutico de las células generadas con los procesos analizados en la presente memoria en el tratamiento de enfermedades tales como cáncer y enfermedad infecciosa.

Los linfocitos T gamma delta representan un subconjunto menor de sangre periférica en seres humanos (menos de un 10 %). Las células T gamma delta que expresan el receptor de células T V γ 9V δ 2 (gamma 9 delta 2) reconocen el pirofosfato de isopentenilo (IPP) endógeno que se produce en exceso en células cancerosas como resultado de la ruta desregulada del mevalonato. La capacidad de los linfocitos T gamma delta para producir abundantes citocinas proinflamatorias como IFN-gamma, su potente función citotóxica eficaz y el reconocimiento independiente del MHC de los antígenos los convierte en una capa importante de inmunoterapia contra el cáncer. Se ha indicado que las células T gamma delta pueden destruir muchos tipos diferentes de líneas celulares tumorales y tumores *in vitro*, incluyendo leucemia, neuroblastoma y diversos carcinomas. Además, se ha demostrado que las células T gamma delta pueden reconocer y destruir muchas células tumorales diferenciadas diferentes espontáneamente o después del tratamiento con diferentes bisfosfonatos, incluyendo zoledronato. Las células tumorales humanas pueden presentar eficientemente compuestos de aminobisfosfonato y pirofosfomonoéster a las células T gamma delta induciendo su proliferación y producción de IFN-gamma.

Se han utilizado estrategias de trasplante autólogo de células T gamma delta para superar las desventajas asociadas con el trasplante alogénico de células madre. Como parte de tales técnicas de trasplante autólogo, se han descrito previamente métodos para inducir y cultivar suficientes números de células T gamma delta para ejercer efecto terapéutico de forma autóloga, por ejemplo, el documento US 2002/0107392. Drew C Deniger *et al.*: "Bispecific T-cells Expressing Polyclonal Repertoire of Endogenous [gamma][delta] T cell Receptors and Introduced CD19 specific Chimeric Antigen Receptor", MOLECULAR THERAPY, vol. 21, n.º 3, 1 de marzo de 2013, analiza la expresión de un receptor de antígeno quimérico específico de CD19 en células T gamma delta.

M Chmielewski *et al.*: "T cells redirected by a CD3[zeta] chimeric antigen receptor can self-antigen-specific tumour protection in the long term" GENE THERAPY, vol. 20, n.º 2, 1 de febrero de 2013, analiza el uso de un CAR de baja afinidad con un endodominio CD3zeta.

Adrienne H Long *et al.*: "4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors", NATURE MEDICINE, vol. 21 n.º 6, 4 de mayo de 2015, analiza la fosforilación de CD3zeta de CAR, desencadenada por la agrupación independiente de antígeno de fragmentos variables monocatenarios de CAR, lo que puede inducir el agotamiento temprano de células T CAR que limita la eficacia antitumoral.

Jean-Jacques Fournié *et al.*: "What lessons can be learned from [gamma][delta] T cell-based cancer immunotherapy trials?", CELLULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 10, n.º 1, 17 de diciembre de 2012, analiza estrategias basadas en células T gamma delta en el ámbito actual de las inmunoterapias contra el cáncer.

Kunzmann V *et al.*: "Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma" BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 96, n.º 2, 15 de julio de 2000, analiza la estimulación con aminobisfosfonato de células T gamma delta y los efectos sobre el sistema inmunitario.

Sjoukje J. C. Van Der Stegen *et al.*: "The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors", NATURE REVIEWS. DRUG DISCOVERY, vol. 14., n.º 7, 1 de julio de 2015. Proporciona una revisión sobre el diseño de receptores de antígeno quiméricos.

Sin embargo, las estrategias de tratamiento tienen varias desventajas. Por tanto, se requieren estrategias de tratamiento alternativas y/o mejoradas usando células T gamma delta.

Compendio de la invención

La dificultad de identificar y expandir clones de células T específicos de cáncer ha dado lugar al desarrollo de Receptores de Antígeno Quiméricos (CAR). Los CAR usan anticuerpos monoclonales para redirigir la especificidad de las células T contra antígenos diana independientes del reconocimiento de TCR-MHC/péptido. Múltiples estudios clínicos hasta la fecha han empleado la transducción por CAR de células T alfa beta ($\alpha\beta$) mientras que ninguno ha hecho eso usando células/linfocitos T gamma delta ($\gamma\delta$). Los autores de la presente invención han determinado que la transducción por CAR de células/linfocitos T gamma delta puede ser ventajosa.

Como expone anteriormente, la mayoría de los linfocitos T $\gamma\delta$ dentro de la sangre periférica son del isotipo Vgamma9 Vdelta2. Las células T $\gamma\delta$ que expresan el receptor de células T Vdelta2 Vgamma9 reconocen el pirofosfato de isopentenilo (IPP) endógeno que se produce en exceso en células cancerosas como resultado de una ruta desregulada del mevalonato. Los autores de la invención consideran que la capacidad de los linfocitos T gamma delta ($\gamma\delta$) de producir abundantes citocinas proinflamatorias como IFN-gamma, su potente función efectora citotóxica y su reconocimiento independiente del MHC de los antígenos los hace un importante protagonista en la inmunoterapia contra el cáncer.

Se han realizado estudios *in vitro* limitados para investigar la capacidad de los CAR de aumentar la potencia de las células T gamma delta ($\gamma\delta$) (Rischer *et al.*, 2004, Deniger *et al.*, 2013). Sin embargo, dichos estudios no han logrado el potencial de utilizar células T $\gamma\delta$ modificados con CAR de un sujeto de proporcionar terapia a un segundo sujeto diferente (uso alogénico). Dichos estudios no han materializado además la manera en que pueden proporcionarse células T $\gamma\delta$ modificados con CAR de modo que se proporcione una respuesta "ajustable".

Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención proporciona un linfocito T $\gamma\delta$ modificado según la reivindicación 1.

Adecuadamente, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado puede comprender un receptor de antígeno quimérico en donde el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión a antígeno extracelular con especificidad de unión por un antígeno de enfermedad, una bisagra, un dominio transmembranario, y

(i) una o más regiones de señalización coestimuladoras y un dominio de activación/señalización CD3 zeta no funcional (CAR ajustable)

En realizaciones, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado puede comprender un receptor de antígeno quimérico en donde el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión a antígeno extracelular con especificidad de unión por un antígeno de enfermedad, una bisagra, un dominio transmembranario, una o más regiones de señalización coestimuladoras y un dominio de activación CD3 zeta no funcional.

En realizaciones, el linfocito T $\gamma\delta$ modificado puede comprender un dominio de activación CD3 zeta no funcional proporcionado por la ausencia de un dominio de activación CD3 zeta en el receptor de antígeno quimérico.

Adecuadamente, en realizaciones, el linfocito T $\gamma\delta$ expresa un TCR de cualquier emparejamiento de TCR gamma delta de V γ 1 a 9 y V δ 1 a 8. En realizaciones, el linfocito T $\gamma\delta$ es del subtipo V γ 9V δ 2.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un linfocito T $\gamma\delta$ modificado del primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de afecciones tales como cáncer o infecciones.

También se describe en la presente memoria una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR está compuesto por un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular tal como un fragmento variable monocatenario (scFv), un dominio de bisagra y transmembranario, una o más regiones de señalización coestimuladoras. Mediante el dominio CD3 zeta no funcional, se considera que la señalización no se proporciona o no se proporciona suficientemente para provocar la activación.

Adecuadamente, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, una bisagra, un dominio transmembranario.

(i) una o más regiones de señalización coestimuladoras y un dominio de activación CD3 zeta no funcional, o

Adecuadamente, se puede proporcionar un dominio de activación CD3 zeta no funcional mediante la ausencia de un dominio de activación CD3 zeta en el receptor de antígeno quimérico.

Como se indica anteriormente, la terapia con células T con receptores de antígeno quiméricos (CAR) es una técnica de inmunoterapia en donde las células T se genomanipulan con un receptor sintético para que reconozcan y se dirijan a un antígeno o proteína particular (diana de superficie celular), independientemente de la restricción por HLA.

Típicamente, un CAR "clásico" de 2.^a o 3.^a generación se diseña de una manera modular, que comprende típicamente un dominio de unión a diana extracelular, normalmente un fragmento variable monocatenario (scFv), una región de bisagra, un dominio transmembranario que ancla el CAR a la membrana celular y uno o más dominios de señalización intracelular. El dominio de señalización está comprendido normalmente por elementos del dominio de activación de cadena CD3 zeta (CD3 ζ) que proporciona estimulación similar a TCR (denominada señal 1) y elementos de los restos de señalización CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), CD244 o ICOS que proporcionan señales coestimuladoras (denominada señal 2). En dichos células T típicos que expresan CAR, se requiere que tanto la señal 1 como la señal 2 para liberar las células T de un estado de reposo. En ausencia de señales coestimuladoras adicionales (señal 2), la presencia de la señal 1 sola no es suficiente para activar las células T y puede hacerlas insensibles/anérgicos. Por tanto, la presencia de ambas señales es necesaria para inducir la activación de células T.

Los ensayos clínicos que emplean células T que expresan CAR (CAR-T) han demostrado el enfoque de CAR-T y en 2014 la terapia con células T CAR anti-CD19 se aprobó por la FDA de Estados Unidos. Aunque se han observado tasas de respuesta impresionantes en ensayos CAR-T, actualmente la tecnología está limitada en cierto modo por una falta de antígenos de enfermedad verdaderos, es decir, antígenos expresados solo en células patológicas y no en células sanas. Hasta la fecha, la gran mayoría de las terapias con CAR-T se han dirigido a CD19. CD19 se expresa en neoplasias malignas de células B, pero también se expresa en células B sanas. En este contexto, el tratamiento con CAR-T dirigido a CD19 puede tolerarse, sin embargo, los pacientes padecen un riesgo aumentado de infecciones, ya que su sistema inmunitario está significativamente comprometido. Este no es el caso para la mayoría de otros tipos de tumores, específicamente tumores sólidos, donde abordar el tejido sano sería intolerable.

Una limitación adicional de las terapias con CAR-T ensayadas clínicamente hasta la fecha, es la aparición de recaída debido al desarrollo de resistencia a la terapia con CAR-T. Esto se ha observado en ensayos clínicos de terapia con CAR-T dirigida a CD19 y se consigue mediante la aparición de células cancerosas que muestran empalme alternativo y/o mutaciones perjudiciales del gen diana (CD19). Estas "variantes de escape" dan como resultado una proteína diana modificada (CD19) que no es reconocible por la porción scFv del CAR (mientras que conserva suficiente funcionalidad del gen). Esto es una limitación de cualquier enfoque dirigido individual; en el contexto de células en proliferación, es decir, cáncer, esto proporciona una presión selectiva positiva para anular la expresión del antígeno diana.

La presente invención aprovecha la capacidad natural de las células T $\gamma\delta$ de reconocer específicamente células agredidas/enfermas (es decir, células cancerosas o células infectadas) en combinación con la potente función efectora citotóxica dirigida a antígeno de la tecnología de receptores de antígeno quiméricos. Un linfocito T $\gamma\delta$ transducido con un CAR clásico presenta funciones efectoras potenciadas contra células diana que expresan el antígeno activador de CAR y persistencia aumentada *in vivo*. Los autores de la invención consideran que las células T gamma delta modificados con CAR podrían hacer que las células cancerosas o infectadas, que pueden ser resistentes a las células T $\gamma\delta$ normales, fueran susceptibles a la destrucción mediada por células T $\gamma\delta$. Adecuadamente, sin el deseo de quedar ligados a teoría alguna, los autores de la invención consideran que un linfocito T $\gamma\delta$ que coexpresa un CAR clásico podrá reconocer y, por lo tanto, dirigir a la citólisis, las células que expresan fosfoantígenos o un antígeno dirigido a CAR, aumentando, por tanto, la gama de células que pueden abordarse por dichos células T gamma delta modificados. Se considera además que una limitación de las terapias de CAR-T existentes, el desarrollo de resistencia debido a la selección positiva de células cancerosas que no expresan el antígeno de CAR, se mitigará mediante células T $\gamma\delta$ que expresan CAR que tendrán especificidad antigénica doble. Adecuadamente, dichos células T gamma delta modificados con CAR podrían proporcionarse a un sujeto alogénico, es decir, un sujeto diferente a aquel del que se obtuvieron por primera vez las células T gamma delta.

Como apreciarán los expertos en la técnica, los efectos obtenidos al proporcionar una o más secuencias de CAR a un linfocito T $\gamma\delta$ y el uso del mismo como se analiza en la presente memoria, pueden obtenerse adecuadamente al proporcionar una secuencia de CAR a una célula similar a linfocito T $\gamma\delta$. Adecuadamente, una célula similar a linfocito T $\gamma\delta$ puede incluir cualquier célula genomanipulada para que exprese un TCR $\gamma\delta$ funcional. Por ejemplo, un linfocito T $\alpha\beta$ o un linfocito NKT genomanipulado para que exprese un TCR $\gamma\delta$ funcional que redirige de este modo la especificidad de la célula a antígenos de TCR $\gamma\delta$ definidos, tales como IPP en el contexto de un TCR Vgamma9Vdelta2.

Se considera que la tecnología CAR-T convencional está obstaculizada por una serie de problemas de seguridad que dificultan el éxito del enfoque cuando se aplica *in vivo*, concretamente, toxicidad "en la diana", pero "fuera del tumor", debido a la expresión del antígeno activador de CAR en tejidos sanos. Se proporciona un linfocito T gamma delta modificado con CAR en donde el dominio CD3 ζ se ha eliminado o convertido en no funcional, mientras que conserva la función de reconocimiento de antígeno independiente del MHC (por ejemplo, mediante el scFv) y la función coestimuladora (mediante uno o más dominios coestimuladores).

Un dominio CD3zeta no funcional o inactivo no puede proporcionar la señal 1 como se analiza en la presente memoria. Adecuadamente, se puede proporcionar un linfocito T $\gamma\delta$ modificado que comprende un receptor de antígeno quimérico en donde el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión a antígeno extracelular con especificidad de unión por un antígeno asociado a enfermedad, una bisagra, un dominio transmembranario, una o más regiones de señalización coestimuladoras y ausencia de un dominio que proporciona señal 1 funcional. Como apreciará un experto en la técnica, la señal 1 puede proporcionarse por un dominio CD3 zeta o similar.

En dichas realizaciones, el CAR no puede proporcionar la señal 1, mientras conserva la función de la señal 2 a partir la presencia de uno o más dominios coestimuladores. Ventajosamente, esto da lugar a la incapacidad de que el CAR provoque una función efectora citotóxica en ausencia de una señal de TCR/señal 1. Sin el deseo de quedar ligados a teoría alguna, los autores de la invención consideran que, aunque este diseño de CAR sería ineficaz en una población de células T $\alpha\beta$ policlonales debido a la falta de señal 1, la expresión de dicho CAR en una población de células T $\gamma\delta$ expandida *in vitro* proporciona un CAR eficaz cuando se activa el TCR $\gamma\delta$. En realizaciones, puede proporcionarse un linfocito T $\gamma\delta$ que expresa CAR, en que el dominio CD3 ζ de CAR se ha eliminado o hecho inactivo o no funcional, del isotipo V γ 9V δ 2. En dichas realizaciones, la señal 1 puede proporcionarse mediante estimulación con fosfoantígeno del TCR V γ 9V δ 2. En dichas realizaciones, adecuadamente solo en presencia de fosfoantígenos el CAR puede provocar la citólisis mediada por células y la producción de citocinas. Adecuadamente, dicho diseño de CAR puede

aprovechar la especificidad definida de las células T V γ 9V δ 2 hacia fosfoantígenos (presentes solo en células agredidas) y permitir la activación que puede ajustarse mediante señalización de receptores de células T.

En realizaciones, se propone un linfocito T gamma delta de la presente invención, en particular una célula o poblaciones celulares V γ 9V δ 2 de células T gamma delta pueden modificarse para que comprendan un receptor de antígeno quimérico para dirigir el linfocito T gamma delta contra un antígeno o proteína particular (una o más dianas de superficie celular (en donde la una o más dianas de superficie celular puede incluir uno o más ligandos encontrados en un entorno celular particular (es decir, entorno tumoral), pero no ligados a una célula diana)). En realizaciones, la diana de superficie celular puede estar unida a la célula diana. Esto permite que el linfocito T gamma con receptor de antígeno quimérico (CAR) se acerque a la célula diana, en particular una célula diana que incluye la diana de superficie celular y desencadene la activación del linfocito T gamma delta. Dichos células T gamma con receptor de antígeno quimérico (CAR) forman un aspecto de la presente invención.

En realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno de la construcción de CAR puede ser un fragmento variable monocatenario (scFv) o un dominio de unión a fragmento-antígeno (Fab) seleccionado de colecciones que reconocen específicamente y pueden unirse a una diana de superficie celular o ligando natural que acopla su receptor afín en la célula diana.

En realizaciones, un antígeno de enfermedad unido por un receptor de antígeno quimérico como se analiza en la presente memoria puede ser una diana de superficie celular, un antígeno asociado a enfermedad, por ejemplo, un antígeno asociado con una patología, por ejemplo, en cáncer o en una infección en donde el antígeno asociado a enfermedad puede estar sobre o en la proximidad de una célula a abordar por el linfocito T $\gamma\delta$, de modo que el linfocito T $\gamma\delta$ pueda dirigirse a dicha célula a abordar. En realizaciones, una diana de superficie celular puede ser un antígeno encontrado en una infección celular, infección bacteriana, infección fúngica o infección protozoaria o puede ser un fragmento vírico activo o inactivado, un péptido, una proteína, un segmento antigénico o similar de dicho virus. Como alternativa, la diana de superficie celular puede incluir un antígeno específico de tumor y/o antígeno asociado a tumor.

En realizaciones, el CAR, por ejemplo, el scFv proporcionado en la superficie extracelular del linfocito T gamma delta, puede conectarse mediante un espaciador o fusionarse directamente a un dominio transmembranario que atraviesa la membrana celular y se conecta a un dominio de señalización intracelular.

En realizaciones, el CAR, por ejemplo, el scFv, puede fusionarse mediante un dominio transmembranario a un CD3 zeta (proporcionando la señal 1) y un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor coestimulador (ITAM) (señal 2).

En general, se considera que un CAR redirige la especificidad de las células T a la diana de superficie celular y supera problemas relacionados con la tolerancia de las células T. Como se apreciará, la diana de superficie celular típicamente puede seleccionarse para garantizar la dirección del linfocito T gamma delta hacia células de interés, por ejemplo, células tumorales o células infectadas por virus, con preferencia respecto a las células sanas.

Como se apreciará, tanto en, por ejemplo, una célula tumoral diana como en tejido normal, donde se expresa una diana de superficie celular, la tecnología de receptores de antígeno quiméricos, aunque altamente potente, puede ser susceptible a "toxicidad en la diana, fuera del tumor".

Como se analiza anteriormente, en sistemas de dirección de CAR donde el receptor de antígeno quimérico fusiona los componentes de la señal 1 y la señal 2 en una sola construcción, pueden proporcionar respuestas efectoras dependientes de diana altamente potentes y sensibles. Sin embargo, dichos sistemas de dirección a CAR no son ajustables al nivel de diana de superficie celular expresada en una célula diana.

Se considera que el reconocimiento mediado por TCR V γ 9V δ 2 proporciona una estrategia de dirección independiente de CAR adicional que permite que la respuesta de CAR se "ajuste" de modo que una señal estimuladora procedente del CAR se traducirá en una respuesta funcional solo en el contexto de la estimulación de TCR V γ 9V δ 2. Esto permite, por ejemplo, que una amplia gama de dianas tumorales (dianas de la ruta relacionada con agresión por HMBPP/IPP) se aborden con una diana adicional de superficie celular por un linfocito T gamma delta modificado con CAR. Estos células T gamma delta modificados con CAR de la invención proporcionan una respuesta ajustable, en donde, para una dosis dada de antígeno asociado a tumor, pirofosfato/fosfonato (fármaco), se genera una respuesta de intensidad de señal 1 subóptima, con una capacidad de sinergia con la señal 2 de un "CAR coestimulador" específico.

En realizaciones, pueden usarse ensayos de activación *in vitro* para determinar dosis de fármaco relevantes para una "respuesta de ajuste" óptima, para permitir la discriminación máxima entre líneas tumorales diana que expresan altos niveles del antígeno asociado a tumor (mayor intensidad de señal 2) y células no transformadas relevantes que expresan niveles más bajos (generando menor intensidad de señal). En realizaciones, se podrían utilizar múltiples CAR para abordar diferentes tipos de tumor/célula. Dichos CAR múltiples podrían proporcionarse en un linfocito T gamma delta, en particular célula V γ 9V δ 2, o podrían generarse múltiples células T gamma delta, en particular células V γ 9V δ 2, con diferentes CAR en cada célula (un banco de tratamiento) y la respectiva célula gamma delta con CAR podría usarse para un tipo de tumor y/o célula particular.

Se considera que la expresión de un TCR $\gamma\delta$ heterodimérico en un linfocito T gamma delta que no reconoce moléculas de MHC significa que dichas células gamma delta pueden montar una respuesta efectora potente. En particular, dichas células (por ejemplo, V γ 9V δ 2) pueden ser altamente citotóxicas, produciendo altos niveles de citocinas Th1 que incluyen IFN γ y TNF α .

5 En realizaciones, un linfocito T gamma delta puede comprender además un receptor de antígeno quimérico inhibidor (ICAR), en donde el ICAR minimiza la activación en células inespecíficas, por ejemplo, células no tumorales en donde la diana de superficie celular es un antígeno asociado a tumor, pero no específico de tumor. Para minimizar, por ejemplo, dicha "toxicidad sobre la diana, fuera del tumor", la presencia de un segundo antígeno en una célula
10 inespecífica que puede unirse por el CAR inhibidor provocará que se inhiba la señal proporcionada por cualquier unión del CAR a la diana de superficie celular.

En realizaciones, la célula gamma delta puede comprender un CAR adicional que puede unirse a un antígeno diferente presente en una célula diana o a proteínas de señalización solubles presentes en, por ejemplo, un tumor o entorno celular infectado víricamente, por ejemplo, IL-12 que puede estimular la activación y reclutamiento de células T gamma delta.

15 En realizaciones, el linfocito T gamma delta con al menos un primer receptor de antígeno quimérico y opcionalmente al menos un primer receptor de antígeno quimérico inhibidor, es un linfocito T V γ 9V δ 2.

Proporcionar un receptor de antígeno quimérico a un linfocito T gamma delta puede ser por medios conocidos en la técnica para proporcionar receptores de antígeno quiméricos a células T.

20 Según un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un proceso para proporcionar un linfocito T $\gamma\delta$ modificado con CAR según la reivindicación 7. Adecuadamente, en donde un ácido nucleico como se analiza en la presente memoria se incorpora/transduce en un linfocito T $\gamma\delta$ para modificar genéticamente el linfocito T $\gamma\delta$. Adecuadamente, el proceso puede utilizar una construcción de CAR lentivírica. Adecuadamente, el proceso transduce simultáneamente una construcción de CAR en una célula, y expande selectivamente las células T $\gamma\delta$ transducidos con CAR.

25 Se consideran realizaciones del proceso que permitirán que se proporcione un CAR "con TCR ajustable" o "coestimulador".

Como se analiza anteriormente, en dichas realizaciones, las células T $\gamma\delta$ que expresan un CAR coestimulador se activarán solo en presencia de fosfoantígenos (presentes en la superficie celular durante infección o cáncer) pero no por células sanas. Se considera que esto evitará la toxicidad "en la diana", pero "fuera del tumor" observada en terapias convencionales con CAR-T. En dichas realizaciones, se considera que la actividad del CAR coestimulador puede
30 ajustarse mediante la señalización concomitante del TCR a través del receptor de células T $\gamma\delta$.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR puede incluir una secuencia líder que dirigirá la proteína a la membrana celular (tal como la señal secretora de GMCSF-R o CD8), un dominio de unión a antígeno, un dominio de bisagra y transmembranario, una o más regiones de señalización coestimuladoras y la ausencia de un dominio de señalización CD3 zeta. Como se analiza en la presente memoria, la ausencia de un dominio de señalización CD3 zeta
35 puede proporcionarse mediante un dominio CD3 zeta inactivo o no funcional.

Cuando se ha omitido el dominio CD3 zeta, el CAR es un CAR "coestimulador" o "con TCR ajustable".

Una secuencia de ácido nucleico que codifica el CAR "clásico" o "no ajustable" puede comprender un scFv que reconoce la proteína CD19 de células B. Un CAR "clásico" puede comprender la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1, que puede codificar adecuadamente las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2 a 6.

40 Cuando una secuencia de ácido nucleico codifica el CAR "coestimulador" o "con TCR ajustable", el ácido nucleico puede comprender un scFv que reconoce la proteína CD19 de células B. En realizaciones específicas, la secuencia de ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7, que puede codificar las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 8 a 11.

45 Un ácido nucleico puede codificar un dominio de unión a antígeno extracelular que es un único scFv que reconoce específicamente y puede unirse a una diana de superficie celular. Adecuadamente, en realizaciones, el dominio de unión al antígeno extracelular, preferiblemente un scFv, reconoce y se une al clon descrito previamente de antígeno CD19 de células B conocido como FMC63 (Nicholson IC *et al.*, 1997).

50 En realizaciones, el dominio de unión a antígeno del CAR se une a una diana de superficie celular, antígeno tumoral y/o antígeno asociado a tumor. En realizaciones, una diana de superficie celular puede ser un antígeno encontrado en una infección celular, infección bacteriana, infección fúngica, infección protozoaria o infección vírica o puede ser un fragmento vírico activo o inactivado, un péptido, una proteína, un segmento antigénico o similar de dicho virus.

- Adecuadamente, en realizaciones de la presente invención, el dominio de unión a antígeno extracelular puede reconocer y unirse a un antígeno específico de tumor que está presente solo en células tumorales y no en cualquier otra célula y/o un antígeno asociado a tumor que está presente en algunas células tumorales y también algunas células normales. Dichos antígenos específicos de tumor pueden incluir, pero no se limitan a, CD19, EGFRvR111, ErbB2, GM3, GD2, GD3, CD20, CD22, gp100, NY-ESO-1, anhidrasa carbónica IX, WT1, antígeno carcinoembrionario, CA-125, MUC-1, MUC-3, antígeno tumoral epitelial y un antígeno de tipo MAGE que incluye MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA12, MAGEC2, BAGE, GAGE, XAGE1B, CTAG2, CTAG1, SSX2 o LAGE1 o antígenos víricos o combinaciones de los mismos o proteínas modificadas postraduccionalmente que pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas carbamiladas y citrulinadas.
- En realizaciones, el antígeno de superficie celular puede ser un ligando de punto de control inmunitario, por ejemplo, PD-L1.
- En realizaciones, el dominio de unión a antígeno puede ser la porción extracelular de un receptor de superficie celular que luego se fusiona a los dominios transmembranario y coestimulador como se describe anteriormente.
- En realizaciones, el dominio transmembranario del CAR puede comprender uno o más de los dominios transmembranarios de CD3 o CD4 o CD8 o CD28.
- En realizaciones, la región de señalización coestimuladora del CAR puede comprender uno o más de los dominios intracelulares de CD28, CD137 (4-1BB), ICOS, CD27, OX40, LFA1, PD-1, CD150, CD244, NKG2D.
- Adecuadamente, las células T $\gamma\delta$ para su uso en la invención pueden generarse a partir de leucocitos monomorfonucleares de la sangre (BMC) o biopsias de cáncer o tejidos infectados. Adecuadamente, se pueden obtener BMC mediante cualquier método de centrifugación en densidad conocido por los expertos en la técnica a partir de sangre completa, material de leucocitaféresis o sangre de cordón umbilical (UCB). Los métodos de centrifugación en densidad pueden incluir, pero no se limitan a, gradiente de Ficoll o Lymphoprep. Además, el aislamiento celular puede realizarse mediante clasificación celular activada magnéticamente (MACS) o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).
- Adecuadamente, en realizaciones, las células T $\gamma\delta$ pueden expandirse a partir de leucocitos monomorfonucleares de sangre periférica (PBMC), leucocitos monomorfonucleares de sangre de cordón umbilical (CBMC) o células derivadas de tejido en un medio de cultivo químicamente definido que puede incluir, pero no se limita a, medio RPMI, TexMACS, IMDM, CTS OpTmizer o AIM-V. El medio de cultivo celular puede complementarse con suero fetal de ternero (FCS), suero AB humano, plasma autólogo, lisado plaquetario humano o sustitutos de sustitución de suero químicamente definidos, por ejemplo. Además, se añade suero/plasma/sustituto en una cantidad de un 0,1 a un 20 % (v/v) a la solución de cultivo.
- Adecuadamente, en realizaciones, las células T $\gamma\delta$ del subtipo Vgamma9 pueden expandirse selectivamente a partir de PBMC o CBMC o células derivadas de tejido en un medio de cultivo químicamente definido, que incluye IL-2, suero/plasma y activación al proporcionar un aminobisfosfonato tal como ácido zoledrónico. Pueden usarse múltiples isotipos de TCR $\gamma\delta$ de cualquier emparejamiento de TCR gamma delta de Vy1-9 y V δ 1-8. Los expertos en la técnica entenderán que las condiciones de cultivo, específicamente el método de activación de TCR, definirán el isotipo a expandir. A modo de ejemplo, las células T δ 2 se activan y expanden mediante aminobisfosfonatos y similares, mientras que las células T δ 1 pueden expandirse preferentemente usando ligandos de NKG2D tales como MICA o MICB. Los PBMC/CBMC aislados pueden aislarse recientemente o crioconservarse antes de la expansión en cultivo.
- Un bisfosfonato es un análogo de ácido pirofosfórico y es un compuesto en que el O (átomo de oxígeno) de la cadena principal del ácido pirofosfórico P-O-P está sustituido con C (átomo de carbono) (P-C-P). En general, se usa como fármaco terapéutico para la osteoporosis. El aminobisfosfonato se refiere a un compuesto que tiene N (átomo de nitrógeno) entre los bisfosfonatos. Por ejemplo, el aminobisfosfonato usado en la presente invención no está particularmente limitado; ejemplos del mismo incluyen ácido pamidrónico, su sal y/o su hidrato, ácido alendrónico, su sal y/o su hidrato, y ácido zoledrónico, su sal y/o su hidrato. La concentración de los aminobisfosfonatos es preferiblemente de 1 a 30 μ M para el ácido pamidrónico, su sal y/o su hidrato, de 1 a 30 μ M para el ácido alendrónico, su sal y/o su hidrato, y de 0,1 a 10 μ M para el ácido zoledrónico, su sal y/o su hidrato. En este caso, se añade ácido zoledrónico 5 μ M como ejemplo.
- Adecuadamente, la citocina IL-2 también puede incluirse a 50 UI/ml hasta 2000 UI/ml, más preferiblemente de 400 UI/ml a 1000 UI/ml. Adecuadamente, el cultivo también puede complementarse con una o más citocinas tales como IL-15, IL-18 o IL-21 a 50 UI/ml hasta 2000 UI/ml.
- Adecuadamente, proporcionar antígeno mediante aminobisfosfonato puede sustituirse con antígenos sintéticos tales como pirofosfato de isopentenilo (IPP), fosfostim/ pirofosfato de bromohidrina (BrHPP), pirofosfato de (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo (HMBPP) o DMAPP. La estimulación antigénica también puede proporcionarse cocultivando con células presentadoras de antígeno irradiadas y/o artificiales (aAPC). La adición de dichos componentes proporciona un entorno de cultivo que permite la selección positiva de células T gamma delta típicamente a un 70 %-100 % en número total de células en la muestra de cultivo.

La expansión de las células T γδ también puede estimularse con uno o más anticuerpos contra CD3, TCR gamma delta, CD28 y CD137. Estos pueden ser solubles, estar unidos a la placa o conjugados a microesferas apropiadas, tales como Dynabeads o MACSibeads. Las células T γδ pueden propagarse y expandirse usando cualquiera de las metodologías descritas previamente.

- 5 Adecuadamente, las células que expresan CAR pueden expandirse selectivamente con el uso de una proteína recombinante reconocida por el CAR, por ejemplo, quimera de CD19-Fc recombinante o CD19 recombinante en el caso de un CAR dirigido a CD19. Esta puede estar unida a la placa, ser soluble o estar sobre microesferas apropiadas, tales como Dynabeads o MACSibeads. Las células T γδ de cualquier isotipo pueden expandirse selectivamente durante un marco de tiempo de al menos 7 días, más preferiblemente 14 días. Adecuadamente, el periodo de cultivo se puede realizar durante aproximadamente 9 días o más para conseguir altos números de poblaciones de células T gamma delta que expresan CAR sustancialmente purificadas. Las células T γδ se pueden expandir usando antígenos de TCR o ligandos de NKG2D tales como MICA o MICB. Los PBMC aislados pueden aislarse recientemente o criopreservarse antes de la expansión en cultivo. Las células T γδ expandidos pueden criopreservarse y reanimarse en un punto temporal posterior para una expansión adicional en cultivo.
- 10
- 15 El método de modificación genética de un linfocito T γδ para incorporar el ácido nucleico que codifica un diseño de CAR puede incluir cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Las metodologías adecuadas incluyen, pero no se limitan a, transducción vírica con lentivirus/retrovirus/adenovirus, transfección celular por electroporación, reactivos de transfección basados en lípidos, nanopartículas, métodos de transfección basados en cloruro de calcio o transposones derivados de bacterias.
- 20 En realizaciones en que se pueden emplear lentivirus/retrovirus/adenovirus para la transducción, puede usarse la inclusión de reactivos químicos como entenderían los expertos en la técnica para potenciar este proceso. Estos incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, bromuro de hexadimetilina (Polybrene), fibronectina humana recombinante (tal como RetroNectin-Takara Clontech) y TransPlus Virus Transduction Enhancer (ALSTEM Cell Advancements).
- 25 Adecuadamente, la incorporación de ácido nucleico que codifica un CAR puede introducirse en PBMC, CBMC o células T γδ expandidos derivadas de tejido en cualquier punto temporal durante el periodo de cultivo.
- La detección de la eficiencia de la transducción y expresión de las construcciones de CAR por las células T γδ puede incluir cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica y puede incluir, pero no se restringe a, PCR cuantitativa y métodos de detección basados en anticuerpos tales como citometría de flujo o inmunoelectrotransferencia.
- 30 En la presente memoria se describe un método para detectar entre CAR clásico y CAR coestimulador usando al menos un par de cebadores seleccionados del grupo SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, y SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15.

Directo (SEC ID No 12)	5'-GCTCCTGCACAGTGACTACAT-3'
Inverso (SEC ID No 13)	5'-GGAGTTTCTTTCTGCCCCGT-3'

Directo (SEC ID No 14)	5'-CTGTAGCTGCCGATTTCAG-3'
Inverso (SEC ID No 15)	5'-CATCGTACTCCTCTTCGTCC-3'

Adecuadamente, dicho método puede permitir la detección cuantitativa de CAR clásico y CAR coestimulador. Adecuadamente, dicho método permite la discriminación entre CAR clásico y CAR coestimulador.

- 35 Puede emplearse citometría de flujo, por ejemplo, puede usarse un anticuerpo contra el idiotipo del scFv, que está conjugado con un fluorocromo o antígeno que puede detectarse con un reactivo secundario, tal como estreptavidina marcada fluorescentemente. El reactivo usado para detectar el CAR puede ser una proteína quimérica que comprende la proteína recombinante reconocida por el CAR, fusionada con una fracción Fc de anticuerpo de mamífero, por ejemplo, quimera de CD19-Fc. Esto puede detectarse con un anticuerpo contra la porción Fc de la proteína. Estos reactivos pueden combinarse con anticuerpos conjugados con fluorocromo contra marcadores de inmunofenotipado que pueden incluir, pero no se limitan a, Vgamma9, CD3, TCR gamma delta, TCR alfa beta, CD4, CD8 y CD56.
- 40

Métodos de tratamiento usando células gamma delta modificadas con CAR

En realizaciones del segundo aspecto de la invención, puede administrarse un CAR ajustable/coestimulador a un paciente para tratar una enfermedad tal como una infección vírica, bacteriana, fúngica o protozoaria o cáncer.

- 45 En realizaciones, un CAR ajustable/coestimulador que se expresa en uno o más células T γδ puede coadministrarse a un sujeto con un aminobisfosfonato, o sustituto del mismo, en donde el sustituto puede potenciar los niveles de fosfoantígenos presentes en las células diana mediante desregulación de la ruta fisiológica del mevalonato. Se considera que tal coadministración puede ser ventajosa para aprovechar el reconocimiento del TCR Vγ9Vδ2 para

permitir la valoración "ajustable con fármaco" de la intensidad de la señal 1 del TCR yδ acoplado al fosfoantígeno. El CAR ajustable/coestimulador puede proporcionar una señal 2 novedosa restringida a células en función del antígeno asociado a enfermedad abordado por el CAR.

En realizaciones específicas, para un antígeno asociado a enfermedad dado, una dosis de aminobisfosfonato o un sustituto del mismo puede adaptarse para generar una intensidad de señal 1 subóptima, para que sinergice con la señal 2 de un CAR ajustable/coestimulador específico. Podría usarse activación *in vitro* para estimar las dosis de fármaco relevantes para el "ajuste" óptimo, para permitir la discriminación máxima entre líneas celulares que expresan antígeno asociado a enfermedad que expresan altos niveles del antígeno (mayor intensidad de señal 2) y células no transformadas que expresan niveles más bajos (generando menor intensidad de señal 2). Por ejemplo, el aminobisfosfonato coadministrado usado en la presente invención puede incluir ácido zoledrónico, su sal y/o su hidrato, ácido alendrónico, su sal y/o su hidrato, y ácido pamidrónico, su sal y/o su hidrato.

Se considera que el uso alogénico de las células T gamma delta de la presente invención en terapia, en donde dichas células gamma delta usan células T gamma delta modificados con CAR de la presente invención no se ha considerado típicamente debido a posibles problemas relacionados con el rechazo mediado por el sistema inmunitario. Los autores de la invención consideran que las células T gamma delta típicamente no provocan enfermedad de injerto contra hospedador, y que la selección de células T gamma delta para trasplante alogénico permitiría que las células T se proporcionaran a un destinatario con un riesgo mínimo de enfermedad de injerto contra hospedador. Se considera que, como las células T gamma delta no están restringidas por el MHC, el trasplante alogénico será una terapia viable en donde las células T gamma delta pueden dirigirse a células para la citólisis independientemente del haplotipo del MHC. En vista de la falta de reconocimiento de antígenos presentados por MHC por las células T gamma delta, los autores de la presente invención consideran que el riesgo de GVHD se minimizaría en una transferencia alogénica de alta pureza de células T gamma delta suficientemente purificados de otros leucocitos incluyendo células B y células T con receptor de células T (TCR) alfa beta. Adicionalmente, se considera que habrá una baja probabilidad de rechazo del injerto debido al estado inmunodeprimido del receptor en determinadas patologías, incluyendo, pero sin limitarse a, pacientes con infecciones víricas graves, por ejemplo, virus del Ébola, VIH y gripe, así como pacientes con PTLDBV y aquellos con otros tipos de cáncer.

Como se indica, las estrategias de tratamiento previas han incluido la eliminación de células T de la sangre del donador, en particular de la sangre periférica, usando una metodología de selección negativa o de selección positiva, antes del trasplante alogénico de células madre.

Se proporciona un método de tratamiento que comprende: la recogida de células de un sujeto donador, el procesamiento de dichas células donadoras para permitir que se proporcionen números suficientes de células T gamma delta de manera alogénica a un sujeto destinatario, en donde dicho procesamiento incluye la etapa de modificar las células T gamma delta para que incorporen un receptor de antígeno quimérico de modo que las células T gamma delta modificadas puedan proporcionarse a los sujetos alogénicos para ejercer un efecto terapéutico al sujeto destinatario.

A modo de ejemplo, el método de expansión de células T gamma delta puede comprender el aislamiento de leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la sangre o material de leucocitaféresis usando centrifugación en gradiente de densidad. Los PBMC aislados pueden criopreservarse antes de la expansión en cultivo, mientras que el plasma se coextrae y conserva como un excipiente autólogo para su uso en etapas de cultivo de células T gamma delta posteriores. En realizaciones, los PBMC recién aislados (o los reanimados de la criopreservación) pueden inocularse en medios de crecimiento que contienen IL-2 recombinante humana (por ejemplo, a una concentración de hasta 1000 U/ml) y ácido zoledrónico (por ejemplo, 5 µM). La población de linfocitos T yδ puede activarse y proliferar selectivamente a partir de los PBMC mediante la adición de ácido zoledrónico (día 0) y la inclusión continua de IL-2 durante un periodo de cultivo de 14 días. La suspensión celular puede expandirse en serie (típicamente a una relación de división de 1:2) durante este periodo de tiempo. A los 14 días después del inicio del cultivo, las células pueden recogerse y resuspenderse en solución de Ringer lactato y HSA antes de transferirlas a un frasco de infusión que contiene 100 ml de solución salina. Como alternativa, las células pueden criopreservarse para su reanimación en un momento posterior.

Después de la expansión, en realizaciones, el producto de células T gamma delta cumple las siguientes especificaciones mínimas; más de un 80 % de los linfocitos totales son células T (CD3 positivos), los linfocitos T gamma delta comprenden un 60 % o más de la población total de linfocitos T (Vgamma9 positivos), las células NK son menos de un 25 % de la población total de linfocitos T (CD3 negativos/CD56 positivos), las células T citotóxicas están por debajo de un 10 % de la población total de linfocitos T (CD3/CD8 positivos) y las células T auxiliares están por debajo de un 5 % de la población total de linfocitos T (CD3/CD4 positivos). En realizaciones, las poblaciones celulares que cumplen estas especificaciones pueden usarse como material de partida para la generación de bancos de células alogénicas de alta pureza que tendrán como objetivo tener más de un 99 % de células T gamma delta.

Se proporciona un proceso para proporcionar células T gamma delta de manera alogénica a un segundo sujeto, que comprende las etapas

- proporcionar una muestra de células T gamma delta de un primer sujeto;

- cultivar las células T gamma delta para permitir que se administren a un segundo sujeto, en donde las células T gamma delta se modifican para proporcionar células T gamma delta modificados con CAR.

La etapa de proporcionar puede incluir una etapa de recoger células T gamma delta de un primer sujeto. La recogida puede ser de un sujeto donador en donde el sujeto donador no tiene afecciones percibidas inmediatas. Adecuadamente, el sujeto destinatario puede ser un vertebrado, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano, o ganado comercialmente valioso, un animal de investigación, un caballo, vaca, cabra, rata, ratón, conejo, cerdo y similares. En realizaciones, el primer y segundo sujetos pueden ser humanos. Como se entenderá, en el contexto de la presente invención, el primer sujeto es un sujeto donador del que se recogen células T gamma delta, y las células se usan en el tratamiento alogénico de un segundo sujeto diferente (destinatario). Adecuadamente, el primer sujeto tiene un estado prepatológico. El término estado "prepatológico", como se usa en la presente memoria, cubre el término absoluto de "sano", "sin enfermedad", y el término relativo de "una graduación en una posible progresión de la enfermedad", "más sano que" o "menos enfermo que" un estado pospatológico. Dado que la "prepatología" puede definirse por un tiempo antes de que el primer sujeto se diagnostique con una enfermedad, el primer sujeto puede estar sano en términos absolutos o podría tener ya la enfermedad, donde la enfermedad aún no se manifiesta o se ha diagnosticado o detectado. En realizaciones, el proceso puede comprender la etapa de cultivar células T gamma delta obtenidos del primer sujeto para permitir que las células T gamma delta se proporcionen al segundo sujeto.

Las células T gamma delta pueden recogerse de sangre periférica o leucocitos monomorfonucleares de sangre periférica obtenidas después de aféresis o leucocitaféresis o de sangre de cordón umbilical. La expansión *ex vivo* de las células T gamma delta de la sangre periférica dará lugar preferentemente a células T gamma delta del fenotipo V γ 9V δ 2 cuando se activan con fosfoantígenos o aminobisfosfonatos. El uso de sangre de cordón umbilical como material de partida para expansión *ex vivo* permite la expansión selectiva de varios subtipos de receptores de células T (TCR) dependientes del antígeno activador. Estos isotipos de TCR pueden incluir cualquier emparejamiento de TCR gamma delta de V γ 1-9 y V δ 1-8, por ejemplo, pero sin limitarse a, variantes de TCR V δ 1, V δ 2 y V δ 3. Las células T gamma delta de subtipos diferenciados reconocen antígenos distintos y, por lo tanto, presentarían diferentes niveles de citotoxicidad dependiendo de los antígenos presentados por las células diana. Las abundancias relativas de cada subtipo de TCR delta dependen en gran medida de las condiciones de cultivo y los antígenos específicos presentados. Las condiciones de cultivo pueden adaptarse para expandir preferentemente un isotipo de TCR deseado a partir de sangre de cordón umbilical. Por ejemplo, las células T gamma delta que expresan un isotipo de TCR singular pueden ser más eficaces en el tratamiento de un tipo de cáncer particular o para el tratamiento de una infección vírica específica.

La etapa de recoger puede comprender la etapa de administrar al primer sujeto un agente potenciador de las células T gamma delta, antes de recoger las células T gamma delta del primer sujeto.

El método de recoger las células T gamma delta puede comprender la etapa de administrar al primer sujeto un agente potenciador tal como un factor de crecimiento que induce la movilización de glóbulos blancos desde la médula ósea, tal como G-CSF, un aminobisfosfonato, en particular ácido pamidróico, ácido alendróico, ácido zoledróico, ácido risedróico, ácido ibandróico, ácido incadrióico, una sal de los mismos y/o un hidrato de los mismos.

El procesamiento o el proceso puede comprender una cualquiera o más de las etapas de:

- proporcionar sangre, por ejemplo, sangre de cordón umbilical o células derivadas de aféresis/leucocitaféresis de un primer sujeto (donador),

- separar los leucocitos monomorfonucleares de sangre periférica de la sangre,

- añadir aminobisfosfonato y un antígeno diana a los leucocitos monomorfonucleares de sangre periférica, y

- cultivar los leucocitos monomorfonucleares de sangre periférica para proliferar/inducir células T citotóxicas (CTL) específicos de antígeno diana y células T gamma delta,

- modificar las células T gamma delta para proporcionar células T gamma delta modificados con CAR como se analiza en la presente memoria, y opcionalmente cocultivar los PBMC o CBMC o células T con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) para proliferar/inducir células T citotóxicas (CTL) específicos de antígeno diana y células T gamma delta.

Los autores de la presente invención consideran que proporcionar células T gamma delta que están sustancialmente aislados de otros componentes de la sangre completa reducirá el fracaso del injerto cuando esas células T gamma delta sustancialmente aislados se administren de manera alogénica a un segundo sujeto. En consecuencia, el proceso de la presente invención puede incluir una etapa de purificar células T gamma delta a partir de sangre completa, o componentes de la misma. Como menos de un 10 % de la sangre periférica en número total de células está compuesta por células T gamma delta, se considera que la purificación de una muestra de sangre completa, o componentes de la misma, por ejemplo, usando anticuerpos anticélulas T gamma delta, de modo que más de un 10 % en masa de la muestra consista en células T gamma delta, potencia la eficacia del tratamiento alogénico del sujeto destinatario. En consecuencia, el proceso para la presente invención puede incluir la etapa de purificar una muestra de sangre

completa, o componentes de la misma, para conseguir que un número mayor de un 10, 25, 50, 75, 85, 90, 95 o 98 % del número total de células en la muestra purificada sean células T gamma delta.

Cualquier método conocido por los expertos en la técnica que pueda purificar células T gamma delta de sangre completa, sangre umbilical o componentes de la misma, puede formar parte de la presente invención. Claramente, la etapa de purificación no debe afectar o afectar mínimamente a la viabilidad de las células T gamma delta. Por ejemplo, las siguientes etapas pueden usarse en combinación, o solas, para conseguir la purificación mencionada anteriormente de las células T gamma delta: - un proceso de diálisis (por ejemplo, aféresis y/o leucocitaféresis); centrifugación diferencial; crecimiento de células T gamma delta en cultivo (por ejemplo, crecimiento preferente en cultivo).

La etapa de purificación puede llevarse a cabo, al menos en parte, durante la etapa de cultivo. Por ejemplo, durante la etapa de cultivo, la adición de al menos uno o una combinación de componentes específicos tales como aminobisfosfonato, en particular ácido pamidrónico, ácido alendrónico, ácido zoledrónico, ácido risedrónico, ácido ibandrónico, ácido incadrónico, una sal de los mismos y/o un hidrato de los mismos permite que las células T gamma delta se expandan en un cultivo. La purificación durante el cultivo celular también puede conseguirse mediante la adición de antígenos sintéticos tales como fosfostim/pirofosfato de bromohalohidrina (BrHPP), pirofosfato de isopentenilo sintético (IPP), pirofosfato de (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo (HMB-PP) o cocultivo con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) (Wang *et al.*, 2011). La adición de tales componentes proporciona un entorno de cultivo que permite la selección positiva de células T gamma delta típicamente a un 70 % o mayor en número de células totales en la muestra purificada. La adición de dichos componentes proporciona un entorno de cultivo que permite la selección positiva de células T gamma delta típicamente a un 70 % en número de células totales en la muestra purificada.

Puede añadirse un aminobisfosfonato en cualquier momento desde el primer día de cultivo de las células T gamma delta. Puede añadirse un aminobisfosfonato a una concentración de 0,05 a 100 micromolar, preferiblemente de 0,1 a 30 micromolar, a los leucocitos mononucleares de sangre periférica. Adecuadamente, el bisfosfonato es un análogo de ácido pirofosfórico y es un compuesto en donde el O (átomo de oxígeno) de la cadena principal del ácido pirofosfórico P-O-P está sustituido con C (átomo de carbono) (P-C-P). En general, se usa como fármaco terapéutico para la osteoporosis. El aminobisfosfonato se refiere a un compuesto que tiene N (átomo de nitrógeno) entre los bisfosfonatos. Por ejemplo, el aminobisfosfonato usado en la presente invención no está particularmente limitado; pueden usarse aminobisfosfonatos y similares como se describe en los documentos WO 2006/006720 y WO 2007/029689. Ejemplos específicos de los mismos incluyen ácido pamidrónico, su sal y/o su hidrato, ácido alendrónico, su sal y/o su hidrato, y ácido zoledrónico, su sal y/o su hidrato. La concentración de los aminobisfosfonatos es preferiblemente de 1 a 30 μ M para el ácido pamidrónico, su sal y/o su hidrato, de 1 a 30 μ M para el ácido alendrónico, su sal y/o su hidrato, y de 0,1 a 10 μ M para el ácido zoledrónico, su sal y/o su hidrato. En este caso, se añade ácido zoledrónico 5 μ M como ejemplo.

Adecuadamente, cuando el periodo de cultivo es de 7 días o más, puede obtenerse un grupo celular que comprende células T gamma delta con alta pureza; sin embargo, el cultivo se realiza preferiblemente durante aproximadamente 14 días para aumentar más el número de células T gamma delta.

El periodo de cultivo puede ser de aproximadamente 7 días o más. Adecuadamente, el periodo de cultivo puede realizarse durante aproximadamente 14 días o más para conseguir un alto número de poblaciones de células T gamma delta sustancialmente purificados. El cultivo se realiza típicamente durante 14 días, después de lo que las células T gamma delta dejan de continuar en proliferación exponencial. Sin embargo, determinadas realizaciones proporcionan el cultivo prolongado y la expansión selectiva de células T gamma delta hasta mayores números. Dichas realizaciones incluyen proporcionar antígenos sintéticos al cultivo (por ejemplo, IPP sintético, DMAPP, Br-HPP, HMB-PP), exposición cíclica a células presentadoras de antígeno artificiales o irradiadas, proporcionar antígenos o anticuerpos inmovilizados o el uso de sangre de cordón umbilical como material de partida para el cultivo celular.

Adecuadamente, las células pueden cultivarse en este entorno durante un periodo de al menos 7 días para restablecer su perfil de receptores de superficie celular después de un mínimo de al menos dos duplicaciones de población.

Opcionalmente, la etapa de cultivar las células T gamma delta puede incluir etapas para cambiar el perfil de receptores de superficie celular de las células T gamma delta.

Por ejemplo, la etapa de cultivo puede implicar una o más subetapas que reducen o eliminan uno o más tipos de receptores de superficie celular de células T gamma delta presentes en las células T gamma delta proporcionados en la muestra del primer sujeto. Puede observarse que dichas etapas "restablecen" o "restablecen parcialmente" el perfil de receptores de las células T gamma delta de nuevo a una forma virgen o parcialmente virgen. Se contempla que dicho restablecimiento potencia la capacidad de las células T gamma delta de tratar el cáncer y la infección vírica. Se sabe que algunos receptores de células T pueden inducirse por la presencia de cáncer o virus en el sujeto del que derivan las células T, y se ha descubierto que estos receptores pueden inhibir, en algunos casos, la sensibilidad a un tumor o infección vírica por las células T. En consecuencia, la eliminación de dichos receptores puede aumentar la eficacia de las células T gamma delta de la presente invención.

La reducción o eliminación de uno o más tipos de receptores de células T gamma delta puede conseguirse mediante el proceso de la presente invención cultivando las células T gamma delta derivados del primer sujeto durante varios días, en que la población celular aumentó de tamaño varias veces. Por ejemplo, las células pueden cultivarse durante un periodo de al menos 7 días para restablecer su perfil de receptores de superficie celular tras un mínimo de al menos dos duplicaciones de población.

En casos donde el perfil de receptores de superficie celular de células T gamma delta se ha restablecido, los receptores de superficie celular que estaban presentes en células gamma delta primarias no cultivadas, tales como los receptores de superficie celular específicos de tumor B7-H1/PD-L1, B7-DC/PD-L2, PD-1 y CTLA-4 pueden estar ausentes o reducidos sustancialmente en número durante el periodo de expansión de cultivo.

La etapa de cultivo puede incluir además una etapa de supervisar el perfil de receptores de superficie celular de las células T gamma delta para determinar la duración apropiada de la etapa de cultivo requerida para disminuir o eliminar significativamente los receptores de superficie celular de células T gamma delta seleccionados (por ejemplo, uno cualquiera o cualquier combinación de los receptores analizados anteriormente). El proceso de supervisar los receptores de células T gamma delta puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando técnicas de citometría de flujo, tales como las descritas por Chan *et al.*, Genes and Immunity (2014) 15, 25 a 32. En resumen, se usarán anticuerpos específicos para receptores y/o ligandos inhibidores del punto de control inmunitario para identificar subpoblaciones de células T gamma delta (coteñidos con anti-Vgamma9, por ejemplo) que expresan inhibidores del punto de control inmunitario en su superficie celular.

Adicionalmente, u opcionalmente, la etapa de cultivo de la presente invención puede incluir etapas que inducen la expresión en las células T gamma delta de tipos de receptores de superficie celular de células T gamma delta que no estaban presentes en la superficie de las células gamma delta no cultivadas cuando se extrajeron del primer sujeto, o etapas que inducen un aumento en la cantidad de expresión de tipos de receptores de superficie celular que estaban presentes en la superficie de las células gamma delta no cultivadas cuando se extrajeron del primer sujeto. Esto puede conseguirse exponiendo las células T gamma delta a un antígeno derivado de un cáncer, bacteria, hongo, protozoo o un virus. Este antígeno puede añadirse al medio de expansión de cultivo para aumentar la eficacia, el potencial de presentación de antígeno y la citotoxicidad de las células T gamma delta expandidos. Adecuadamente, los antígenos pueden proporcionarse en diversos formatos, incluyendo, pero sin limitarse a, antígenos o anticuerpos inmovilizados, líneas celulares tumorales irradiadas, células presentadoras de antígeno artificiales y adición de antígenos solubles sintéticos. El antígeno puede añadirse al medio de expansión de cultivo el primer día de cultivo. En realizaciones, el virus puede seleccionarse de gripe, VIH, hepatitis C, hepatitis B, variantes de herpes, citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr, varicela, virus del papiloma, virus del Ébola, virus de la varicela zóster o viruela. Como alternativa, el antígeno puede ser un antígeno encontrado en una infección celular, infección bacteriana, infección fúngica o infección protozoaria. En particular, el antígeno diana puede ser de gripe, VIH, hepatitis C, hepatitis B, variantes de herpes, citomegalovirus (CMV), virus del Ébola, virus de Epstein-Barr, varicela, virus del papiloma, virus de varicela zóster o viruela.

Adecuadamente, el antígeno puede incluir un fragmento vírico activo o inactivado, péptido, una proteína, segmento antigénico o similares de dicho organismo vírico.

Adecuadamente, el antígeno puede incluir un antígeno específico de tumor que está presente solo en células tumorales y no en cualquier otra célula y/o un antígeno asociado a tumor que está presente en algunas células tumorales y también en algunas células normales. Dichos antígenos específicos de tumor pueden incluir, pero no se limitan a, antígeno carcinoembrionario, CA-125, MUC-1, antígeno tumoral epitelial y un antígeno de tipo MAGE que incluye MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA12, MAGEC2, BAGE, GAGE, XAGE1B, CTAG2, CTAG1, SSX2 o LAGE1 o combinaciones de los mismos.

Adecuadamente, puede utilizarse un lisado de una célula infectada, una célula necrótica o una célula cancerosa para proporcionar un antígeno adecuado. En realizaciones, el antígeno puede ser un antígeno sintetizado, por ejemplo, un péptido sintético. Como alternativa, el antígeno puede recogerse de un sujeto. Adecuadamente, pueden proporcionarse aproximadamente 0,02-2 microgramos por ml de antígeno a las células durante la etapa de cultivo.

Factores que estimulan la proliferación de células T gamma delta y el mantenimiento de fenotipo celular, tales como IL-2, IL-15 o IL-18 (Garcia V. *et al.*, 1998, Nussbaumer O. *et al.*, 2013) pueden proporcionarse en la etapa de cultivo de los leucocitos monomorfonucleares de sangre periférica. Adecuadamente, en dichas realizaciones, puede proporcionarse IL-2, IL-15 o IL-18 o combinaciones de las mismas en el intervalo de 50-2000 U/ml, más preferiblemente 400-1000 U/ml al medio de cultivo. El cultivo se realiza típicamente a 34 hasta 38 °C, más preferiblemente 37 °C en presencia de un 2 a un 10 %, más preferiblemente un 5 % de CO₂. El medio de cultivo puede añadirse dependiendo del número de células cultivadas. Adecuadamente, puede añadirse suero en una cantidad de un 0,1 a un 20 % a la solución de cultivo. Como suero, puede usarse suero AB de suero fetal de ternero o autoplasma, por ejemplo. Adecuadamente, puede usarse un sustituto de suero químicamente definido en lugar de suero o plasma.

Pueden añadirse al medio de cultivo factores que estimulan la reanimación de células T gamma delta agotados o anérgicos. Adecuadamente, estos factores pueden incluir citocinas tales como IL-15 o IL-18 o anticuerpos dirigidos a receptores o ligandos inhibidores del punto de control inmunitario específicos, por ejemplo, anticuerpo anti-PD-L1

(Chang K. *et al.*, 2014), pero también pueden incluir anticuerpos dirigidos a CTLA-4, PD-1, PD-2, LAG3, CD80, CD86, B7-H3, B7-H4, HVEM, BTLA, KIR, TIM3 o A2aR.

La etapa de proporcionar puede incluir la recogida de sangre o sangre de cordón umbilical de un sujeto donador. Dicha recogida de sangre puede ser de aproximadamente, por ejemplo, alrededor de 15-25 ml de sangre de un sujeto donador. En realizaciones, la etapa de proporcionar puede incluir una etapa de recogida en donde la etapa de recogida es la recogida de al menos células T gamma delta del primer sujeto en un solo proceso de recogida. En realizaciones, la etapa de recoger puede ser durante múltiples sesiones de recogida.

El proceso para proporcionar células T gamma delta puede comprender una etapa de análisis para determinar al menos una característica de una célula recogida de un primer sujeto. En realizaciones, al menos una característica de una célula puede ser una secuencia de ADN o ARN o una secuencia de aminoácidos de la célula, un proteoma de la célula o un marcador de superficie celular de la célula. En realizaciones, el proceso puede incluir una etapa de tipado de tejido de las células T gamma delta. Las características del marcador de superficie celular gamma delta pueden incluir (pero no se limitan a) CD3, CD4, CD8, CD69, CD56, CD27, CD45RA, CD45, TCR-Vg9, TCR-Vd2, TCR-Vd1, TCR-Vd3, TCR-pan g/d, NKG2D, anticuerpos monoclonales receptores de quimiocinas CCR5, CCR7, CXCR3 o CXCR5 o combinaciones de los mismos. Este tipado puede incluir información genotípica o fenotípica. La información fenotípica puede incluir características observables o medibles a nivel microscópico, celular o molecular. La información genotípica puede referirse a diversas mutaciones genéticas específicas, por ejemplo, del antígeno leucocitario humano (tipo de HLA del donador).

Adecuadamente, las células T gamma delta de la presente invención pueden proporcionar bancos de líneas celulares de calidad clínica que pueden expandirse y diferenciarse para su uso en un gran número de pacientes. En realizaciones, las células T gamma delta pueden expandirse *ex vivo* a partir de material de partida de sangre de cordón umbilical y combinarse a partir de múltiples donadores para generar números suficientes de células T gamma delta para poblar un banco de células. Dichos bancos de células y las células aisladas en de los mismos forman aspectos separados de la invención. En realizaciones, dicho banco estaría poblado adecuadamente con células T gamma delta obtenidos de donadores voluntarios sanos del grupo sanguíneo O que se seleccionan para maximizar la oportunidad de que coincidan los antígenos leucocitarios humanos (HLA) y minimizar de ese modo el riesgo de rechazo del aloinjerto o la necesidad del uso sustancial de fármacos inmunodepresores. Por ejemplo, dichos bancos para pacientes de Reino Unido/UE pueden comprender lo siguiente, que permitiría el tratamiento de un porcentaje significativo de la población de Reino Unido/UE con riesgo reducido de rechazo:

HLA-A	HLA-B	HLA-DR
A1	B8	DR17(3)
A2	B44(12)	DR4
A3	B7	DR15(2)
A2	B7	DR15(2)
A2	B44(12)	DR7
A2	B62(15)	DR4
A1	B57(17)	DR7
A3	B35	DR1
A29(19)	B44(12)	DR7
A2	B60(40)	DR4
A2	B8	DR17(3)
A2	B27	DR1
A2	B44(12)	DR13(6)
A3	B7	DR4
A1	B8	DR4
A2	B57(17)	DR7
A2	B60(40)	DR13(6)

A11	B35	DR4
A2	B44(12)	DR11(5)
A24(9)	B7	DR15(2)
A30(19)	B13	DR7
A31(19)	B60(40)	DR4
A3	B7	DR1
A11	B35	DR1
A3	B65(14)	DR13(6)

Las células T gamma delta recogidos y procesados de la presente invención pueden conservarse en bancos para uso futuro en un banco o depósito de células. Por consiguiente, las células pueden almacenarse en un crioprotector tal como DMSO o CryoStor™ y someterse a una tasa controlada de congelación y almacenamiento con nitrógeno líquido.

5 Las células T gamma delta pueden almacenarse en un almacenamiento unificado de unidades o dosificaciones definidas según se requiera para una única o múltiples etapas de tratamiento.

El proceso puede comprender una etapa de tratar una población de células recogidas de un primer sujeto con un agente para potenciar el almacenamiento, la viabilidad o la capacidad terapéutica de las células T gamma delta dentro de la muestra recogida. En una realización, el proceso puede incluir una etapa de conservación en donde se

10 proporciona un agente de crioconservación a las células T gamma delta en la muestra de células T gamma delta.

En realizaciones, un linfocito T gamma delta puede ser un linfocito T Vγ9Vδ2 humano expandida con fosfoantígeno pirofosfato de isopentenilo (IPP).

El subconjunto de células T γδ de sangre periférica predominante expresa un TCR canónico Vγ9Vδ2, que reconoce células diana de manera dependiente de TCR, basándose en la desregulación de la ruta del mevalonato, mediante la

15 detección de niveles potenciados de antígenos de pirofosfato de bajo peso molecular (~350 Da). Estos pueden derivar de forma exógena, lo que indica infección bacteriana (tal como HMBPP) o endógena, lo que indica síntesis de isoprenoides potenciada durante la tumorigénesis (IPP).

Las células Vγ9Vδ2 parecen reconocer una glucoproteína de superficie celular BTN3A1, que se expresa en una gama extremadamente amplia de células diana, que contiene un dominio citoplasmático B30.2 que se une específicamente

20 a antígenos de pirofosfato, lo que da lugar al agrupamiento de BTN3A1 y el reconocimiento de TCR productivo. Es importante destacar que, aunque la activación de Vγ9Vδ2 depende de la señalización de TCR, mediada mediante CD3zeta y ZAP-70, está fuertemente influida por rutas coestimuladoras, que pueden estar mediadas por receptores coestimuladores tales como CD28, o receptores "centrados en agresión" tales como NKG2D, que potencian las señales de la ruta de la PI3-cinasa, que finalmente se integran con la señalización mediada por TCR.

25 En realizaciones, un linfocito T gamma delta puede ser un linfocito T Vδ1, T Vδ2 o T Vδ3 humano expandido.

También se proporciona un método para tratar una infección o cáncer en un individuo, que comprende la etapa de proporcionar a dicho individuo células T gamma delta obtenidos de un individuo diferente. Por tanto, las células T gamma delta del donador se usan para el tratamiento de una infección, por ejemplo, de un virus, bacterias, hongos o

30 protozoos, o para el tratamiento de un cáncer en un sujeto destinatario, en donde el donador y el destinatario no son el mismo individuo. Como se entenderá, antes de proporcionar las células T gamma delta al segundo sujeto, estos células T gamma delta se modifican como se analiza en la presente memoria, para proporcionar células T gamma delta modificados con CAR.

Adecuadamente, el método de administración para proporcionar las células T gamma delta al sujeto destinatario puede incluir inyección intravenosa, intradérmica o subcutánea. La administración puede ser en una zona afectada o

35 sistémicamente al individuo. Adecuadamente, el método de administración puede ser profiláctico, en donde se proporciona una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea el caso, aunque la profilaxis puede considerarse terapia), de las células T gamma delta que es suficiente para mostrar beneficio al individuo. La cantidad real administrada, y la tasa y evolución temporal de la administración dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., pertenecen a la responsabilidad de los médicos y otros licenciados en medicina.

40

Se proporcionan células T gamma delta de un primer sujeto para su uso en el tratamiento de un segundo sujeto diferente infectado por un virus, bacterias, hongos o protozoos, en donde dicho tratamiento del sujeto es alogénico.

Se proporcionan células T gamma delta de un primer sujeto para el tratamiento de un segundo sujeto diferente infectado por virus, en donde dicho virus se selecciona de VIH, gripe o hepatitis, en donde dicho tratamiento es alogénico. En una realización, el virus puede ser hepatitis B o hepatitis C, gripe, variantes de herpes, citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr, varicela, virus del papiloma, virus de varicela zóster o viruela.

- 5 En realizaciones, el virus de la gripe puede ser virus de la gripe A (Gripe A). En realizaciones, el virus de la gripe puede ser un virus de la gripe pandémico de origen aviar o porcino, por ejemplo, H5N1, H7N3, H7N7, H7N9 y H9N2 (subtipos aviares) o H1N1, H1N2, H2N1, H3N1, H3N2, H2N3 (subtipos porcinos).

En realizaciones, se proporcionan células T gamma delta para el tratamiento de un sujeto con cáncer, en donde dicho tratamiento es alogénico.

- 10 En realizaciones, se proporcionan células T gamma delta de un primer sujeto para su uso en el tratamiento de un segundo sujeto, en donde el segundo sujeto padece al menos una de una infección vírica, bacteriana, fúngica o protozoaria. En realizaciones, el sujeto al que se proporcionan células T gamma delta, se le puede administrar simultáneamente, secuencialmente o por separado fármacos inmunodepresores. La administración de fármacos inmunodepresores puede ayudar a mitigar cualquier respuesta perjudicial del sistema a las células T gamma delta.

- 15 En realizaciones, se proporcionan células T gamma delta para el tratamiento de un sujeto con enfermedad linfoproliferativa inducida por el virus de Epstein-Barr (EBV-LPD).

El virus de Epstein-Barr (EBV) es un miembro de la familia del virus del herpes gamma y es prevalente en poblaciones occidentales (>90 % de los adultos son seropositivos). El EBV se mantiene como una infección latente por las células T citotóxicas (CTL) del hospedador que evitan la reactivación vírica, permitiendo de ese modo que el EBV persista asintóticamente como una infección latente en células β del hospedador.

- 20 El EBV está asociado con varias neoplasias malignas con origen en células β , tales como el linfoma de Burkitt (BL), el linfoma de Hodgkin (HL) y la enfermedad linfoproliferativa postrasplante (PTLD), además de cánceres de origen epitelial, tales como el carcinoma nasofaríngeo (UPC) y el cáncer gástrico.

- 25 La PTLD es un riesgo común asociado con el trasplante de órganos sólidos y el trasplante de células madre hematopoyéticas.

En realizaciones, se proporcionan células T gamma delta de un primer sujeto para su uso en el tratamiento de un segundo sujeto con una neoplasia maligna asociada a EBV.

En realizaciones, se proporcionan células T gamma delta, en particular células V γ 9V δ 2, que comprenden al menos un CAR coestimulador, para su uso en el tratamiento de un sujeto de forma autóloga o alogénica.

- 30 En realizaciones, se proporcionan células T gamma delta de uno o más isotipos de TCR gamma delta específicos para el tratamiento de diferentes indicaciones víricas. Por ejemplo, los subtipos V δ 2^{pos} pueden ser más eficaces en el tratamiento de la infección por VIH y gripe (Wallace M. *et al.*, 1996, Tu W. *et al.* 2011), mientras existen pruebas de la función de al menos dos subtipos de células T gamma delta en el control de células infectadas con EBV; las células V δ 1^{pos} (Farnault L, *et al.*, 2013) y V δ 2^{pos} (Xiang Z. *et al.*, 2014). Adecuadamente, pueden elegirse combinaciones de subtipos de células T gamma delta y administrarse al paciente para aumentar la eficacia de la terapia con células T gamma delta. Adecuadamente, estos pueden comprender poblaciones de células T gamma delta de un solo isotipo generados usando condiciones de cultivo concretos o una población multivalente de células T gamma delta generada simultáneamente usando un solo conjunto definido de parámetros de cultivo celular.

- 40 En realizaciones, se proporcionan células T gamma delta, en particular células V γ 9V δ 2 y fármacos de pirofosfato/fosfonato para su uso en el tratamiento de un sujeto de forma autóloga o alogénica.

También se proporciona un procedimiento para proporcionar células T gamma delta autólogos a un sujeto, que comprende las etapas

- proporcionar una muestra de células T gamma delta de un sujeto;

- 45 - cultivar las células T gamma delta para permitir que se administren de nuevo al sujeto, en donde dicha etapa de cultivo comprende modificar las células T gamma delta para proporcionar células T gamma delta modificados con CAR, CAR "coestimulador" o " con TCR ajustable" como se analiza en la presente memoria.

Cualquiera de las etapas de proporcionar y cultivar descritas anteriormente puede aplicarse a las células T gamma delta de la presente invención. Por ejemplo, la etapa de cultivar las células T gamma delta puede incluir etapas para cambiar el perfil de receptores de superficie celular de las células T gamma delta, como se analiza anteriormente.

- 50 También se proporciona un método para tratar una infección o cáncer en un individuo, que comprende la etapa de proporcionar a dicho individuo células T gamma delta obtenidos de ese individuo, en donde las células T gamma delta se han proporcionado mediante un proceso como se describe por la presente invención.

En realizaciones, el cáncer puede ser un mieloma o melanoma. En realizaciones, un cáncer puede incluir, pero no se limita a, un tipo de tumor, incluyendo cáncer gástrico, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, leucemia mielógena aguda, mieloma múltiple y leucemia linfoblástica aguda, cáncer de pulmón no microcítico, EBV-LPD, linfoma de Burkitt y enfermedad de Hodgkin.

5 Se proporciona un linfocito T gamma delta aislado como se usa en la presente invención, en particular una célula V γ 9V δ 2 que comprende al menos un CAR coestimulador. En realizaciones, se proporciona un linfocito T gamma delta aislado, en particular una célula V γ 9V δ 2, específicamente un linfocito T gamma delta, por ejemplo, una célula V γ 9V δ 2 que comprende al menos un CAR coestimulador y un fármaco de pirofosfato/fosfonato como kit para su uso en combinación para tratar a un sujeto de manera autóloga o alogénica.

10 Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un linfocito T gamma delta de la presente invención o de cualquiera de los procesos de la presente invención.

En realizaciones, la composición comprende una dosis unificada de células T gamma delta adecuada para proporcionar a un individuo un efecto terapéutico.

15 En realizaciones, la composición farmacéutica puede incluir una dosis total de más de 25×10^9 células T gamma delta por persona.

En realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende células T gamma delta de la presente invención y una inmunoterapia con anticuerpos para su uso en el tratamiento del cáncer.

20 En realizaciones, una inmunoterapia con anticuerpos puede ser un agente bloqueante de la cascada inmunitaria, tal como inhibidor de PD-1, PDL-1 y/o CTLA-4, inhibidores de PD-1, PDL-1 y CTLA-4, por ejemplo, que desarrolla Roche y Bristol Myers Squibb.

En realizaciones, la composición farmacéutica puede incluir un anticuerpo que puede bloquear señales inhibitoras de CTLA-4. El bloqueo de las señales de CTLA-4 permite que los linfocitos T reconozcan y destruyan las células. En realizaciones, dicho anticuerpo puede ser ipilimumab (MDX-010, MDX-101).

25 En realizaciones, el anticuerpo puede inhibir el ligando 1 de muerte programada (PDL-1). En realizaciones, dicho anticuerpo puede seleccionarse de MPDL3280A (Roche) o MDX-1105.

En realizaciones, la composición farmacéutica puede combinarse con una citocina, por ejemplo, IL-2 o IL-12. En realizaciones, la composición farmacéutica puede incluir interferón gamma.

En realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende células T gamma delta de la presente invención y un agente quimioterápico para su uso en el tratamiento del cáncer.

30 En realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende células T gamma delta de la presente invención y un agente terapéutico para su uso en el tratamiento de virus.

En realizaciones, la composición farmacéutica puede usarse como un agente terapéutico o profiláctico para el cáncer o infecciones.

En realizaciones de la invención, el linfocito T gamma delta puede ser un linfocito T V γ 9V δ 2.

35 Adecuadamente, en realizaciones, la presente invención puede abarcar proporcionar una secuencia de CAR coestimulador a un linfocito T o célula similar a un linfocito T de especificidad antigénica definida, por ejemplo, un linfocito NKT con especificidad hacia α -GalCer, o por ejemplo, un linfocito T invariante asociado a la mucosa (MAIT) con especificidad por antígenos relacionados con la vitamina B. En realizaciones, puede proporcionarse un CAR (clásico (que incluye un dominio CD3 zeta funcional) o coestimulador (con un dominio CD3 zeta no funcional/ausente))
40 a una célula similar a linfocito T $\gamma\delta$, en donde la célula similar a linfocito T $\gamma\delta$ es un linfocito T $\alpha\beta$ genomanipulado para que exprese un receptor de células T gamma delta funcional. Adecuadamente, dichas células modificadas forman un aspecto de la invención. En realizaciones, puede proporcionarse un CAR (clásico o coestimulador) a una célula similar a linfocito T $\gamma\delta$, en donde la célula similar a linfocito T $\gamma\delta$ es cualquier linfocito T genomanipulado para que exprese un receptor de células T gamma delta funcional. Adecuadamente, dichas células modificadas forman un aspecto de la
45 presente invención.

En realizaciones, puede proporcionarse un CAR coestimulador (con un dominio CD3 zeta no funcional/ausente) a cualquier linfocito T (convencional o no convencional) con un receptor de células T con especificidad antigénica definida. Dichas células modificadas forman aspectos de la presente invención. Adecuadamente, las realizaciones analizadas en relación con el primer aspecto de la invención pueden aplicarse a estas células modificadas que son
50 aspectos adicionales de la invención. Adecuadamente, dichas células modificadas pueden usarse como se analiza en la presente memoria en relación con las células del primer aspecto de la invención y realizaciones del mismo.

La referencia al material o información citados contenidos en el texto no debe entenderse como una concesión de que el material o información formaba parte del conocimiento general común o era conocido en cualquier país.

A lo largo de la memoria descriptiva, salvo que el contexto exija lo contrario, se entenderán que los términos "comprender" o "incluir", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", "incluye" o "que incluye" implican que incluyen un número entero o grupo de números enteros indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

- 5 Ahora se describirán realizaciones de la presente invención a modo de ejemplo solamente, con referencia a las figuras adjuntas en que:

Figura 1. (1A) Proporciona una representación esquemática de las ventajas y desventajas de un linfocito T $\gamma\delta$ del subtipo Vgamma9 que expresa un CAR clásico. Estas células T $\gamma\delta$ se activarán por células sanas que expresan el antígeno activador de CAR y, por tanto, son propensas a toxicidad "en la diana, fuera del tumor" (panel superior). Sin embargo, estas células pueden demostrar una activación aumentada contra células infectadas o cancerosas que expresan el antígeno abordado por CAR debido a la señalización doble a través del CAR y el TCR $\gamma\delta$ (panel inferior). (1B) Proporciona una representación esquemática de las ventajas de un linfocito T $\gamma\delta$ del tipo Vgamma9 que expresa un CAR coestimulador. Las células T $\gamma\delta$ que expresan el CAR coestimulador carecerán de toxicidad "en la diana, fuera del tumor" (debido a la falta de dominio CD3zeta/señal 1), pero inducirán una actividad citotóxica aumentada contra células infectadas o transformadas que expresan altos niveles de fosfoantígenos (que proporcionan, por tanto, la señal 1 mediante el TCR $\gamma\delta$) y el antígeno activador de CAR.

Figura 2. Proporciona una realización ilustrativa del diseño de construcción clásico y coestimulador. (A) Se ilustra un diseño de construcción de CAR clásico que comprende el dominio de señal de secreción de GMCSF-R, scFv dirigido contra CD19, dominios de bisagra, transmembranario y de activación de CD28, dominio de activación de CD137 (4-1BB) y dominio de activación CD3 ζ . (B) Se ilustra una construcción de CAR coestimulador que comprende el dominio de señal de secreción de GMCSF-R, scFv contra CD19, dominios de bisagra, transmembranario y de activación de CD28 y dominio de activación de CD137 (4-1BB).

Figura 3. Proporciona secuencias de la construcción de CAR clásico. Se proporciona la secuencia de nucleótidos (A) y las secuencias de aminoácidos (B) de CAR "clásica"/"no ajustable". Cada uno de los dominios funcionales se anota dentro de la secuencia de aminoácidos, esto incluye la secuencia de scFv anti-CD19, el dominio de bisagra, transmembranario, de activación intracelular de CD28, el dominio de activación de CD137 (4-1BB) y el dominio de activación intracelular CD3 ζ .

Figura 4. Proporciona secuencias de la construcción de CAR coestimulador usada en la presente invención. Se proporciona la secuencia de nucleótidos (A) y las secuencias de aminoácidos (B) del CAR "coestimulador"/"con TCR ajustable". Cada uno de los dominios funcionales se anota dentro de la secuencia de aminoácidos, esto incluye la secuencia de scFv anti-CD19, el dominio de bisagra, transmembranario, de activación intracelular de CD28 y el dominio de activación de CD137 (4-1BB).

Figura 5. Ilustra un par de cebadores universales diseñado para amplificar una diana que abarca la secuencia de CD28 y la secuencia de CD137 (4-1BB) que está presente en los CAR clásicos y coestimuladores. Se diseñó un par de cebadores discriminatorios para generar un amplicón a partir de secuencias que contenían la secuencia de CD137 (4-1BB) y el dominio de activación CD3 ζ , por tanto, capaz de amplificar el producto del CAR clásico, pero no la secuencia de nucleótidos del CAR coestimulador. (A) Se proporciona la secuencia de nucleótidos de los dos pares de cebadores usados para detectar la secuencia de CAR clásico y CAR coestimulador. (B) Ilustración a escala de las localizaciones de hibridación para los cebadores universales y discriminatorios en el diseño de CAR clásico. (C) Ilustración a escala de las localizaciones de hibridación para los cebadores universales en el diseño de CAR coestimulador.

Figura 6. Ilustra la amplificación por qPCR de ADN plasmídico diluido en serie usando los cebadores universales para generar una curva patrón del plásmido de CAR clásico ($r^2 = 0,998$) (A) y el plásmido de CAR coestimulador ($r^2 = 0,987$). (C) Por tanto, el par de cebadores universales puede usarse para detectar cuantitativamente los niveles de ambas secuencias mediante qPCR. La qPCR se realizó en células transducidas con cualquier virus. El análisis de la curva de fusión realizado después de 40 ciclos de amplificación por PCR demuestra que ambos pares de cebadores generan un solo amplicón a partir de ARN derivado de las células transducidas con CAR clásico (B), mientras que solamente el par de cebadores universales (gris claro) puede producir un amplicón a partir de ARN extraído de células transducidas con CAR coestimulador (D). Estos datos demuestran que ambos pares de cebadores son específicos, puesto que amplifican solo un producto y puesto que el par de cebadores discriminatorios (gris oscuro) puede diferenciar entre los dos transcritos.

Figura 7. Se evaluaron dos líneas celulares de linfoma de células B para la expresión del antígeno diana CD19 mediante citometría de flujo; células de linfoma de Burkitt Daudi (panel superior) y Ramos (panel inferior). Un 98 % de las células dentro de cada línea celular expresaron CD19, presentando las células Daudi niveles de intensidad/expresión más altos como se determina por MFI (A). Se observó capacidad citotóxica aumentada de células T $\gamma\delta$ Vgamma9 que expresan la construcción de CAR clásico contra líneas celulares de cáncer CD19 $^{+}$ en comparación con células T $\gamma\delta$ no transducidas. Los PBMC se transdujeron con vectores lentivíricos que contenían la secuencia de CAR clásico, 48 horas después de su estimulación con ácido zoledrónico. Las células transducidas se expandieron durante 7 días más y se investigó su capacidad citolítica contra las líneas celulares positivas para CD19 Daudi (panel superior) y Ramos (panel inferior) mediante citometría de flujo. Las células Daudi y Ramos se marcaron

fluorescentemente con el marcador de membrana celular atóxico PKH67 que permite su detección por citometría de flujo. Las células diana fluorescentes se cocultivaron durante 4,5 horas con las células T $\gamma\delta$ transducidos con CAR clásico (lado derecho) o no transducidos (lado izquierdo). La viabilidad de las líneas celulares de cáncer diana se evaluó mediante tinción con anexina V y PI (B). Las células cancerosas que expresaban anexina V o anexina V y PI se consideraron apoptóticas tempranas y tardías, respectivamente. Las células Daudi presentan una mayor sensibilidad relativa a la destrucción mediada por células T $\gamma\delta$ (muerte celular específica de un 76,4 %) y esto aumentó más cuando las células Daudi se cocultivaron con células T $\gamma\delta$ con CAR clásico (muerte celular específica de un 86,4 %). Las células Ramos fueron comparativamente menos sensibles a la destrucción mediada por células T $\gamma\delta$ (muerte celular específica de un 39 %), sin embargo, esto se potenció notablemente cuando las células Ramos se cocultivaron con células T $\gamma\delta$ con CAR clásico. Se observaron niveles significativamente mayores de citólisis (muerte celular específica de un 55 %). Estos datos demuestran claramente que las células T $\gamma\delta$ que expresan CAR clásico tienen capacidad citolítica aumentada contra líneas celulares de cáncer positivas para CD19 en comparación con células T $\gamma\delta$ no transducidos. El aumento en el porcentaje de muerte celular específica con células T $\gamma\delta$ con CAR clásico fue mayor en la línea celular Ramos (~46 %) que en la línea celular Daudi (~13 %) (C). Estos datos demuestran que las células T $\gamma\delta$ transducidos con un CAR clásico pueden aumentar la susceptibilidad a la citólisis de líneas celulares resistentes.

Figura 8. Los PBMC, aislados de material de leucocitaféresis, se iniciaron en cultivo con ácido zoledrónico 5 μ M y 1000 UI/ml de IL-2. Después de 48 horas en cultivo, las células se transdujeron con lentivirus que contenía la construcción de CAR clásico a una MOI de 10 y la inclusión de 5 μ g/ml de Polybrene para potenciar la eficacia de transducción vírica. La transducción lentivírica se repitió 24 horas después (día 3). El día 10, las células se evaluaron mediante citometría de flujo para la pureza de las células T $\gamma\delta$ usando anticuerpos anti-CD3 y anti-Vgamma9. Se producen poblaciones de células T $\gamma\delta$ de pureza constantemente alta en todas las poblaciones de células independientemente de la construcción transducida; el control no transducido (81 % de células T $\gamma\delta$), CAR clásico (86 % de células T $\gamma\delta$), CAR coestimulador (89 % de células T $\gamma\delta$) (A). El día 5, se extrajo el ARN de 1×10^5 células, se sintetizó el ADNc usando hexámeros aleatorios y retrotranscriptasa y se realizó qPCR usando SYBR green y los cebadores universales descritos previamente. Cuantificación relativa de la expresión de transcrito de CAR del ARNm de CAR clásico y el ARNm de CAR coestimulador en células transducidas el día 5 después de la transducción, lo que demuestra que se detectan niveles equivalentes de expresión de transcrito de CAR en las células transducidas, independientemente de la construcción (los datos se normalizaron a los niveles de ARN ribosómico 18S y se expresan con respecto a la expresión de CAR en una transducción basada en retonectina) (B). Las células transducidas se sometieron a prueba para determinar su capacidad citolítica contra las líneas celulares positivas para CD19 Daudi y Ramos. Las células Daudi y Ramos se pretrataron durante 24 horas +/- ácido zoledrónico 5 μ M y después se marcaron fluorescentemente con el marcador de membrana celular atóxico PKH67 que permite su detección por citometría de flujo. Las células diana fluorescentes se cocultivaron durante 4,5 horas con las células T $\gamma\delta$ transducidas con CAR clásico, CAR coestimulador (o no transducidos). La viabilidad de las líneas celulares de cáncer diana se evaluó mediante tinción con anexina V y PI. Las células Daudi fueron sensibles a la citólisis mediada por células T $\gamma\delta$ (muerte celular específica de un 36 %) y esto se elevó mediante pretratamiento con ácido zoledrónico (muerte celular específica de un 48 %). Los niveles de apoptosis se potenciaron más cuando las células Daudi se coincubaron con células T $\gamma\delta$ que expresan el CAR clásico (muerte celular específica de un 64 %) o CAR coestimulador (muerte celular específica de un 54 %) (C). Esto demuestra que un CAR coestimulador, que en aislamiento no puede proporcionar ambas señales, puede presentar un efecto aditivo cuando se expresa en el contexto de un linfocito T $\gamma\delta$ activado. Para ampliar esta observación, se usó una línea celular Ramos menos sensible. Las células T $\gamma\delta$ mediaron un nivel inferior de apoptosis en estas células (muerte celular específica de un 11 %), mientras que el pretratamiento con ácido zoledrónico no tuvo efecto (muerte celular específica de un 10 %). Sin embargo, los niveles de apoptosis se potenciaron notablemente cuando las células T $\gamma\delta$ expresaban CAR clásico (muerte celular específica de un 25%) o CAR coestimulador (muerte celular específica de un 30 %) (D). Estos datos proporcionan respaldo adicional a la funcionalidad de un CAR deficiente en CD3 ζ (es decir, el CAR coestimulador) cuando se acopla con antígeno en el contexto de un linfocito T $\gamma\delta$ activado.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se aislaron PBMC por centrifugación en densidad (Lymphoprep) a partir de material de leucocitaféresis y se crioconservaron. Los PBMC se reanimaron y los PBMC estimulados con ácido zoledrónico (5 μ M) se cultivaron en presencia de IL-2 (1000 UI/ml) y suero AB humano al 5 % en medio de crecimiento. Después de 48 horas en cultivo (37 °C, 5 % de CO₂, atmósfera humidificada), las células se transdujeron con lentivirus que contenía una construcción lenti-CMV-MCS-EF1a-puro con una secuencia de CAR clásico (scFv-CD28-CD137-CD3 ζ anti-CD19) o una secuencia de CAR coestimulador (scFv-CD28-CD137 anti-CD19) y 5 μ g/ml de Polybrene a una MOI de 10. La transducción se repitió 24 horas después. La expresión de ARNm de CAR se verificó mediante QPCR usando cebadores universales que detectaron la expresión de ambas construcciones el día 5. La expresión específica de cada construcción se confirmó usando una combinación de los cebadores discriminatorios y cebadores universales (según las figuras 5, 6).

Ejemplo 2

Las células se transdujeron con lentivirus que contenía la secuencia de CAR clásico y se expandieron como se describe en el ejemplo 1. A los 7 días después de la transducción, se evaluó la actividad citotóxica cocultivando células T $\gamma\delta$ transducidos o no transducidos con líneas celulares diana positivas para CD19, Daudi o Ramos. Las líneas celulares diana se tiñeron con el tinte de membrana atóxico PKH67 (5 μ M) para la visualización específica de la población diana CD19 usando citometría de flujo. Después de una coincubación de 4,5 horas con células T $\gamma\delta$ o células T $\gamma\delta$ que expresaban CAR clásico, se tiñeron los cocultivos con anexina V y yoduro de propidio (PI) para visualizar las células apoptóticas. El % de muerte celular específica se calculó en la población de células diana solamente. Las células T $\gamma\delta$ transducidos con CAR provocaron potencia aumentada en células diana positivas para CD19 en comparación con células T $\gamma\delta$ no transducidos (figura 7).

Ejemplo 3

Las células se transdujeron con lentivirus que contenía secuencia de CAR clásico o CAR coestimulador y se expandieron como se describe en el ejemplo 1. Las líneas celulares diana positivas para CD19 Daudi y Ramos se pretrataron durante 24 horas +/- ácido zoledrónico 5 μ M. La actividad citotóxica se evaluó como se describe en el ejemplo 2. Se cultivaron conjuntamente células diana teñidas con PKH67 (+/- pretratamiento zometa) con células T $\gamma\delta$ transducidos o no transducidos. Las células T $\gamma\delta$ que expresan CAR coestimulador presentaron citotoxicidad hacia las células diana positivas para CD19 similar a la de las células T $\gamma\delta$ que expresan CAR clásico, a pesar de la ausencia del dominio de activación de CD3 ζ , la señal 1 en su lugar se proporcionó mediante activación a través del TCR $\gamma\delta$ por detección de IPP. Ambos CAR proporcionaron citotoxicidad potenciada hacia células T $\gamma\delta$ en comparación con células T $\gamma\delta$ no transducidos (figura 8).

Aunque la invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a ejemplos particulares, los expertos en la técnica entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y detalles en la misma, sin alejarse del alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado que comprende al menos un receptor de antígeno quimérico coestimulador, en donde el receptor de antígeno quimérico coestimulador es un receptor sintético para reconocer y abordar una diana de superficie celular, conectado a un dominio transmembranario que atraviesa la membrana celular y se conecta a un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor coestimulador intracelular que puede proporcionar una señal 2, en donde el linfocito T $\gamma\delta$ está provisto de una respuesta ajustable de modo que el linfocito T $\gamma\delta$ está provisto de una señal estimuladora procedente del receptor de antígeno quimérico coestimulador (señal 2) para permitir la activación del linfocito T $\gamma\delta$ solo contra células que presenten la diana de superficie celular del CAR coestimulador y provoquen la estimulación del receptor de células T $\gamma\delta$ (señal 1).
2. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado de la reivindicación 1, en donde el reconocimiento mediado por TCR V γ 9V δ 2 proporciona una estrategia de dirección independiente de CAR, de modo que una señal estimuladora procedente del CAR se traducirá en una respuesta funcional solo en el contexto de la estimulación del receptor de células T V γ 9V δ 2.
3. El linfocito T $\gamma\delta$ modificado de cualquier reivindicación precedente, que comprende además un receptor de antígeno quimérico inhibidor (ICAR), en donde la unión de un antígeno por el receptor de antígeno quimérico inhibidor provocará la señal proporcionada por cualquier unión a un antígeno de enfermedad de un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular con especificidad de unión por el antígeno de enfermedad, una bisagra, un dominio transmembranario, y una o más regiones de señalización coestimuladoras (ajustables) a inhibir para minimizar la activación del linfocito T $\gamma\delta$ en células inespecíficas.
4. El linfocito T $\gamma\delta$ modificado de cualquier reivindicación precedente, en donde el receptor de antígeno quimérico puede unirse a una diana de superficie celular o ligando natural encontrado en o asociado con infección celular, infección bacteriana, infección fúngica o infección protozoaria; un fragmento vírico activo o inactivado; un péptido; una proteína; un segmento antigénico de un virus; un antígeno específico de tumor o antígeno asociado a tumor.
5. El linfocito T $\gamma\delta$ modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso en el tratamiento de cáncer o infección, opcionalmente en donde la infección se selecciona de una infección vírica, bacteriana, fúngica o protozoaria.
6. El linfocito T $\gamma\delta$ modificado para su uso en el tratamiento de cáncer o infección según la reivindicación 5, en donde el linfocito T $\gamma\delta$ modificado se coadministra a un sujeto con un aminobisfosfonato, o un sustituto del mismo, en donde el sustituto puede potenciar los niveles de fosfoantígenos presentes en células diana mediante desregulación de la ruta fisiológica del mevalonato.
7. Un proceso para proporcionar un linfocito T $\gamma\delta$ modificado con CAR, que comprende una etapa de incorporar o transducir un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, una bisagra, un dominio transmembranario, y una o más regiones de señalización coestimuladoras para proporcionar la señal 2 en un linfocito T $\gamma\delta$, para modificar genéticamente el linfocito T $\gamma\delta$ de modo que el linfocito T $\gamma\delta$ esté provisto de señal estimuladora procedente del receptor de antígeno quimérico coestimulador (señal 2) para permitir la activación del linfocito T $\gamma\delta$ solo a células que presenten la diana de superficie celular del CAR coestimulador y provoquen la estimulación del receptor de células T $\gamma\delta$ (señal 1).
8. Un kit que comprende un linfocito T $\gamma\delta$ de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un fármaco de pirofosfato/fosfonato para su uso en combinación para tratar a un sujeto por transferencia autóloga o alogénica.
9. Una composición farmacéutica que comprende un linfocito T $\gamma\delta$ de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
10. Una composición farmacéutica de la reivindicación 9 y una inmunoterapia con anticuerpos para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende además opcionalmente una citocina, interferón gamma, IL-2, agente quimioterápico, agente biológico o una combinación de los mismos, para su uso en el tratamiento del cáncer.
11. Una composición farmacéutica de la reivindicación 9 o 10 y un agente terapéutico para su uso en el tratamiento de virus.
12. Un método para preparar un tratamiento, que comprende procesar células donadoras recogidas de un sujeto donador para permitir la administración alogénica de una cantidad terapéuticamente eficaz de células T $\gamma\delta$ a un sujeto destinatario, en donde dicho procesamiento incluye la etapa de modificar las células T $\gamma\delta$ para que incorporen un receptor de antígeno quimérico para proporcionar células T $\gamma\delta$ modificados según la reivindicación 1, en donde dicho linfocito T $\gamma\delta$ modificado está provisto de una respuesta ajustable al nivel de diana de superficie celular que se expresa en una célula diana reconocida por el CAR coestimulador.
13. Un linfocito T o una célula similar a un linfocito T de especificidad antigénica definida que comprende un receptor de antígeno quimérico, en donde el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión a antígeno extracelular con especificidad de unión por un antígeno de enfermedad, una bisagra, un dominio transmembranario, y

una o más regiones de señalización coestimuladoras para proporcionar la señal 2, en donde está ausente un dominio CD3 zeta (ajustable) seleccionado de un linfocito NKT con especificidad hacia α -GalCer, y un linfocito T invariante asociado a la mucosa (MAIT) con especificidad por antígenos relacionados con la vitamina B.

Figura 1A. Mecanismo citotóxico de linfocitos T $\gamma\delta$ que expresan CAR clásico

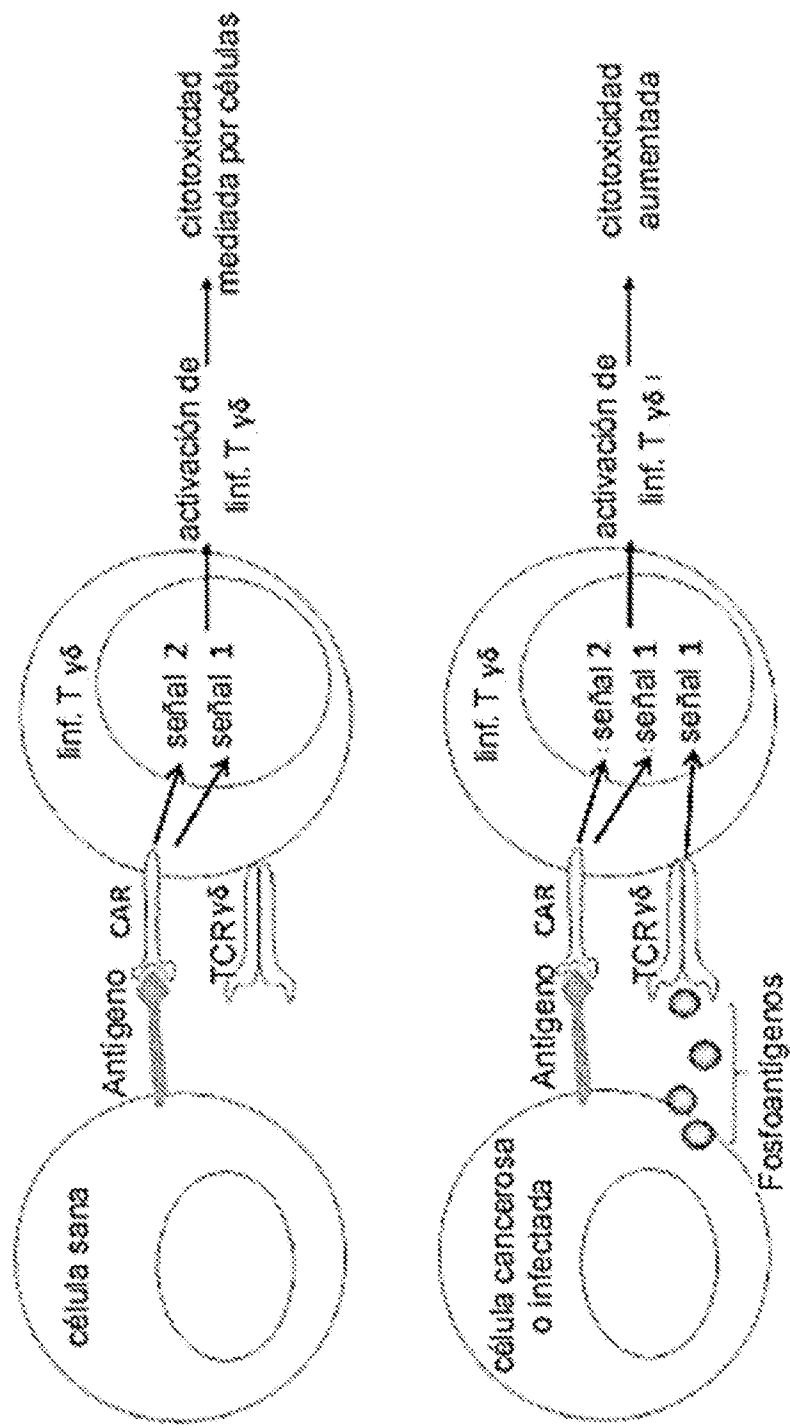


Figura 1B. Mecanismo citotóxico de linfocitos T $\gamma\delta$ que expresan CAR coestimulador

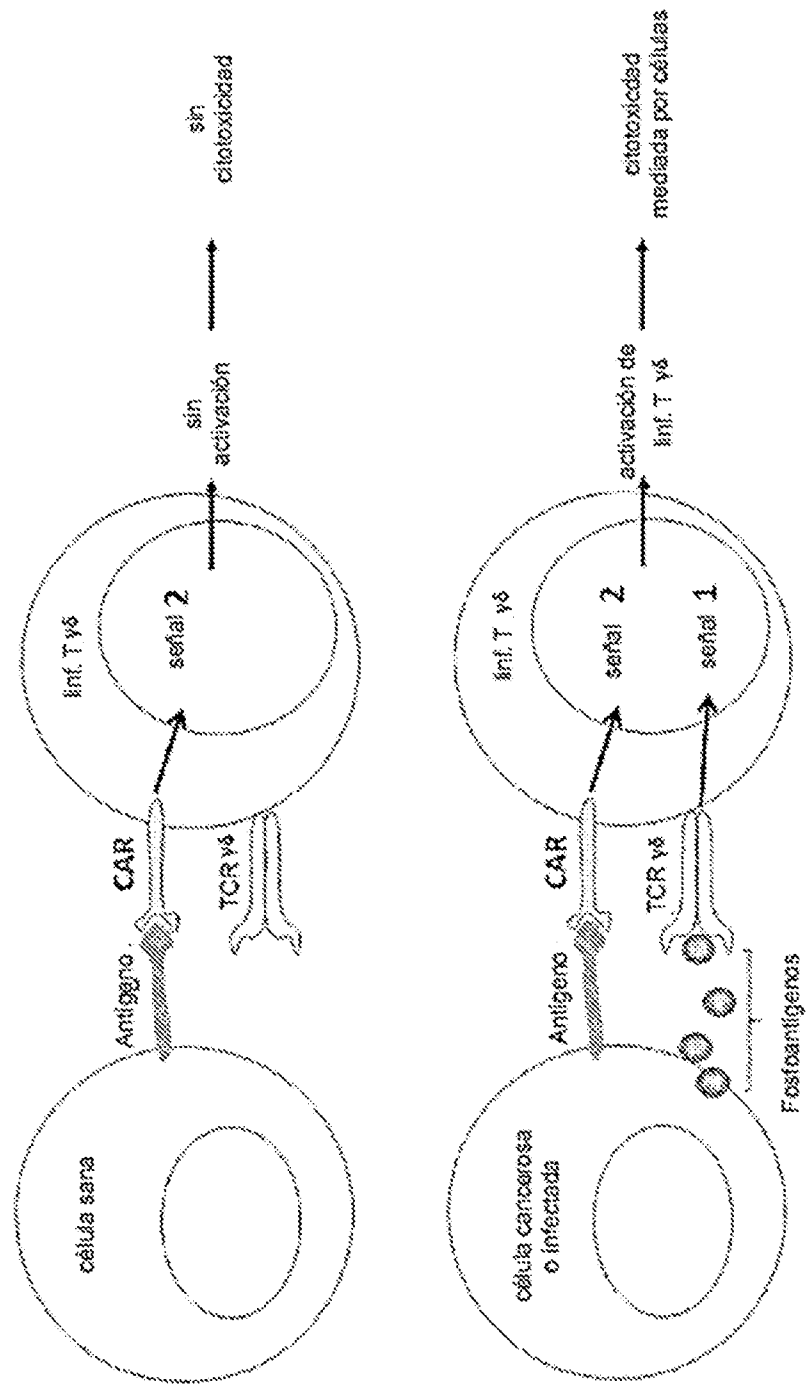


Figura 2. Comparación ilustrativa de diseño de CAR clásico y coestimulador

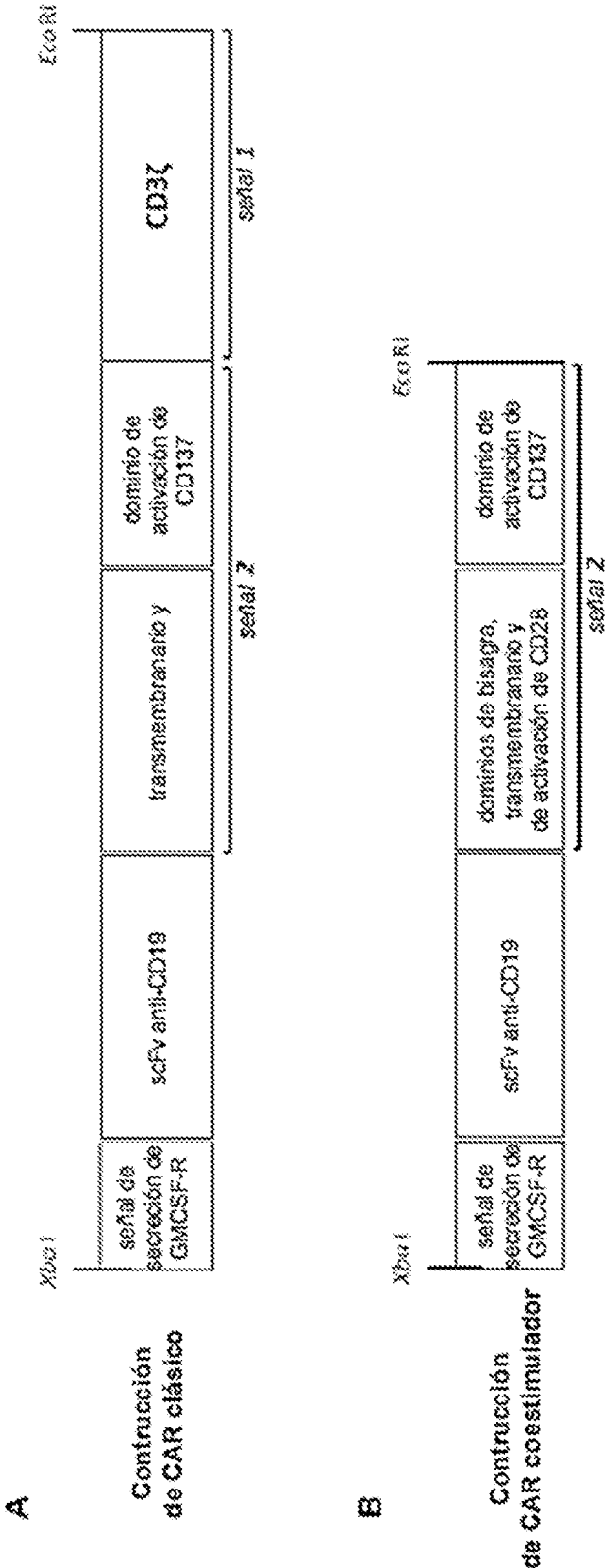


Figura 3B. Secuencia proteínica traducida de CAR "no ajustable"/"clásico"

```

< Señal de secreción > (SEQ ID NO: 2)
MLLVTSLLLCCLPAPALLIP

< scFv anti-CD19 > (SEQ ID NO: 3)
DIQMTQTSSLSA5SLGDRVTISCRASQDISKYLNNYQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTOYSLTISNL
EQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD
YGYSWIRQPPRKGLEWLVIGSETTYNSALKSRLTIKONSKSQVFLKMNSLQIDDTAIYYCAKHYYGGSYANDY
WGQGTSVTVSSAAA

< bisagra, dominio transmembranario, dominio coestimulador de CD28 > (SEQ ID NO: 4)
IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDY
MNMTPRRRPGPTRKHYQYAPPRDFAAYRS

< dominio coestimulador de CD137 (4-1BB) > (SEQ ID NO: 5)
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSGRFPEEEGGCEL

< dominio de activación CD3 zeta > (SEQ ID NO: 6)
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGNKG
ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

```

Figura 4A. Secuencia de ácido nucleico de CAR "con TCR ajustable"/"coestimulador"

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCAACACCCAGCATTCCTCCTGATCCAGACATCCAGATG
 ACACAGACTACATCCTCCTGCTGCTGCTCTCTGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGT
 AAATAATTGAATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCA
 GGAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGCTCTGGAAACAGATTATCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGAT
 ATTGCCACTTACTTTTGCCAAACAGGGTAATAACGCTTCCGTACACAGTTCGGAGGGGACTAAGTTGGAAATAACAGGC
 TCCACCTCTGGATCCGGCAAGCCCGGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGGCGAGGTGAACCTGCAGGAGTCAGGACCT
 GGCTGGTGGCGCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACGTCTCAGGGGTCTCATACCCGACTATGGTGTAAAGC
 TGGATTGCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATAATGGGGTAGTGAAACACACATACTATAATTCA
 GCTCTCAAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCCAACT
 GATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGA
 ACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAAATGAGAAAGCAAT
 GGAAACCAATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTG
 CTGGTGGTGGTGGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAATTTCTGGGTGAGGAGT
 AAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCGCCGCCCGGCCCAAGCATTACCCAG
 CCTATGCCCCACACGGGACTTCGAGCCTATCGCTCCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAAACA
 CCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAGAAAGAAAGGAGGA
 TGTGAACTGTAATGA (SEQ ID NO: 7)

Figura 4B. Secuencia proteínica traducida de CAR "con TCR ajustable"/"coestimulador"

```

< Señal de secreción > (SEQ ID NO: 8)
MLLVTSLLLCELPHPAFLIP

< scFv anti-CD19 > (SEQ ID NO: 9)
DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQKPDGTVKLLIYHTRLSHGVPSRFSGSGGTDYSLTISNL
EQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD
YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSEITTYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDY
WGQGTSTVTVSSAAA

< bisagra, dominio transmembranario, dominio coestimulador de CD28 > (SEQ ID NO: 10)
IEVMYPPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLEPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDY
MMMTPRRPGPTRKKHYQPYAPPRDFAAYRS

< dominio de activación / coestimulador de CD137 (4-1BB) > (SEQ ID NO: 11)
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL

```

Figura 5. Cebadores usados para detectar la expresión de CAR por PCR cuantitativa

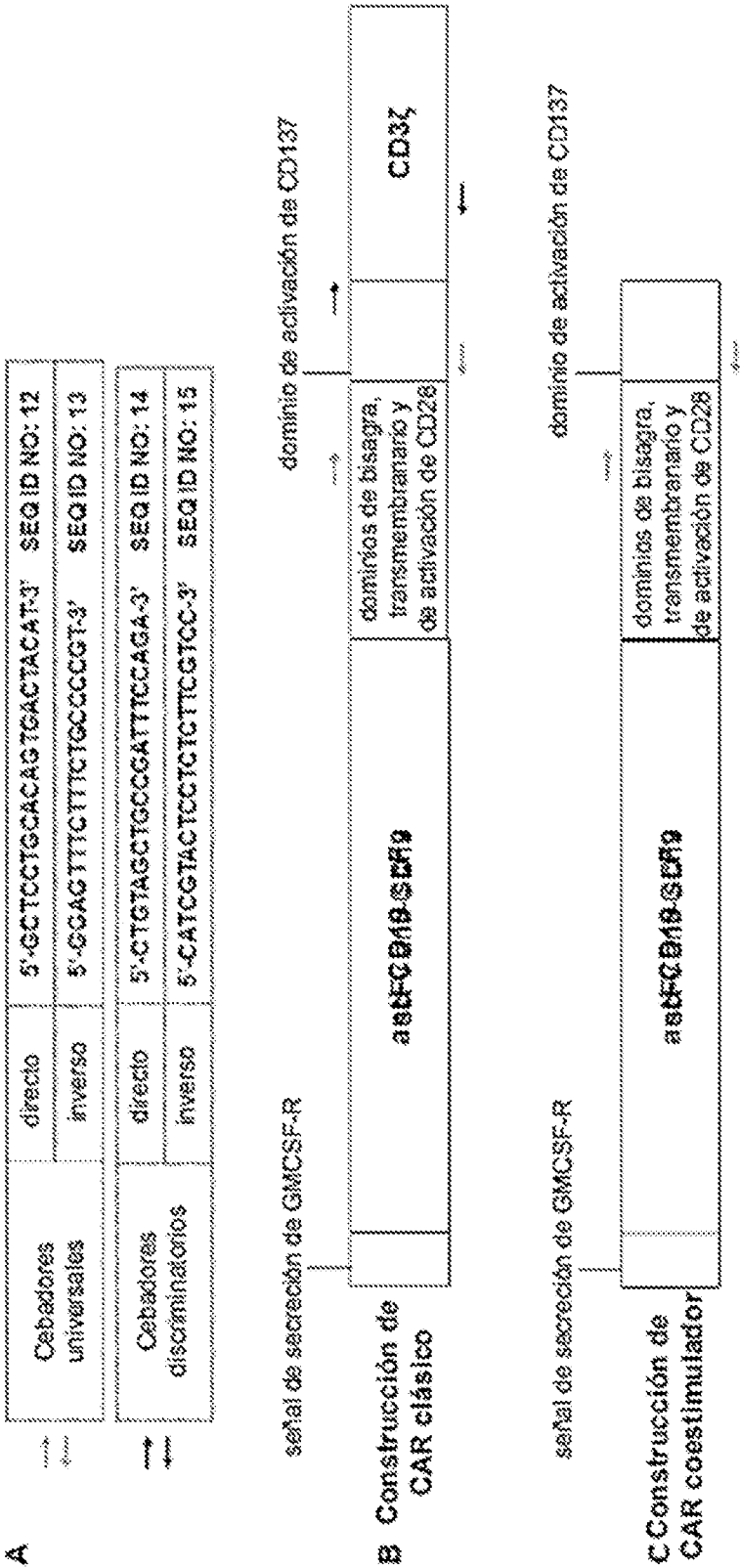


Figura 6. Detección cuantitativa de expresión de CAR clásico y CAR coestimulador

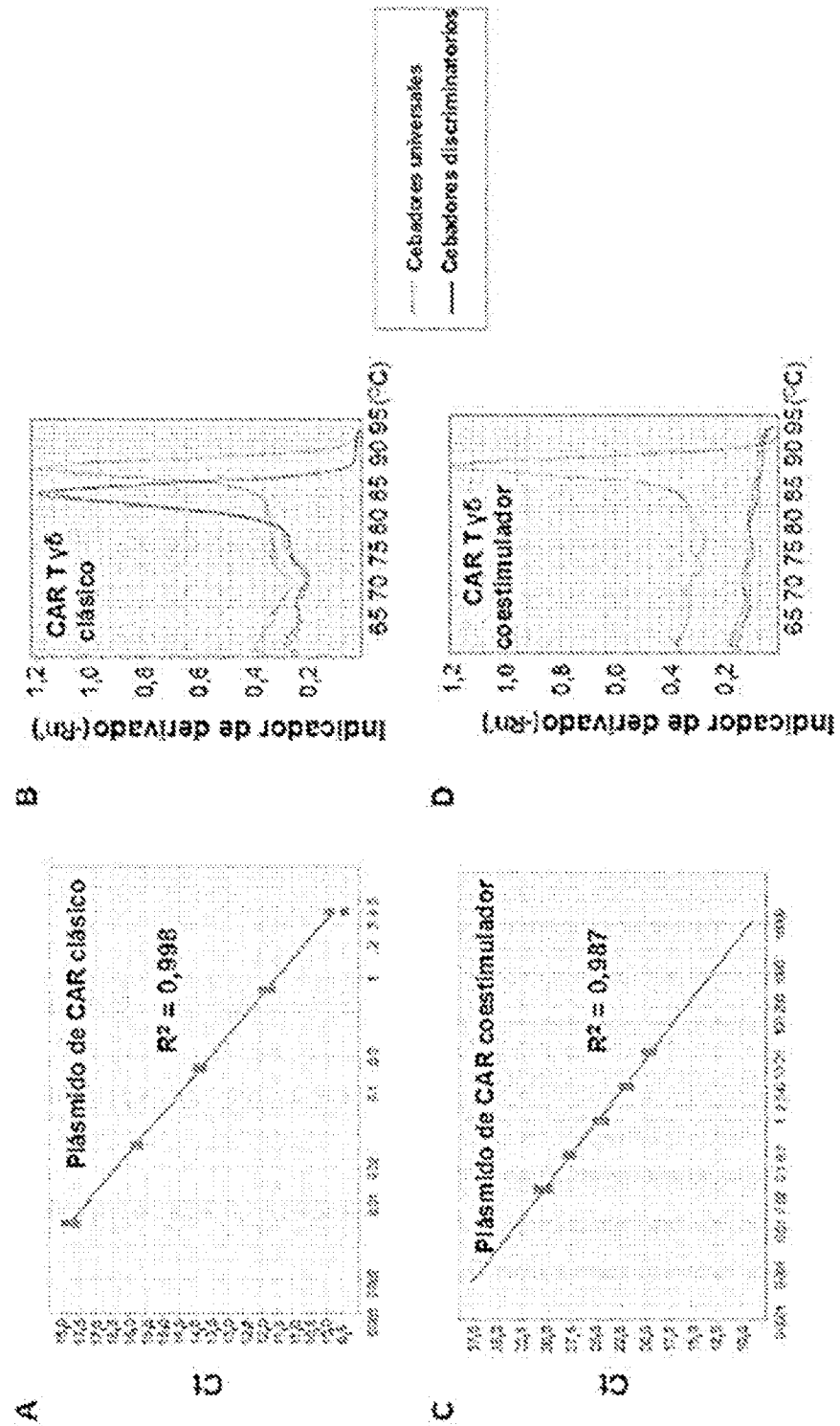


Figura 7. Potencia de linfocitos T $\gamma\delta$ con CAR clásico hacia líneas celulares de linfoma CD19 positivas

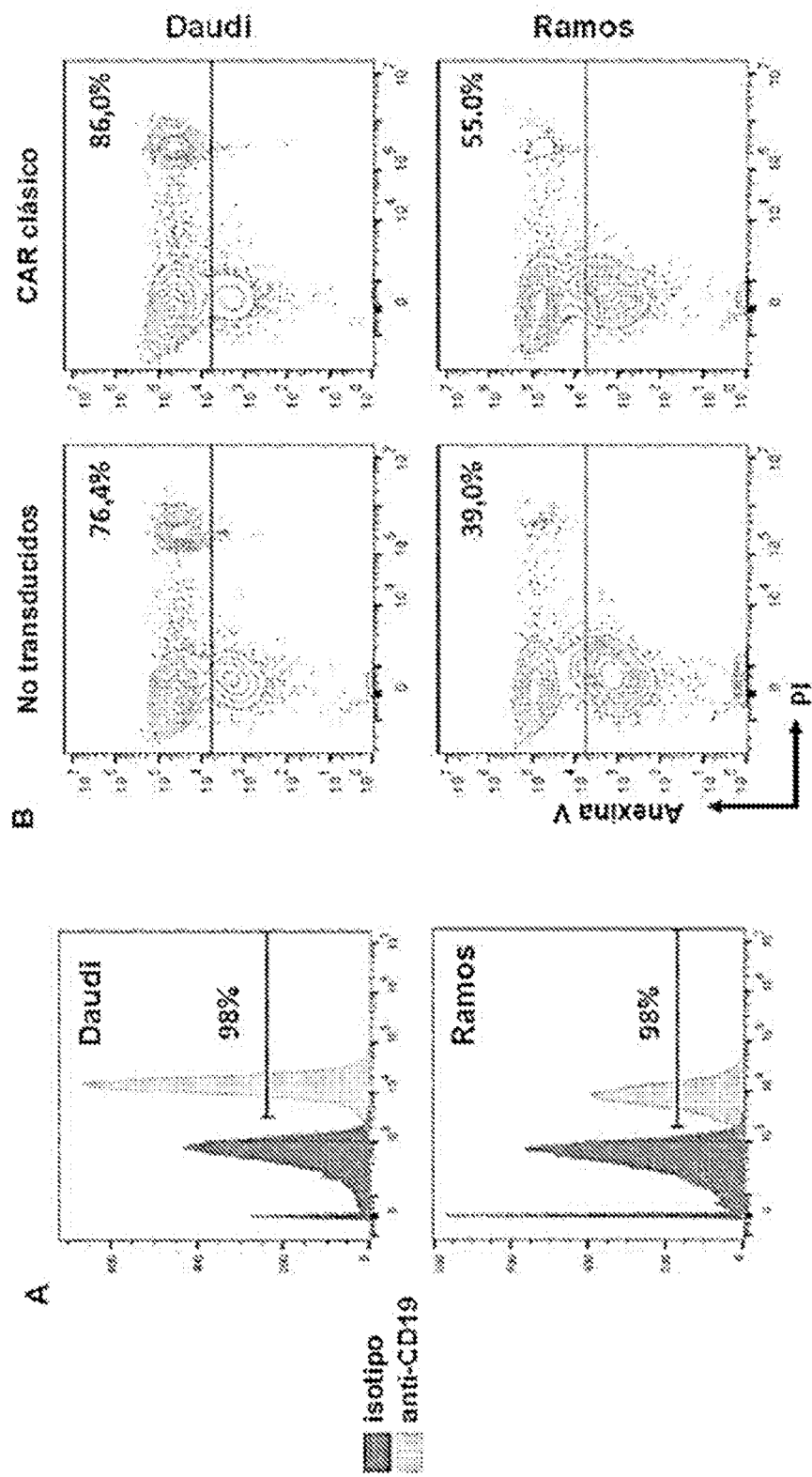


Figura 7.
(continuación)

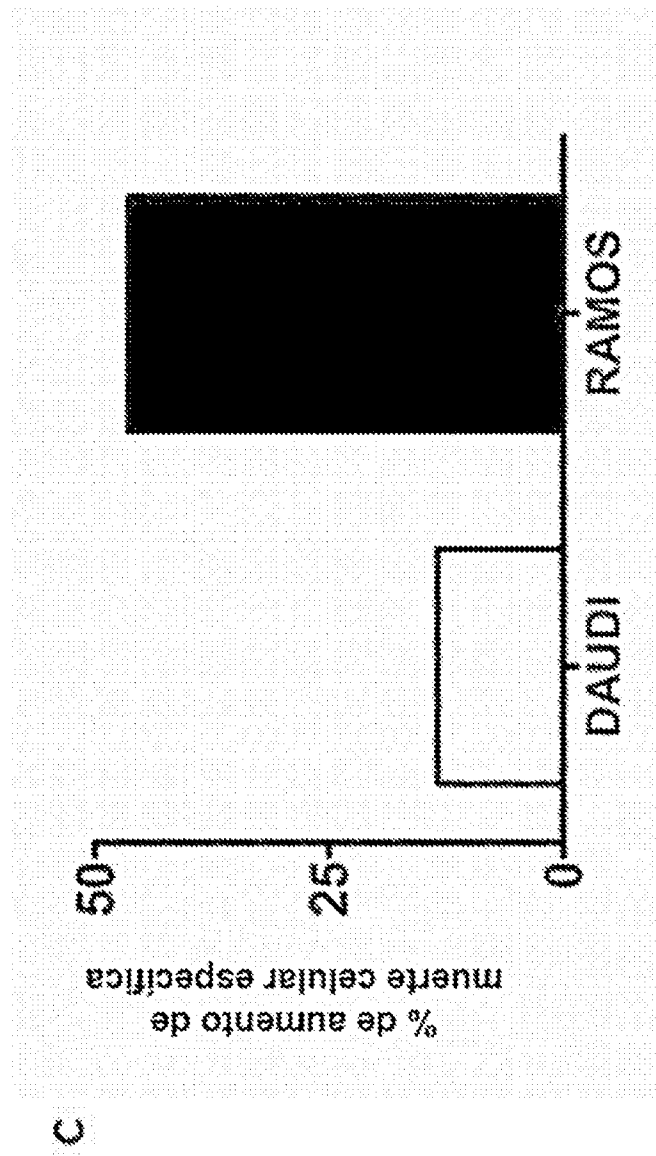


Figura 8. Potencia de linfocitos T $\gamma\delta$ con CAR coestimulador hacia líneas celulares de linfoma CD19 positivas

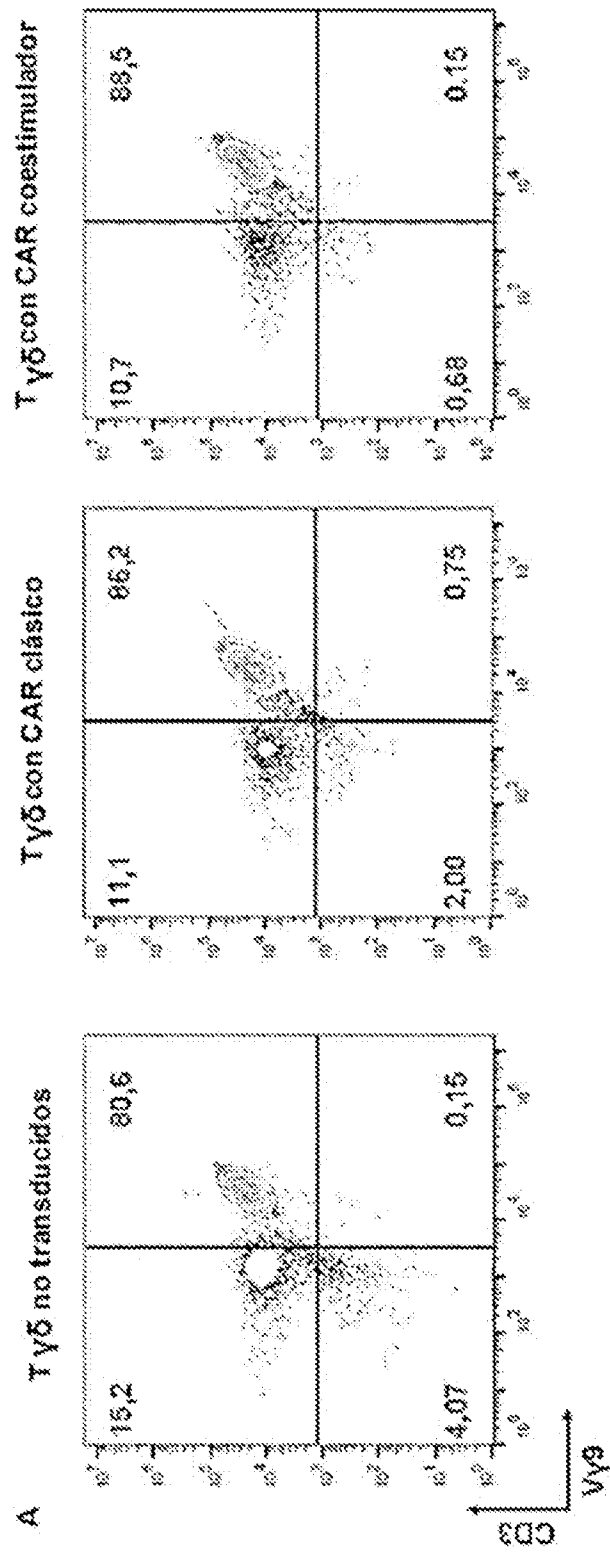


Figura 8. Continuación

