

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 023 783**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/74 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2015** **PCT/US2015/061189**
87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2016** **WO16081518**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2015** **E 15860648 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024** **EP 3220926**

54 Título: **Células T gamma delta manipuladas**

30 Prioridad:

17.11.2014 US 201462080500 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2025

73 Titular/es:

ADICET THERAPEUTICS, INC. (100.00%)
1000 Bridge Pkwy
Redwood City, CA 94065, US

72 Inventor/es:

JAKOBOVITS, AYA;
FOORD, ORIT;
LIN, ANDY AN-DEH y
SANTAGUIDA, MARIANNE THERESA

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 3 023 783 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 manipuladas

5 Antecedentes

El reconocimiento de antígenos por linfocitos T puede lograrse mediante receptores heterodiméricos muy diversos, los receptores de células T (TCR). Aproximadamente el 95 % de las células T humanas de la sangre y los órganos linfoides expresan un receptor TCR $\alpha\beta$ heterodimérico (linaje de células T $\alpha\beta$). Aproximadamente el 5 % de las células T humanas de la sangre y los órganos linfoides expresan un receptor TCR $\gamma\delta$ heterodimérico (linaje de células T $\gamma\delta$). Estos subconjuntos de células T pueden denominarse células T " $\alpha\beta$ " y " $\gamma\delta$ ", respectivamente. Las células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ tienen funciones diferentes. Las células T $\alpha\beta$ impulsan la inmunidad adoptiva restringida al CMH y las células T $\gamma\delta$ actúan como puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adoptiva no restringida al CMH. La activación de las células T $\alpha\beta$ se produce entonces cuando una célula presentadora de antígeno (APC) presenta un antígeno en el contexto de un CMH de clase I/II. Las células dendríticas son los activadores más potentes conocidos de las células T ingenuas. Para la activación completa de las células T $\alpha\beta$ son necesarias dos señales: a) una señal generada por la interacción del péptido CMH con un complejo TCR-CD3; y b) una señal generada por la interacción de CD28 en las células T y miembros de la familia B7 en la APC (señal coestimuladora). A diferencia de las células T $\alpha\beta$, las células T $\gamma\delta$ pueden reconocer un antígeno directamente y no requieren la interacción de un péptido del CMH con un complejo TCR-CD3. Por lo tanto, se dice que las células T $\gamma\delta$ no están restringidas por el CMH. En las células T endógenas, la falta de señal coestimuladora provoca anergia clonal.

La capacidad de los linfocitos T $\gamma\delta$ endógenos de reconocer un antígeno directamente hace que los linfocitos T $\gamma\delta$ sean una herramienta terapéutica atractiva. Sin embargo, las dificultades para manipular y dirigir los linfocitos T $\gamma\delta$ endógenos limita la utilidad terapéutica de los linfocitos T $\gamma\delta$ derivados del paciente en la clínica.

30 Compendio

La invención se expone en el juego de reivindicaciones adjunto.

En el primer aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende una población de células T $\gamma\delta$ y un agente que estimula una expansión de la población de células T $\gamma\delta$, en la que el agente es un anticuerpo y en la que: (a) el agente es un anticuerpo que está dirigido a un dominio específico único de la cadena V61, y el anticuerpo activa y expande específicamente poblaciones de células T $\delta 1 \gamma\delta$, de tal manera que la población expandida de células T $\gamma\delta$ comprende un porcentaje de células T $\delta 1$, en donde el porcentaje de células T $\delta 1$ es mayor del 60 %; o (b) el agente es un anticuerpo dirigido a un dominio específico exclusivo de la cadena V62, y el anticuerpo activa y expande específicamente poblaciones de células T $\delta 2 \gamma\delta$, de modo que la población expandida de células T $\gamma\delta$ comprende un porcentaje de células T $\delta 2$, en el que el porcentaje de células T $\delta 2$ es superior al 60 %.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para la expansión *in vitro* de una población de células T $\gamma\delta$, comprendiendo el método poner en contacto la población de células T $\gamma\delta$ con un agente de activación que estimula la expansión de la población de células T $\gamma\delta$, en donde: (a) el agente de activación es un anticuerpo que está dirigido a un dominio específico único de la cadena V61, y el anticuerpo activa y expande específicamente poblaciones de células $\delta 1 \gamma\delta$ T, en donde el método genera una población expandida de células $\gamma\delta$ T que comprende un porcentaje de células $\delta 1$ T, en donde el porcentaje de células $\delta 1$ T en la población expandida de células $\gamma\delta$ T es mayor del 60 %, opcionalmente mayor del 80 % o 90 %; o (b) el agente es un anticuerpo que está dirigido a un dominio específico único de la cadena V62, y el anticuerpo activa y expande específicamente poblaciones de células $\delta 2 \gamma\delta$ T, en donde el método genera una población expandida de células $\gamma\delta$ T que comprende un porcentaje de células $\delta 2$ T, en donde el porcentaje de células $\delta 2$ T en la población expandida de células $\gamma\delta$ T es mayor del 60 %, opcionalmente mayor del 80 % o 90 %.

55 Breve descripción de las figuras

En las reivindicaciones adjuntas se establecen de forma particular las características novedosas de la invención. Una mejor comprensión de las características y ventajas de en el presente documento invención se pueden obtener con referencia a la descripción detallada más adelante que establece realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención y los dibujos adjuntos (también "figura" y "Figura", en el presente documento), en los cuales:

La **Figura 1** ilustra de forma esquemática los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente. El **panel A** lustra un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente que expresa un fracción de reconocimiento de tumores. El **panel B** ilustra un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente que expresa dos restos de reconocimiento de tumores.

La **Figura 2** ilustra esquemáticamente un método para tratar a un sujeto.

La **Figura 3** ilustra esquemáticamente un método para administrarle una población de linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente a un sujeto.

La **Figura 4** representa una gráfica que ilustra el cultivo de linfocitos $\gamma\delta 1$ y $\gamma\delta 2$ aislados de metástasis de adenocarcinoma de colon en el hígado (TIL 1) y tumores renales (TIL 2) y se ha observado que expresan CCR4 y CCR7.

La **Figura 5** representa una gráfica que ilustra el cultivo de linfocitos T $\gamma\delta$ en medio que contiene suero y libre de suero.

La **Figura 6** representa una gráfica que ilustra experimentos de bloqueo de anticuerpo contra $\gamma\delta$ TCR con 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B3, B6, TS-1, $\gamma 3.20$, IMM510 o 11F2.

La **Figura 7** representa una gráfica que ilustra experimentos de bloqueo de anticuerpo contra $\gamma\delta$ TCR con 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B3, B6, TS-1, $\gamma 3.20$, IMM510 o 11F2.

La **Figura 8** representa un experimento de competencia con anticuerpo contra TCR V $\delta 1$ TS-1.

La **Figura 9** representa un experimento de competencia con anticuerpo contra TCR V $\delta 1$ TS8-2.

La **Figura 10** representa una gráfica que ilustra la activación y expansión de linfocitos T $\delta 1$ a partir de PBMC.

La **Figura 11** representa una gráfica que ilustra la activación y expansión de linfocitos T $\delta 2$ a partir de PBMC.

La **Figura 12** representa una gráfica que ilustra la proporción de la expansión de linfocitos T $\delta 1$ a partir de PBMC.

La **Figura 13** representa una gráfica que ilustra la proporción de la expansión de linfocitos T $\delta 2$ a partir de PBMC.

Descripción detallada

Visión general

En seres humanos, los linfocitos T $\gamma\delta$ son un subconjunto de los linfocitos T que proporcionan un vínculo entre las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Estas células experimentan una reconfiguración del segmento V-(D)-J para generar receptores de linfocitos T $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ TCR) específicos del antígeno y los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden activarse directamente por medio del reconocimiento de un antígeno, ya sea por el $\gamma\delta$ TCR u otros, proteínas no TCR, actuando de manera independiente o juntos para activar las funciones efectoras de los linfocitos T $\gamma\delta$. Los linfocitos T $\gamma\delta$ representan una fracción pequeña de la población general de linfocitos T en mamíferos, aproximadamente 1-5 % de los linfocitos T en la sangre periférica y órganos linfoides, y parecen ubicarse principalmente en compartimentos ricos en células epiteliales, como la piel, el hígado, los tractos digestivos, respiratorios y reproductivos. A diferencia de los $\alpha\beta$ TCR, que reconocen antígenos unidos a moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH, por sus singlas en inglés), los $\gamma\delta$ TCR pueden reconocer directamente antígenos bacterianos, antígenos virales, antígenos de estrés expresados por células enfermas y antígenos tumorales en forma de compuestos no peptídicos o de proteínas intactas.

La capacidad de las células T $\gamma\delta$ para reconocer un amplio espectro de antígenos puede mejorarse mediante ingeniería genética de las células T $\gamma\delta$. Las células T $\gamma\delta$ pueden diseñarse para proporcionar una terapia alogénica universal que reconozca un antígeno de elección *in vivo*. Se describen en el presente documento una(s) célula(s) T $\gamma\delta$ que ha(n) sido diseñada(s) para expresar un casete de expresión que comprende al menos una fracción de reconocimiento tumoral, tal como un TCR $\alpha\beta$ o un TCR $\gamma\delta$, acoplado a un dominio transmembrana y/o un dominio de activación de células T intracelular. Los dominios de activación pueden derivarse de la maquinaria $\alpha\beta$ TCR o $\gamma\delta$ TCR de una célula T. Por ejemplo, el dominio de activación puede derivar de una molécula CD28, CD2, CTLA-4, ICOS, JAMAL, PD-1, 41-BB, CD27, CD30, OX40, NKG2D, HVEM o CD46. Un linfocito T $\gamma\delta$ puede modificarse genéticamente para expresar dos o más TCR distintos, anticuerpos distintos o fragmento de unión al antígeno que reconozcan diferentes epítopos del mismo antígeno. Cuando se administran a un sujeto, la unión de un $\alpha\beta$ TCR, $\gamma\delta$ TCR, anticuerpo o receptor de antígeno quimérico CAR modificado genéticamente con un antígeno proporciona efectivamente un linfocito T $\gamma\delta$ con una citotoxicidad significativa *in vivo*. Un TCR puede derivar de un linfocito T humano, un linfocito T de ratón, un linfocito T de rata, ratones humanizados, ratas humanizadas, un mamífero inmunizado o de una biblioteca de fagos o levaduras. Un anticuerpo, CAR o cualquier fragmento de unión al anticuerpo puede derivar de un linfocito B humano, un linfocito B de ratón, un linfocito B de rata, un linfocito B de camello, un

linfocito B de llama, un mamífero inmunizado o de una biblioteca de fagos o levaduras. Un fracción de reconocimiento de tumores expresado por un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede reconocer un antígeno que se expresa de forma intracelular o extracelular mediante una célula enferma. Por ejemplo, una célula puede estar infectada con un virus que provoca cáncer, tal como el virus del papiloma humano (VPH), y la célula enferma puede expresar uno o más antígenos de VPH de forma intracelular. La célula enferma puede procesar los antígenos de VPH expresados de forma intracelular en fragmentos menores, lo cual permite que el péptido antigénico se acople a una molécula de CMH de Clase I y se transporte a la superficie celular. Un fracción de reconocimiento de tumores de un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede diseñarse para reconocer diversos fragmentos de antígeno, o epítomos que se expresen de forma intracelular mediante una célula enferma y se presenten en la superficie celular en forma de complejo con una molécula de CMH de Clase I o Clase II. De manera alternativa, un fracción de reconocimiento de tumores de un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede diseñarse para reconocer antígenos exógenos expresados en la superficie de la célula tumoral o péptidos derivados expresados en la superficie celular en un complejo con moléculas de Clase CMH.

Se proporcionan en el presente documento linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente y métodos para utilizarlos como producto terapéutico con una capacidad potente y selectiva de dirigirse a un antígeno seleccionado en una célula enferma. Puede clonarse la secuencia de proteínas o polinucleótidos de $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ TCR mediante técnicas estándar a partir de uno de múltiples linfocitos T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ que se unieron con antígenos tumorales, antígenos bacterianos, antígenos virales o antígenos de estrés. De manera alternativa, la secuencia de polinucleótidos de $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ TCR puede diseñarse *in silico* en un producto de programa informático. Un casete de expresión que comprenda el $\gamma\delta$ TCR modificado genéticamente se puede sintetizar, por ejemplo, con técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Pueden utilizarse técnicas de selección de alto rendimiento para caracterizar la unión del TCR modificado genéticamente con el antígeno tumoral. Al modificar genéticamente de un casete de expresión que comprende $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ TCR, el dominio transmembrana y el dominio de activación aumenta la actividad y propiedades citotóxicas de los linfocitos T $\gamma\delta$, mediante lo cual se proporcionan linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente con citotoxicidad potente.

Las células T $\gamma\delta$ modificadas genéticamente pueden derivar de células T no modificadas genéticamente aislados de la sangre, sangre del cordón umbilical, células madre, tumores o linfocitos de infiltración tumoral (TIL, por sus siglas en inglés). Las células T aisladas pueden derivar de un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Una o más células en la población de células T aisladas pueden modificarse genéticamente para expresar un polinucleótido a partir de un casete de expresión que comprende, por ejemplo, un fracción de reconocimiento de tumores acoplado con un dominio de activación o inactivación de células T. El fracción de reconocimiento de tumores se diseña para reconocer un antígeno tumoral objetivo, un dominio de inactivación de células tumorales o de inactivación de células T. El fracción de reconocimiento de tumores se diseña para reconocer un antígeno tumoral objetivo, receptores de modulación inmunitaria/coestimuladores activadores o inactivadores o un receptor de migración guiada. Un antígeno tumoral puede ser, por ejemplo, un péptido derivado de una proteína intracelular o extracelular expresada en la superficie celular en un complejo con complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). En algunos casos, el fracción de reconocimiento de tumores es un $\alpha\beta$ TCR y el antígeno es un péptido presentado por una célula tumoral en un complejo con CMH. Un antígeno puede ser una molécula derivada de una célula en peligro, como una célula cancerosa, o de patógenos como virus o bacterias intracelulares, que se replican dentro de las células, o de patógenos o sus productos que las células han interiorizado por endocitosis desde el líquido extracelular. En algunos casos, se diseña una célula T $\gamma\delta$ modificada genéticamente para expresar dos o más restos de reconocimiento de tumores y cada fracción de reconocimiento de tumores está diseñado para reconocer un epítipo diferente del mismo antígeno. Las células T $\gamma\delta$ modificadas genéticamente pueden expresar restos de reconocimiento de tumores que pueden reconocer un antígeno con diferentes haplotipos de CMH. El fracción de reconocimiento de tumores puede comprender cualquiera de los TCR ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ TCR) o anticuerpos que reconocen complejos de péptido y CMH. Por ejemplo, para un antígeno dado, diferentes restos de reconocimiento de tumores, ya sea TCR o antígenos, pueden reconocer los mismos polipéptidos derivados de antígeno o diferentes en un complejo con diferentes haplotipos de HLA.

Las células T $\gamma\delta$ modificadas genéticamente, cuando se administran a un sujeto, pueden debilitar o matar una célula que expresa el antígeno objetivo. Los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente pueden introducirse en un ser humano que necesite tratamiento para una enfermedad. En una realización preferida, las células se administran a una persona que tiene cáncer y, en dichos casos, las células se modifican genéticamente para reconocer un antígeno tumoral u otro antígeno relacionado con enfermedades. La **Figura 1** ilustra de forma esquemática una célula T $\gamma\delta$. El **panel A** ilustra una célula T $\gamma\delta$ modificada genéticamente que expresa un fracción de reconocimiento de tumores. El **panel B** ilustra una célula T $\gamma\delta$ modificada genéticamente que expresa dos restos de reconocimiento de tumores.

La fracción de reconocimiento codificada por el casete de expresión, como un receptor de antígeno quimérico (CAR), puede ser un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo, un fragmento variable de cadena única (scFv), un anticuerpo de dominio único (sdAb), un Fab, un F(ab)₂, un Fc, las cadenas ligeras o pesadas de un anticuerpo, la región variable o constante de un anticuerpo, o cualquier combinación de los mismos

que se una a un antígeno tumoral de la superficie celular, un péptido derivado de un antígeno tumoral expresado en la superficie celular como un complejo con CMH (complejo péptido-CMH), o una construcción bi-específica, que comprende dos anticuerpos diferentes dirigidos a dos antígenos diferentes, diferentes epítomos del mismo antígeno, o un antígeno tumoral y una molécula coestimuladora/activadora, molécula(s) inmunomoduladora(s), o un receptor(es) de homing. Los anticuerpos pueden derivarse, por ejemplo, de células B humanas, células B de ratón, células B de rata o líneas celulares de hibridoma. Una línea celular de hibridoma de ratón puede derivarse de ratones inmunizados de tipo salvaje o humanizados, una célula B de rata, una célula de hibridoma de rata aislada de ratas inmunizadas de tipo salvaje o humanizadas, o de bibliotecas de anticuerpos derivadas de humanos, ratones, ratas, camellos o llamas. Una fracción de reconocimiento tumoral modificada puede ser un CAR que reconozca antígenos de la superficie celular o complejos de antígenos CMH peptídicos. Una fracción de reconocimiento tumoral modificada puede ser un TCR $\alpha\beta$ modificado que reconoce un antígeno específico del tumor complejo con CMH de clase I o II. El fracción de reconocimiento también puede ser un $\gamma\delta$ TCR que reconozca un antígeno específico de tumores de una manera no restringida por CMH. Un fracción de reconocimiento de tumores puede ser un CAR o TCR modificado genéticamente que reconozca un antígeno de la superficie celular, un complejo de CMH y péptido, un carbohidrato o un lípido.

Una, dos o más moléculas de reconocimiento tumoral pueden diseñarse para reconocer el mismo antígeno o antígenos diferentes. Una, dos o más moléculas de reconocimiento tumoral pueden diseñarse para reconocer diferentes epítomos del mismo antígeno o de antígenos diferentes. En algunos casos, la fracción de reconocimiento tumoral es un receptor TCR $\alpha\beta$ que se expresa mediante un casete de expresión diseñado en el genoma de la célula T $\gamma\delta$. En algunos casos, el $\alpha\beta$ TCR modificado expresado por la célula T $\gamma\delta$ modificada está diseñado para reconocer un péptido, o un péptido mer (como un 9-mer) derivado de un antígeno que se expresa intracelular o extracelularmente o en la superficie celular por una célula tumoral u otra célula enferma. Los antígenos intracelulares pueden ser producidos, por ejemplo, por virus y bacterias que se replican dentro de una célula infectada o por las propias proteínas del sujeto. La célula del sujeto puede procesar el antígeno en péptidos y presentar los péptidos en complejo con moléculas CMH de clase I o II. Las células T $\gamma\delta$ de ingeniería de la divulgación pueden diseñarse para reconocer varios epítomos diferentes de varios antígenos intracelulares diferentes. Los antígenos extracelulares o exógenos, como bacterias, parásitos, virus o incluso células cancerosas, pueden ser fagocitados por células presentadoras de antígenos, procesados en fragmentos más pequeños y presentados en complejos con moléculas CMH de clase II. Los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente modificados genéticamente de la descripción pueden diseñarse para reconocer diversos epítomos diferentes de diversos antígenos extracelulares diferentes. En algunos casos, el fracción de reconocimiento de tumores es un receptor $\gamma\delta$ TCR que le proporciona a la célula un nuevo reconocimiento de antígenos. El casete de expresión puede incluir, por ejemplo, un CAR que expresa un anticuerpo o un ligando, que esté integrado en el genoma del linfocito T $\gamma\delta$ y expresado por este. En algunas instancias, el fracción de reconocimiento de tumores puede ser una construcción biespecífica que comprende, por ejemplo, un anticuerpo, un TCR, un fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento o cualquier combinación de estos. Un linfocito T $\gamma\delta$ puede modificarse a partir de un linfocito de infiltración de tumores (TIL) y/o un fracción de reconocimiento de tumores que está codificado mediante el casete de expresión puede aislarse a partir de TIL. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente a partir de un TIL puede ser una célula alogénica específica de tumores que se dirija, migre e interactúe con el microentorno tumoral. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede modificarse genéticamente a partir de TIL aislados de tumores específicos, tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de colon y rectal, cáncer cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, sarcoma, mesotelioma, un antígeno de cáncer de ovario o melanoma. Un fracción de reconocimiento de tumores puede derivar de una biblioteca sintética o un fracción de reconocimiento de tumores puede derivar de linfocitos B, linfocitos T aislados, por ejemplo, linfoma, leucemia, mieloma múltiple, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de colon y rectal, cáncer cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, sarcoma, mesotelioma, un antígeno de cáncer de ovario o melanoma. En algunos casos, un fracción de reconocimiento de tumores deriva de un linfocito de infiltración de tumores aislado de un cáncer.

El linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede comprender además un dominio de activación/coestimulador de linfocitos T. Un dominio de activación de linfocitos T puede derivar de un linfocito T $\alpha\beta$ y/o un linfocito T $\gamma\delta$. Por ejemplo, un $\alpha\beta$ TCR modificado genéticamente puede diseñarse para unirse ya sea a un dominio de activación/coestimulación $\gamma\delta$ o a un dominio de activación/coestimulación $\alpha\beta$. Los ejemplos no taxativos de dominios de activación/coestimuladores $\alpha\beta$ incluyen CD28, CD2, CTLA4, ICOS, PD-1, 4-1 BB (CD 137), OX40, CD27, HVEM. Los ejemplos no taxativos de dominios de activación/coestimuladores $\gamma\delta$ incluyen CD28, CD2, ICOS, JAMAL, CD27, CD30, OX40, NKG2D, CD46. Un fracción de reconocimiento de tumores puede unirse a un dominio de activación de linfocitos T o cualquier otro dominio de activación adecuado. El dominio de activación de linfocitos T puede ser un dominio CD3 ζ , un dominio CD28 o cualquier otro dominio de activación adecuado, inclusive CD2, ICOS, 4-1 BB (CD 137), OX40 (CD 134), CD27, CD30, CD46, CD70, CD80, CD86, DAP, CD122, CTLA4, CD152, PD-1, JAMAL, NKG2D, CD314 y/o Fc ϵ R1g. Los dominios transmembrana pueden incluir, por ejemplo, los dominios relacionados de CD28, CD4, CD3e, CD 16 e inmuglobulinas.

Las células T γδ descritas en la presente divulgación pueden modificarse para expresar un casete de expresión que codifica una molécula de reconocimiento. En algunos casos, una secuencia de ácido nucleico correspondiente al casete de expresión se clona e introduce de manera estable en el genoma del linfocito T γδ modificado genéticamente. La secuencia de ácido nucleico que comprende el casete de expresión, que puede incluir el fracción de reconocimiento de tumores y dominios de activación relevantes, puede modificarse de forma sintética e introducirse de forma estable en el genoma del linfocito T γδ modificado genéticamente. Los dos o más restos de reconocimiento de tumores diferentes pueden expresarse a partir del mismo casete de expresión o a partir de casetes diferentes.

Puede utilizarse una variedad de técnicas para modificar genéticamente dichas células. Por ejemplo, puede insertarse, reemplazarse o retirarse ADN modificado de forma sintética para generar un linfocito T γδ modificado genéticamente mediante métodos de edición del genoma con nucleasas modificadas genéticamente, tales como: a) el sistema CRISPR/Cas; b) nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés); c) nucleasas de dedos de cinc (ZFN, por sus siglas en inglés); d) y endonucleasas de meganucleasas de migración guiada modificadas genéticamente. También puede emplearse un sistema de transposón bella durmiente para transferir un ácido nucleico que comprende el código para un fracción de reconocimiento de tumores para generar un linfocito T γδ modificado genéticamente. Se conocen en la técnica diversos otros métodos de administración de polinucleótidos que pueden ser adecuados para los linfocitos T γδ modificados genéticamente, tales como transfección, electroporación, transducción, lipofección, sustancias nanomodificadas, tal como Ormosil, métodos de administración viral, inclusive adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus adenoasociado o cualquier otro método adecuado.

En algunos casos, el fracción de reconocimiento deriva de una única especie o de especies múltiples, por ejemplo, la secuencia de por ejemplo del fracción de reconocimiento puede derivar, por ejemplo, de un ser humano (*Homo sapiens*), un ratón (por ejemplo *Mus musculus*), una rata (por ejemplo *Rattus norvegicus* o *Rattus rattus*), un camello (por ejemplo *Camelus dromedarius* o *Camelus bactrianus*) o de una llama (*Lama vicugna*) o la secuencia de polinucleótidos del fracción de reconocimiento puede ser una combinación quimérica de ambos. El fracción de reconocimiento de tumores deriva preferentemente de un ser humano, pero, en algunos casos deriva de un ratón u otras especies, preferentemente mamíferos. En algunos casos, el fracción de reconocimiento de tumores es un receptor TCR quimérico o un CAR quimérico. En algunos casos, la secuencia de polinucleótidos del fracción de reconocimiento de tumores derivada de una especie no humana se modifica genéticamente para aumentar su similitud con una secuencia de polinucleótidos de una especie humana, mediante lo cual se "humaniza" el fracción de reconocimiento de tumores. En algunos casos, una especie, tal como ratones y ratas, se "humaniza" para proporcionar, por ejemplo, anticuerpos y TCR humanizados.

El fracción de reconocimiento de tumores se expresa preferentemente de manera constitutiva a partir del casete de expresión en el linfocito T γδ modificado genéticamente. En algunos casos, el fracción de reconocimiento de tumores está bajo la expresión de un sistema de expresión inducible, tal como el sistema de expresión de mamíferos T-REx™ regulado por tetraciclina, un sistema de expresión Tet-on/Tet-off adecuado u otro sistema adecuado. En un caso específico, el linfocito T γδ modificado genéticamente deriva de un linfocito T V81⁺ humano, un linfocito T Vδ2⁺ humano, un linfocito T Vδ3⁺ humano, un linfocito TCD3⁺ humano o un linfocito T CD3⁺ humano.

Las células T γδ descritas en la presente divulgación pueden diseñarse para expresar una fracción de reconocimiento tumoral de un casete de expresión que puede detectar y dirigirse a antígenos específicos en un sujeto *in vivo*. Un sujeto puede ser un sujeto que necesite tratamiento con un agente terapéutico que puede reconocer y matar o debilitar una célula que expresa un antígeno específico en una manera efectiva y selectiva. En casos preferidos, el antígeno está asociado con un cáncer. Un antígeno puede ser un antígeno tumoral específico de un linaje. En una realización, el antígeno es un antígeno tumoral, tal como CD19, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, glicolípido F77, proteína activadora de fibroblastos, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, mesotelina, c-met, CSPG4, Nectina-4, VEGFR2, PSCA, receptor/proteína de unión a folato, SLC44A4, Cripto, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MART1, tirosinasa, SSX2, SSX4, NYESO-1, antígeno tumoral epitelial (ETA), genes de la familia de MAGEA (tales como MAGE3A, MAGE4A), KKLC1, ras mutada, βraf, p53, molécula A relacionada con la cadena de CMH de clase I (MICA), molécula B relacionada con la cadena de CMH de clase I (MICB), VPH o CMV.

Un linfocito T γδ modificado genéticamente de la descripción puede ser autólogo o alogénico con respecto a los locus de CMH de un sujeto. Por ejemplo, se utiliza trasplante de médula ósea (BMT, por sus siglas en inglés) alogénico y autólogo como terapia para algunas afecciones, particularmente neoplasias malignas hematológicas. Sin embargo, una de las complicaciones más importantes de BMT para BMT alogénico es la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD, por sus siglas en inglés) aguda y enfermedad huésped contra

injerto (HVGD, por sus siglas en inglés).

Las células T del donante y las células que presentan antígenos (APC) del huésped son fundamentales para la inducción de la EICH. Dado que las células T $\gamma\delta$ no reconocen las moléculas MHC del huésped, el reconocimiento de antígenos por parte de una célula T $\gamma\delta$ modificada de la divulgación puede no desencadenar la EICH. Una célula T $\gamma\delta$ modificada de la divulgación puede diseñarse para administrarse a un sujeto no autólogo sin desencadenar una enfermedad de injerto contra huésped. Además, una célula T $\gamma\delta$ modificada puede diseñarse para carecer de expresión génica de uno o más loci del CMH. Alternativamente, una célula T $\gamma\delta$ puede diseñarse para carecer de uno o más locus (loci) MHC. La supresión de los loci MHC, o la interrupción de la expresión génica, en una célula T $\gamma\delta$ modificada puede lograrse mediante tecnologías de edición génica como nucleasas de dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALEN), CRISPR y meganucleasas modificadas o mediante supresión $\beta 2m$. En algunos casos, una célula T $\gamma\delta$ modificada de la divulgación está modificada para carecer o interrumpir la expresión génica de múltiples loci MHC. En otros casos, una célula T $\gamma\delta$ modificada por ingeniería está diseñada para carecer o interrumpir la expresión génica en al menos un locus MHC de clase I, al menos un locus MHC de clase II, o ambos. La supresión de uno o más loci MHC puede proporcionar una célula T $\gamma\delta$ modificada que es un donante universal para cualquier sujeto con cualquier haplotipo MHC sin desencadenar la enfermedad huésped contra injerto, proporcionando así una célula T $\gamma\delta$ modificada que puede desarrollarse, persistir, expandirse y funcionar dentro del huésped sin ser atacada por el sistema inmunitario del huésped.

Las enseñanzas y composiciones descritas en el presente documento pueden utilizarse en una variedad completa de aplicaciones. En realizaciones preferidas, el antígeno tumoral es un antígeno de cáncer de mama, un antígeno de cáncer de próstata, un antígeno de cáncer de vejiga, un antígeno de cáncer de colon y rectal, un antígeno de cáncer cerebral, un antígeno de cáncer gástrico, un antígeno de cáncer de cabeza y cuello, un antígeno de cáncer renal, un antígeno de cáncer de pulmón, un antígeno de cáncer pancreático, un antígeno de sarcoma, un antígeno de mesotelioma, un antígeno de cáncer de ovario o un antígeno de melanoma. En dichos casos, el fracción de reconocimiento de tumores puede ser un $\alpha\beta$ TCR modificado genéticamente o un anticuerpo que está diseñado para reconocer un epítipo derivado de un antígeno tumoral intracelular o extracelular, presentado en la superficie de célula tumoral en un complejo con CMH de clase I o de clase II. Un $\alpha\beta$ TCR modificado genéticamente puede reconocer un antígeno tumoral intracelular presentado por el tumor o por un APC, por ejemplo, en el contexto de un complejo HLA-A, HLA-B o HLA-C, o en el contexto de una molécula HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DM, HLA-DO u otra molécula HLA.

En algunos casos, el antígeno es un autoantígeno. Un autoantígeno puede ser, por ejemplo, una inmunoglobulina, un receptor de linfocitos T, un antígeno tumoral intracelular, un antígeno tumoral extracelular, una molécula de CMH o un resto extracelular asociado con una afección. Por ejemplo, la expresión celular de HLA DR2 humano está asociada con lupus sistémico y esclerosis múltiple, y la expresión celular de HLA DR4 humano está asociada con artritis reumatoide y diabetes mellitus.

En algunos casos, el antígeno es un antígeno extraño. Un antígeno extraño puede ser, por ejemplo, un virus, una bacteria, un protozooario o un alérgeno, tal como polen o un alimento. Un antígeno extraño puede estar asociado, por ejemplo, con una enfermedad infecciosa, un trastorno autoinmunitario o con una lesión de tejido.

Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción puede diseñarse para migrar en una ubicación física específica en el cuerpo del sujeto y, por lo tanto, dirigirse a un antígeno en ese tejido, órgano o lugar del cuerpo en particular. Los linfocitos T endógenos tienen repertorios distintos de tráfico de ligandos y receptores que influyen sobre sus patrones de migración. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción puede diseñarse para expresar, a partir del casete de expresión que comprende el fracción de reconocimiento de tumores o a partir de un casete de expresión separado, uno o más ligandos de tráfico o receptores que guían la migración del linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente hacia un tejido, órgano o sitio del cuerpo en particular.

Un linfocito T $\gamma\delta$ de la descripción puede ser una célula alogénica específica de tumores. Por ejemplo, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede derivar de un linfocito T $\gamma\delta$ no modificado genéticamente que sea un linfocito de infiltración de tumores (TIL) aislado de un tumor. Pueden aislarse diferentes TIL de diferentes tipos de tumor. Un casete de expresión que codifique un fracción de reconocimiento de tumores y un dominio de activación, u otro elemento modificado genéticamente, puede insertarse en el genoma de un TIL aislado de diversos tumores. Dichos linfocitos T $\gamma\delta$ pueden infiltrar tumores sólidos, debilitar y matar células tumorales que expresen uno o más antígenos objetivo, y pueden proporcionar un tratamiento eficaz para diversas neoplasias malignas. Un linfocito T $\gamma\delta$ alogénico específico de tumores puede modificarse genéticamente para expresar al menos un fracción de reconocimiento de tumores que reconozca un epítipo seleccionado. En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ alogénico específico de tumores está diseñado para expresar al menos dos restos de reconocimiento de tumores, y cada fracción de reconocimiento de tumores diferente se diseña para reconocer un epítipo diferente del mismo antígeno, antígenos diferentes, un antígeno y un receptor de modulación inmunitaria/coestimulador activador o inactivador, un antígeno en

complejo con una modulación de CMH o un receptor de migración guiada.

En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ de la descripción está diseñado para expresar alelos específicos de las cadenas de los receptores TCR γ y TCR δ . Los alelos específicos de las cadenas de los receptores TCR γ y TCR δ del linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente pueden dirigir la migración o migración guiada del linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente hacia una o más ubicaciones físicas en el cuerpo de un sujeto. Por ejemplo, en seres humanos, los linfocitos T $\gamma\delta$ que expresan el V δ 1⁺ TCR están restringidos predominantemente a los tejidos epiteliales o mucosos/asociados al epitelio de la piel, vías respiratorias, tractos digestivo y genitourinario y diversos órganos internos, y migran a estos. Los linfocitos T $\gamma\delta$ humanos que expresan el V δ 3⁺ TCR están enriquecidos en el hígado. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción puede activarse de forma constitutiva. En los linfocitos T de tipo salvaje, los TCR existen como un complejo de diversas proteínas, que incluyen proteínas CD3, tales como CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$ y cadenas ζ (homodímero de CD3 ζ). Una cantidad de motivos de activación a base de tirosina del inmunorreceptor (ITAM, por sus siglas en inglés) en las cadenas ζ pueden fosforilarse para generar una señal de activación de linfocitos T. A diferencia de las células CD8 y CD4 α/β TCR que se activan cuando reconocen antígenos específicos asociados con moléculas de CMH clase I o clase II, reconocimiento, los linfocitos T $\gamma\delta$ se activan al reconocer antígenos directamente de una manera no restringida por CMH. Dichos antígenos incluyen antígenos expresados por células tumorales, tales como moléculas A y B relacionadas con la cadena de CMH de clase I (MICA y MICB), CD1, NKG2A, ULBP1-3, lípidos y fosfoantígenos. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción puede modificarse genéticamente para activarse de forma constitutiva. En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción se modifica genéticamente para comprender un fracción de reconocimiento de tumores y un resto de activación. El resto de activación puede ser una proteína en el complejo de TCR y CD3. En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción expresa de forma constitutiva un gen CD3 ζ modificado genéticamente, donde el motivo de activación a base de tirosina del inmunorreceptor del gen CD3 ζ está modificado para comprender un fosfomimético del gen de tirosina en el motivo de YxxL/I. Pueden modificarse genéticamente diversos dominios de activación de linfocitos T, tales como CD3 ζ , CD28, CD2, ICOS, 4-1 BB (CD 137), OX40 (CD134), CD27, CD70, CD80, CD86, DAP, CD122, Fc ϵ Rlg, CD4, CD3e, JAMAL, NKG2D o CD16, por ejemplo, para comprender una mutación fosfomimética u otro tipo de mutación de ácido nucleico.

Se describe además en el presente documento un método para la expansión *in vitro* (*ex vivo*) de un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción. En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede expandirse *ex vivo* sin estimulación mediante un aminofosfato o una célula que presenta antígenos. Un linfocito T modificado genéticamente reactivo por antígenos de la descripción puede expandirse *ex vivo* e *in vivo*. En algunos casos, una población activa de linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente de la descripción puede expandirse *ex vivo* sin estimulación mediante antígenos mediante una célula que presenta antígenos, un péptido antigénico, una molécula no peptídica o un compuesto de molécula pequeña, tal como un aminofosfato, pero mediante el uso de determinados anticuerpos, citocinas, mitógenos o proteínas de fusión, tales como fusión Fc IL-17, fusión Fc MICA y fusión Fc CD70. Los ejemplos de anticuerpos que pueden utilizarse en la expansión de la población de linfocitos T $\gamma\delta$ incluye anticuerpos anti-CD3, anti-CD27, anti-CD30, anti-CD70, anti-OX40, anti-NKG2D o anti-CD2, los ejemplos de citocinas incluyen IL-2, IL-15, IL-12, o IL-21, IL-18, IL-9, IL-7, IL-33 y los ejemplos de mitógenos incluyen CD70 el ligando para CD27 humana, fitohemagglutina (PHA), concavalina A (ConA), mitógeno de fitolaca (PWM), aglutinina de maní y proteína (PNA, por sus siglas en inglés), aglutinina de soja (SBA, por sus siglas en inglés), aglutinina de les culinaris (LCA, por sus siglas en inglés), aglutinina de pisum sativum (PSA, por sus siglas en inglés), aglutinina de Helix pomatia (HPA, por sus siglas en inglés), lectina de Vicia graminea Lectin (VGA, por sus siglas en inglés) u otro mitógeno adecuado capaz de estimular la proliferación de linfocitos T. En algunos casos, una población de linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente puede expandirse en menos de 60 días, menos de 48 días, 36 días, menos de 24 días, menos de 12 días o menos de 6 días.

Se describe además en el presente documento un método para tratar diversas afecciones con un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción puede utilizarse para tratar a un sujeto que necesite tratamiento para una afección. Una afección puede ser cáncer, tal como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepático, cáncer de la piel, cáncer rectal y de colon, linfoma, leucemia, mieloma múltiple, cáncer de ovario, sarcoma, cáncer de cabeza y cuello, mesotelioma, cáncer cerebral, sarcoma u otro cáncer. Una afección puede ser una enfermedad infecciosa, un trastorno autoinmunitario, trasplante o sepsis. También se describe en el presente documento un método para proporcionar un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente a un sujeto. En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede administrarse a un sujeto que sufre una afección. En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede administrarse a un sujeto durante un procedimiento, tal como un trasplante de médula ósea. La descripción proporciona además un método para administrar un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente a un sujeto sin la coadministración de una citocina reguladora, tal como IL-2. En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente se modifica genéticamente para expresar una o más citocinas u hormonas que mejoren su proliferación, supervivencia y función cuando se expresan *ex vivo* y se administran *in vivo*, tales como IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, IL-12, IL-18, IL-9. Un linfocito T $\gamma\delta$ puede modificarse genéticamente para expresar una o más citocinas u

hormonas del mismo casete de expresión, o de uno diferente, que comprenda el fracción de reconocimiento. Las citocinas incluyen quimiocinas, interferones, interleucinas y factores de necrosis de tumores. Los ejemplos no taxativos de citocinas incluyen IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, IL-12, IL-18, IL-9, eritropoyetina (EPO), G-CSF, GM-CSF, trombopoyetina (TPO) y miembros de la subfamilia del interferón (IFN).

5

En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede administrarse a un sujeto como una terapia de combinación. En algunos casos, la terapia de combinación comprende: a) un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción; y b) una terapia de punto de control del sistema inmunitario.

10 Linfocitos t $\gamma\delta$ modificados genéticamente

Los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente pueden generarse con diversos métodos conocidos en la técnica. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede diseñarse para expresar un fracción de reconocimiento de tumores en particular. Un polinucleótido que codifica un casete de expresión que comprende un fracción de reconocimiento de tumores, u otro tipo de fracción de reconocimiento, puede introducirse de manera estable en el linfocito T $\gamma\delta$ mediante un sistema de transposón/transposasa o un sistema de transferencia genética de base viral, tal como un sistema lentiviral o retroviral, u otro método adecuado, tal como transfección, electroporación, transducción, lipofección, fosfato de calcio (CaPO_4), sustancias nanomodificadas, tal como Ormosil, métodos de administración viral, inclusive adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus adenoasociado u otro método adecuado. Un TCR específico de antígeno, ya sea $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, puede introducirse en el linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente mediante la inserción estable de un polinucleótido que comprende un código genético para el TCR específico de antígeno en el genoma del linfocito T $\gamma\delta$. Un polinucleótido que codifica un CAR con un fracción de reconocimiento de tumores puede introducirse en el linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente mediante la inserción estable del polinucleótido en el genoma del linfocito T $\gamma\delta$. En algunos casos, el fracción de reconocimiento de tumores es un receptor de linfocitos T modificados genéticamente, y el casete de expresión incorporado en el genoma de un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente comprende un polinucleótido que codifica un gen de TCR α (TCR alfa) modificado genéticamente, un gen de TCR β (TCR beta) modificado genéticamente, un gen de TCR δ (TCR delta) modificado genéticamente o un gen de TCR γ (TCR gamma) modificado genéticamente. En algunos casos, el casete de expresión incorporado en el genoma del linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente comprende un polinucleótido que codifica un fragmento de anticuerpo o una parte de unión al antígeno de este. En algunos casos, el fragmento de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un polinucleótido que codifica un anticuerpo entero, un fragmento de anticuerpo, un fragmento variable de cadena simple (scFv), un anticuerpo de dominio simple (sdAb), un Fab, F(ab)_2 , Fc, las cadenas ligera o pesada de un anticuerpo, la región constante o variable de un anticuerpo, o cualquier combinación de estos que se una a un antígeno tumoral de la superficie celular como parte de la construcción de receptor de antígeno quimérico (CAR), o una construcción biespecífica, que comprende un CAR y un receptor de linfocitos T (TCR), o CAR con anticuerpos dirigidos a diferentes antígenos. En algunos casos, el polinucleótido deriva de un ser humano o de otra especie. Un polinucleótido de fragmento de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que derive de una especie no humana puede modificarse para aumentar su similitud con variantes el anticuerpo producidas de forma natural en seres humanos y un fragmento de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede humanizarse total o parcialmente. Un polinucleótido de fragmento de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede ser quimérico, por ejemplo, una quimera de anticuerpo de ratón y humano. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente que expresa un CAR también puede modificarse genéticamente para expresar un ligando del antígeno reconocido por el fracción de reconocimiento de tumores.

Diversos procedimientos conocidos en la técnica pueden utilizarse para introducir un ácido nucleico clonado o modificado de forma sintética que comprende el código genético para un fracción de reconocimiento de tumores en una ubicación específica dentro del genoma de un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente. La nucleasa Cas9 guiada por ARN del sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR) microbianas, nucleasas de dedos de cinc (ZFN), nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción (TALEN), y tecnologías de meganucleasa, tal como se describe respectivamente en WO201409370, WO2003087341, WO2014134412 y WO2011090804, puede utilizarse para proporcionar una modificación genética eficiente del genoma en linfocito T $\gamma\delta$. Las tecnologías descritas en el presente documento también podrían utilizarse para insertar el casete de expresión en una ubicación genómica que proporcione de manera simultánea la inactivación de un gen o una inserción de otro gen. Por ejemplo, un polinucleótido que comprende un casete de expresión de la descripción puede insertarse en una región genómica que codifique un gen de CMH. Dicha modificación genética puede proporcionar de manera simultánea la inserción de uno o más genes, por ejemplo, los genes comprendidos en el casete de expresión y la inactivación de otro gen, por ejemplo, un locus de CMH.

En un caso, un transposón bella durmiente que incluya un ácido nucleico que codifique el fracción de reconocimiento de tumores se introduce en el linfocito T $\gamma\delta$ que se está modificando genéticamente. Una transposasa bella durmiente mutante que proporcione una integración mejorada en comparación con la bella durmiente de tipo salvaje, tal como la transposasa descrita en US 7,985,739, puede utilizarse para introducir

un polinucleótido en el linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente.

En algunos casos, se utiliza un método viral para introducir un polinucleótido que comprende un fracción de reconocimiento de tumores en el genoma de un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente. Se ha utilizado una cantidad de métodos virales para la terapia genética humana, tales como los métodos descritos en WO 1993020221. Los ejemplos no taxativos de métodos virales que pueden utilizarse para modificar genéticamente un linfocito T $\gamma\delta$ incluyen métodos virales de retrovirus, adenovirus, lentivirus, del virus del herpes simple, virus vaccinia, virus de la viruela o virus adenoasociados.

- 10 Un polinucleótido que contiene el código genético de un fracción de reconocimiento de tumores puede comprender mutaciones u otros transgenes que afecten el crecimiento, proliferación, estado de activación del linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente o un antígeno específico de células tumorales, tales como antígenos específicos del cáncer de testículo. Un linfocito T $\gamma\delta$ de la descripción puede modificarse genéticamente para expresar un polinucleótido que comprende un dominio de activación que esté unido al fracción de reconocimiento de antígenos, tal como una molécula en un complejo de TCR y CD3 o un factor coestimulador. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede expresar un dominio de señalización intracelular que sea un dominio de activación de linfocitos T. El linfocito T $\gamma\delta$ puede modificarse genéticamente para expresar un gen de dominio de activación intracelular o un dominio de señalización intracelular. El gen de dominio de señalización intracelular puede ser, por ejemplo, CD3 ζ , CD28, CD2, ICOS, JAMAL, CD27, CD30, OX40, NKG2D, CD4, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, Fc ϵ R1 γ , ILRB/CD 122, IL-2RG/CD132, moléculas DAP, CD70, receptor de citocina, CD40 o cualquier combinación de estos. En algunos casos, el linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente también se modifica para expresar una citocina, un antígeno, un receptor celular u otra molécula inmunomoduladora.
- 25 El fracción de reconocimiento de tumores adecuado para expresarse mediante un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede seleccionarse con base en la expresión que será tratada. Por ejemplo, en algunos casos, un fracción de reconocimiento de tumores es un TCR. En algunos casos, un fracción de reconocimiento de tumores es un receptor de un ligando que se expresa en una célula cancerosa. Los ejemplos no taxativos de receptores adecuados incluyen NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKG2F, LLT1, AICL, CD26, NKR1, NKp30, NKp44, NKp46, CD244 (2B4), ADNM-1 y NKp80. En algunos casos, un fracción de reconocimiento de tumores puede incluir un ligando, por ejemplo, ligando de IL-13, o un mimético de ligando del antígeno tumoral, tal como el mimético de IL-13 para IL13R.

- 35 Un linfocito T $\gamma\delta$ puede modificarse genéticamente para expresar un fracción de reconocimiento de tumores quimérico que comprende un ligando que se une a un dominio derivado de NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKG2F, LLT1, AICL, CD26, NKR1, NKp30, NKp44, NKp46, CD244 (2B4), ADNM-1 y NKp80, o un anticuerpo antitumoral, tal como anti-Her2neu o anti-EGFR y un dominio de señalización obtenido de CD3- ζ , Dap 10, CD28, 4 IBB y CD40L. En algunos casos, el receptor quimérico se une a MICA, MICB, Her2neu, EGFR, mesotelina, CD38, CD20, CD19, PSA, RON, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, glicolípidoF77, proteína de activación de fibroblastos, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, c-met, CSPG4, Nectina-4, VEGFR2, PSCA, receptor/proteína de unión a folato, SLC44A4, Cripto, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MART1, tirosinasa, SSX2, SSX4, NYESO-1, antígeno tumoral epitelial (ETA), genes de la familia de MAGEA (tales como MAGE3A, MAGE4A), KKLC1, ras mutada, β raf, p53, molécula A relacionada con la cadena de CMH de clase I (MICA), molécula B relacionada con la cadena de CMH de clase I (MICB), VPH, CMV.

- 50 Dos o más restos de reconocimiento de tumores pueden expresarse en el linfocito T $\gamma\delta$ a partir de polinucleótidos de $\alpha\beta$ TCR genéticamente diferentes, sustancialmente diferentes o sustancialmente idénticos que se expresen de manera estable a partir del linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente o a partir de polinucleótidos de $\alpha\beta$ TCR incorporados de manera estable en el linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente. En el caso de $\alpha\beta$ TCR genéticamente distintos, pueden utilizarse $\alpha\beta$ TCR que reconocen diferentes antígenos asociados con la misma afección. En una realización, un linfocito T $\gamma\delta$ se modifica genéticamente para expresar TCR diferentes, de origen humano o de ratón, a partir de uno o más casetes de expresión que reconocen el mismo antígeno en el contexto de haplotipos de CMH diferentes. En otra realización preferida, se modifica un linfocito T $\gamma\delta$ para expresar un TCR y dos o más anticuerpos dirigidos a los mismos péptidos o péptidos diferentes de un antígeno dado en un complejo con diferentes haplotipos de CMH. En algunos casos, la expresión de un TCR simple mediante un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente facilita el apareamiento adecuado de TCR. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente que expresa TCR diferentes puede proporcionar un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente alogénico universal. En una segunda realización preferida, un linfocito T $\gamma\delta$ se modifica genéticamente para expresar uno o más anticuerpos diferentes dirigidos a complejos de péptido y CMH, cada uno dirigido al mismo péptido o a uno diferente en un complejo con los mismos haplotipos de CMH o haplotipos diferentes. En algunos casos, un fracción de reconocimiento de tumores puede ser un anticuerpo que se une a complejos de péptido y CMH.

Un linfocito T $\gamma\delta$ se puede modificar genéticamente para expresar TCR a partir de uno o más casetes de expresión que reconocen el mismo antígeno en el contexto de haplotipos de CMH diferentes. En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente se diseña para expresar un TCR simple, o un TCR en combinación con un CAR para minimizar la posibilidad de mal apareamiento del TCR dentro de la célula modificada genéticamente. El fracción de reconocimiento de tumores expresado a partir de uno o más casetes de expresión tiene preferentemente diferentes secuencias de polinucleótidos y codifica restos de reconocimiento de tumores que reconocen epítomos diferentes del mismo objetivo. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente que expresa dichos TCR o CAR diferentes puede proporcionar un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente alogénico universal.

En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ se modifica genéticamente para expresar uno o más restos de reconocimiento de tumores. Dos o más restos de reconocimiento de tumores pueden expresarse a partir de polinucleótidos quiméricos específicos de antígenos (CAR) genéticamente idénticos o sustancialmente idénticos, modificados genéticamente en el linfocito T $\gamma\delta$. Dos o más restos de reconocimiento de tumores pueden expresarse a partir de CAR distintos, modificados genéticamente en el linfocito T $\gamma\delta$. Los CAR genéticamente diferentes pueden diseñarse para reconocer antígenos diferentes asociados con la misma afección.

Un linfocito T $\gamma\delta$ puede ser de manera alternativa biespecífico. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente biespecífico puede expresar dos o más restos de reconocimiento de tumores. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente biespecífico puede expresar tanto restos de reconocimiento de tumores de TCR como de CAR. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente biespecífico puede diseñarse para reconocer antígenos diferentes asociados con la misma afección. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede expresar dos o más polinucleótidos biespecíficos de CAR/TCR que reconozcan un antígeno idéntico o sustancialmente idéntico. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede expresar dos o más construcciones biespecíficas de CAR/TCR que reconozcan antígenos distintos. En algunos casos, una construcción biespecífica de la descripción se une a un dominio activador y a un dominio inactivador de una célula objetivo, mediante lo cual proporciona un aumento de la especificidad objetivo. El linfocito T $\gamma\delta$ puede modificarse genéticamente para expresar al menos 1 fracción de reconocimiento de tumores, al menos 2 restos de reconocimiento de tumores, al menos 3 restos de reconocimiento de tumores, al menos 4 restos de reconocimiento de tumores, al menos 5 restos de reconocimiento de tumores, al menos 6 restos de reconocimiento de tumores, al menos 7 restos de reconocimiento de tumores, al menos 8 restos de reconocimiento de tumores, al menos 9 restos de reconocimiento de tumores, al menos 10 restos de reconocimiento de tumores, al menos 11 restos de reconocimiento de tumores, al menos 12 restos de reconocimiento de tumores, u otra cantidad adecuada de restos de reconocimiento de tumores.

La función adecuada de TCR puede mejorarse mediante dos proteínas ζ (zeta) funcionales que comprendan motivos IT AM. La función adecuada de TCR también puede mejorarse mediante la expresión de dominios de activación de $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, tales como CD28, CD2, CTLA4, ICOS, JAMAL, PD-1, CD27, CD30, 41-BB, OX40, NKG2D, HVEM o CD46. El polinucleótido expresado puede incluir el código genético para un fracción de reconocimiento de tumores, un resto enlazador y un dominio de activación. La traducción del polinucleótido mediante el linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede proporcionar un fracción de reconocimiento de tumores y un dominio de activación unido mediante un enlazador de proteínas. A menudo, el enlazador comprende aminoácidos que no obstruyen el pliegue del fracción de reconocimiento de tumores y el dominio de activación. Una molécula enlazadora puede tener una longitud de al menos 5 aminoácidos, al menos 6 aminoácidos, al menos 7 aminoácidos, al menos 8 aminoácidos, al menos 9 aminoácidos, al menos 10 aminoácidos, al menos 11 aminoácidos, al menos 12 aminoácidos, al menos 13 aminoácidos, al menos 14 aminoácidos, al menos 15 aminoácidos, al menos 16 aminoácidos, al menos 17 aminoácidos, al menos 18 aminoácidos, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos. En algunos casos, al menos 50 %, al menos 70 % o al menos 90 % de los aminoácidos en el enlazador son serina o glicina.

En algunos casos, un dominio de activación puede comprender una o más mutaciones. Las mutaciones adecuadas pueden ser, por ejemplo, mutaciones que produzcan la activación constitutiva de un dominio de activación. Alterar la identidad de uno o más ácidos nucleicos cambia la secuencia de aminoácidos del aminoácido traducido. Puede realizarse una mutación de ácido nucleico de manera tal que el aminoácido codificado se modifique para producir un aminoácido polar, no polar, básico o ácido. Puede realizarse una mutación de ácido nucleico de manera tal que el fracción de reconocimiento de tumores se optimice para reconocer un epítipo de un tumor. El fracción de reconocimiento de tumores modificado genéticamente, dominio de activación modificado genéticamente u otro componente modificado genéticamente de un linfocito T $\gamma\delta$ puede incluir más de 1 mutación de aminoácidos, 2 mutaciones de aminoácidos, 3 mutaciones de aminoácidos, 4 mutaciones de aminoácidos, 5 mutaciones de aminoácidos, 6 mutaciones de aminoácidos, 7 mutaciones de aminoácidos, 8 mutaciones de aminoácidos, 9 mutaciones de aminoácidos, 10 mutaciones de aminoácidos, 11 mutaciones de aminoácidos, 12 mutaciones de aminoácidos, 13 mutaciones de aminoácidos, 14 mutaciones de aminoácidos, 15 mutaciones de aminoácidos, 16 mutaciones de aminoácidos, 17 mutaciones de aminoácidos, 18 mutaciones de aminoácidos, 19 mutaciones de aminoácidos, 20 mutaciones de aminoácidos, 21 mutaciones de aminoácidos, 22 mutaciones de

aminoácidos, 23 mutaciones de aminoácidos, 24 mutaciones de aminoácidos, 25 mutaciones de aminoácidos, 26 mutaciones de aminoácidos, 27 mutaciones de aminoácidos, 28 mutaciones de aminoácidos, 29 mutaciones de aminoácidos, 30 mutaciones de aminoácidos, 31 mutaciones de aminoácidos, 32 mutaciones de aminoácidos, 33 mutaciones de aminoácidos, 34 mutaciones de aminoácidos, 35 mutaciones de aminoácidos, 36 mutaciones de aminoácidos, 37 mutaciones de aminoácidos, 38 mutaciones de aminoácidos, 39 mutaciones de aminoácidos, 40 mutaciones de aminoácidos, 41 mutaciones de aminoácidos, 42 mutaciones de aminoácidos, 43 mutaciones de aminoácidos, 44 mutaciones de aminoácidos, 45 mutaciones de aminoácidos, 46 mutaciones de aminoácidos, 47 mutaciones de aminoácidos, 48 mutaciones de aminoácidos, 49 mutaciones de aminoácidos o 50 mutaciones de aminoácidos.

En algunos casos, una célula T $\gamma\delta$ de la divulgación no expresa una o más moléculas MHC. La supresión de uno o más loci MHC en una célula T $\gamma\delta$ modificada por ingeniería puede disminuir la probabilidad de que la célula T $\gamma\delta$ modificada por ingeniería sea reconocida por el sistema inmunitario del huésped. Los loci del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) humano, conocido como sistema del antígeno leucocitario humano (HLA), comprenden una gran familia de genes que se expresa en las células presentadoras de antígenos, incluidas las células T $\gamma\delta$. Las moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C presentan péptidos intracelulares como antígenos a las células presentadoras de antígenos. Las moléculas HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ y HLA DR presentan péptidos extracelulares como antígenos a las células presentadoras de antígenos. Algunos alelos de los genes HLA se han asociado con la EICH, los trastornos autoinmunes y el cáncer. Una célula T $\gamma\delta$ modificada descrita en el presente documento puede modificarse aún más para carecer de uno o más genes HLA o para interrumpir su expresión génica. Una célula T $\gamma\delta$ modificada descrita en el presente documento puede modificarse aún más para que carezca de, o altere la expresión génica de uno o más componentes del complejo MHC, como la delección completa de uno o más genes MHC, la delección de exones específicos o la delección de la microglobulina $\beta 2$ (B2m). La escisión o la alteración genéticas de al menos un gen HLA puede proporcionar una célula T $\gamma\delta$ clínicamente terapéutica que puede administrarse a un sujeto con cualquier haplotipo HLA sin causar enfermedad huésped contra injerto. Una célula T $\gamma\delta$ modificada según se describe en el presente documento.

Un linfocito T $\gamma\delta$ puede modificarse genéticamente para carecer de uno o varios locus de HLA. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede modificarse genéticamente para carecer de un alelo de HLA-A, un alelo de HLA-B, un alelo de HLA-C, un alelo de HLA-DR, un alelo de HLA-DQ o un alelo de HLA-DP. En algunos casos, un alelo de HLA se asocia con una afección humana, tal como una afección autoinmunitaria. Por ejemplo, el alelo de HLA-B27 se ha asociado con artritis y uveítis, el alelo de HLA-DR2 se ha asociado con lupus eritematoso sistémico, el alelo de HLA-DR3 se ha asociado con deficiencia de 21-hidroxilasa, HLA-DR4 se ha asociado con la artritis reumatoide y diabetes tipo 1. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente que carece, por ejemplo, de un alelo de HLA-B27 puede administrarse a un sujeto que sufra de artritis sin que sea reconocido inmediatamente por el sistema inmunitario del sujeto. En algunos casos, la delección de uno o más locus de HLA proporciona un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente que es un donante universal para cualquier sujeto con cualquier haplotipo de HLA.

En algunos casos, modificar genéticamente un linfocito T $\gamma\delta$ requiere la delección de una parte del genoma del linfocito T $\gamma\delta$. En algunos casos, la parte eliminada del genoma comprende una parte de uno o más locus de CMH. En algunas instancias, el linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente deriva de un linfocito T $\gamma\delta$ humano de tipo salvaje y el locus de CMH es un locus de HLA. En algunos casos, la parte eliminada del genoma comprende una parte de un gen correspondiente a una proteína en el complejo de CMH. En algunos casos, la parte eliminada del genoma comprende el gen de microglobulina $\beta 2$. En algunas instancias, la parte eliminada del genoma comprende un gen de punto de control del sistema inmunitario, tal como PD-1, CTLA-4, LAG3, ICOS, BTLA, KIR, TIM3, A2aR, B7-H3, B7-H4 y CECAM-1. En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede diseñarse para expresar un dominio de activación que mejore la citotoxicidad y activación de linfocitos T. Los ejemplos no taxativos de dominios de activación que pueden expresarse mediante un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente incluyen: CD2, ICOS, 4-1 BB (CD 137), OX40 (CD 134), CD27, CD70, CD80, CD86, DAP, CD122, GITR, Fc ϵ Rlg.

Cualquier parte del genoma de un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede eliminarse para interrumpir la expresión de un gen de linfocito T $\gamma\delta$ endógeno. Los ejemplos no taxativos de regiones genómicas que pueden eliminarse o interrumpirse en el genoma del linfocito T $\gamma\delta$ incluyen un promotor, un activador, un mejorador, un exón, un intrón, un ARN no codificante, un micro-ARN, un ARN nuclear pequeño, repeticiones en tándem de número variable (VNTR, por sus siglas en inglés), repeticiones cortas en tándem (STR, por sus siglas en inglés), patrones de SNP, regiones hipervariables, minisatélites, repeticiones de dinucleótidos, repeticiones de trinucleótidos, repeticiones de tetranucleótidos o repeticiones de secuencia simple. En algunos casos, la parte eliminada del genoma oscila entre 1 ácido nucleico y alrededor de 10 ácidos nucleicos, 1 ácido nucleico y alrededor de 100 ácidos nucleicos, 1 ácido nucleico y alrededor de 1.000 ácidos nucleicos, 1 ácido nucleico y alrededor de 10.000 ácidos nucleicos, 1 ácido nucleico y alrededor de 100.000 ácidos nucleicos, 1 ácido nucleico y alrededor de 1.000.000 ácidos nucleicos, u otro intervalo adecuado.

La expresión génica de HLA en un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente también puede interrumpirse con diversos procedimientos conocidos en la técnica. En algunos casos, se utilizan tecnologías de edición genética de locus grandes para escindir un gen del genoma del linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente, o para interrumpir la expresión génica de al menos un locus de HLA en el linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente. Los ejemplos no taxativos de tecnologías de edición genética que pueden utilizarse para editar un locus deseado en un genoma de un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente incluyen repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR)-Cas, nucleasas de dedos de cinc (ZFN), nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción (TALEN), y tecnologías de meganucleasa, tal como se describe respectivamente en WO201409370, WO2003087341, WO2014134412 y WO 2011090804.

Un linfocito T $\gamma\delta$ puede modificarse genéticamente a partir de un linfocito T $\gamma\delta$ no modificado genéticamente que ya exprese un fracción de reconocimiento de tumores. El linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede retener un fracción de reconocimiento de células tumorales que se exprese de forma endógena mediante el linfocito T $\gamma\delta$ de tipo salvaje aislado. En algunos casos el fracción de reconocimiento de células tumorales del linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente reemplaza el $\gamma\delta$ TCR de tipo salvaje.

Un linfocito T $\gamma\delta$ puede modificarse genéticamente para expresar una o más moléculas de migración guiada. Las moléculas de migración guiada pueden ser, por ejemplo, receptores de migración guiada de linfocitos o moléculas de adhesión celular. Una molécula de migración guiada puede ayudar al linfocito T $\gamma\delta$ a migrar e infiltrar un tumor sólido, inclusive un tumor sólido dirigido al administrar el linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente al sujeto. Los ejemplos no taxativos de receptores de migración guiada incluyen miembros de la familia CCR, por ejemplo: CCR2, CCR4, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CLA, CD44, CD103, CD62L, E-selectina, P-selectina, L-selectina, integrinas, tales como VLA-4 y LFA-1. Los ejemplos no taxativos de moléculas de adhesión celular incluyen ICAM, N-CAM, VCAM, PE-CAM, L1-CAM, Nectina (PVRL1, PVRL2, PVRL3), LFA-1, integrina α X β 2, α v β 7, antígeno de macrófago-1, CLA-4, glicoproteína IIb/IIIa. Los ejemplos adicionales de las moléculas de adhesión celular incluyen moléculas dependientes del calcio, tales como T-cadherina y anticuerpos de metaloproteinasas de matriz (MMP, por sus siglas en inglés), tales como MMP9 o MMP2.

Las etapas implicadas en la maduración, activación, proliferación y función de linfocitos T puede regularse a través de señales coestimuladoras e inhibitoras a través de proteínas de puntos de control del sistema inmunitario. Los puntos de control del sistema inmunitario son elementos coestimuladores e inhibidores intrínsecos del sistema inmunitario. Los puntos de control del sistema inmunitario ayudan a mantener la autotolerancia y modulación de la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias fisiológicas para evitar lesiones a los tejidos cuando el sistema inmunitario responde a enfermedades, tales como infección o transformación celular. El equilibrio entre las señales coestimuladoras e inhibitoras utilizadas para controlar la respuesta inmunitaria ya sea de los linfocitos T $\gamma\delta$ como $\alpha\beta$ puede modularse mediante proteínas de puntos de control del sistema inmunitario. Las proteínas de puntos de control del sistema inmunitario, tales como PD1 y CTLA4 están presentes en la superficie de linfocitos T y pueden utilizarse para "encender" o "apagar" una respuesta inmunitaria. Los tumores pueden desregular la función de las proteínas de puntos de control como un mecanismo de resistencia inmunitaria, particularmente contra linfocitos T que sean específicos para antígenos tumorales. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción puede modificarse genéticamente de manera adicional para carecer de uno o más locus de puntos de control del sistema inmunitario, tales como PD-1, CTLA-4, LAG3, ICOS, BTLA, KIR, TIM3, A2aR, CEACAM1, B7-H3 y B7-H4. De manera alternativa, la expresión de un gen de punto de control inmunitario endógeno en un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción puede interrumpirse con tecnologías de edición genética,

Los puntos de control inmunológicos pueden ser moléculas que regulan vías de señalización inhibitorias (por ejemplo, CTLA4, PD1 y LAG3) o moléculas que regulan vías de señalización estimuladoras (por ejemplo, ICOS) en una célula T $\gamma\delta$ modificada según la divulgación. Varias proteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas extendidas pueden ser ligandos de puntos de control inmunológicos. Ejemplos no limitantes de proteínas ligando de puntos de control inmunológicos incluyen B7-H4, ICOSL, PD-L1, PD-L2, MegaCD40L, MegaOX40L y CD137L. En algunos casos, las proteínas ligando de punto de control inmunitario son antígenos expresados por un tumor. En algunos casos, el gen de punto de control inmunitario es un gen CTLA-4. En algunos casos, el gen de punto de control inmunitario es un gen PD-1.

PD1 es un receptor inhibidor que pertenece a la familia CD28/CTLA4 y se expresa en linfocitos T activados, células B, monocitos, DC y T-regs. Existen dos ligandos conocidos para PD1, PD-L1 y PD-L2, que se expresan en células T, APC y células malignas y funcionan para suprimir los linfocitos autorreactivos e inhibir la función efectora de los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de TAA. Por consiguiente, una célula T $\gamma\delta$ modificada que carece de PD1 puede conservar su actividad citotóxica independientemente de la expresión de PD-L1 y PD-L2 por las células tumorales. En algunos casos, una célula T $\gamma\delta$ modificada de la divulgación carece del locus genético para el gen PD-1. En algunos casos, la expresión del gen PD-1 en una célula T $\gamma\delta$ modificada se interrumpe mediante tecnologías de edición de genes.

CTLA4 (antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos) también se conoce como CD152 (Cluster of differentiation 152). CTLA4 comparte homología de secuencia y ligandos (CD80/B7-1 y CD86/B7-2) con la molécula coestimuladora CD28, pero se diferencia por emitir señales inhibitorias a las células T que expresan CTLA4 como receptor. CTLA4 tiene una afinidad global mucho mayor por ambos ligandos y puede competir con CD28 en la unión cuando las densidades de ligando son limitantes. CTLA4 se expresa a menudo en la superficie de las células T efectoras CD8⁺ y desempeña un papel funcional en las fases iniciales de activación de las células T ingenuas y de memoria. CTLA4 contrarresta la actividad de CD28 a través de una mayor afinidad por CD80 y CD86 durante las primeras fases de activación de las células T. Las principales funciones de CTLA4 incluyen la modulación descendente de las células T auxiliares y la potenciación de la actividad inmunosupresora de las células T reguladoras. En algunos casos, una célula T y δ modificada de la divulgación carece del gen CTLA4. En algunos casos, la expresión del gen CTLA4 en una célula T y δ modificada se interrumpe mediante tecnologías de edición de genes.

LAG3 (gen de activación linfocitaria 3) se expresa en las células T citotóxicas específicas de antígeno activadas, y puede potenciar la función de las células T reguladoras e inhibir de forma independiente la actividad de las células T efectoras CD8⁺. LAG3 es una proteína reguladora negativa similar a CD-4 con una unión de alta afinidad a las proteínas CMH de clase II, que están reguladas al alza en algunos cánceres epiteliales, lo que conduce a la tolerancia de la proliferación de células T y la homeostasis. La reducción de la interacción de Clase II/LAG-3 mediante el uso de una proteína de fusión LAG-3-IG puede potenciar las respuestas inmunitarias antitumorales. En algunos casos, un linfocito T y δ modificado genéticamente de la descripción carece del locus genético para el gen LAG3. En algunas instancias, la expresión del gen LAG3 en un linfocito T y δ modificado genéticamente se interrumpe mediante tecnologías de edición genética.

Fenotipo de células t y δ modificadas genéticamente

Un linfocito T y δ modificado genéticamente puede migrar a una ubicación física específica en el cuerpo de un sujeto. La migración y migración guiada de linfocitos T y δ modificados genéticamente puede depender de la expresión y acciones combinadas de quimiocinas y/o moléculas de adhesión específicas. La migración guiada de linfocitos T y δ modificados genéticamente puede controlarse mediante la interacción entre quimiocinas y sus receptores. Por ejemplo, las citocinas, inclusive, de modo no taxativo, CXCR3 (cuyos ligandos están representados por IP-10/CXCL10 y 6Ckine/SLC/CCL21) CCR4+ CXCR5+ (receptor para RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β) CCR6+ y CCR7 pueden afectar la migración guiada de los linfocitos T y δ modificados genéticamente. En algunos casos, un linfocito T y δ modificado genéticamente puede migrar a sitios de inflamación y lesiones, y a célula enfermas para realizar funciones de reparación. En algunos casos, un linfocito T y δ modificado genéticamente puede migrar a un cáncer. En algunos casos, un linfocito T y δ modificado genéticamente puede migrar al timo, médula ósea, piel, laringe, tráquea, pleura, pulmón, esófago, abdomen, estómago, intestino delgado, intestino grueso, hígado, páncreas, riñón, uretra, vejiga, testículos, próstata, conducto deferente, ovario, útero, glándula mamaria, glándula paratiroides, bazo u otro sitio en el cuerpo de un sujeto. Un linfocito T y δ modificado genéticamente puede expresar uno o más restos de migración guiada, tal como un alelo de TCR particular y/o una molécula de migración guiada de linfocitos.

Un linfocito T y δ modificado genéticamente puede tener un fenotipo particular y un fenotipo puede describirse en términos de la expresión del marcador de la superficie celular. Pueden modificarse genéticamente diversos tipos de linfocitos T y δ , tal como se describe en el presente documento. En realizaciones preferidas, el linfocito T y δ modificado genéticamente deriva de un ser humano, pero el linfocito T y δ modificado genéticamente también puede derivar de una fuente diferente, tal como un mamífero o una célula sintética.

Antígenos

Las células T y δ de la presente divulgación pueden diseñarse para expresar una fracción de reconocimiento de antígeno, en donde el fracción de reconocimiento de antígenos reconoce un epítipo específico de una enfermedad. Un antígeno puede ser una molécula que provoque una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar ya sea la producción de anticuerpos, la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. Un antígeno puede ser, por ejemplo, un péptido, una proteína, un hapteno, un lípido, un carbohidrato, bacterias, un patógeno o un virus. Un antígeno puede ser un antígeno tumoral. Un epítipo tumoral puede ser presentado por los complejos de CMH I o CMH II en la superficie de las células tumorales. Un epítipo puede ser una parte del antígeno que se expresa en la superficie celular y es reconocida por el fracción de reconocimiento de tumores.

Los ejemplos no taxativos de antígenos reconocidos por un linfocito T y δ modificado genéticamente incluyen CD-19, CD-30, CD-22, CD37, CD38, CD-33, CD-138, CD-123, CD-79b, CD-70, CD-75, CA6, GD2, alfafetoproteína, antígeno carcinoembrionario, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, glicolípido F77, proteína activadora de fibroblastos, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, mesotelina, c-met, CSPG4, Nectina-4, VEGFR2, PSCA, receptor/proteína de unión a folato, SLC44A4, Cripto, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MART1, tirosinasa, SSX2, SSX4, NYESO-1, antígeno tumoral epitelial, MAGEA, KKLC1, ras mutada, β raf, p53, MICA y MICB, u otro antígeno asociado con una afección.

Véase la lista revisada - CD19, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), RON, CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, glicolípidio F77, proteína activadora de fibroblastos, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, mesotelina, c-met, CSPG4, Nectina-4, VEGFR2, PSCA, receptor/proteína de unión a folato, SLC44A4, Cripto, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MART1, tirosinasa, SSX2, SSX4, NYESO-1, antígeno tumoral epitelial (ETA), genes de la familia de MAGEA (tales como MAGE3A, MAGE4A), KKLC1, ras mutada, β raf, p53, molécula A relacionada con la cadena de CMH de clase I (MICA), molécula B relacionada con la cadena de CMH de clase I (MICB), VPH, CMV.

Un antígeno puede expresarse en el compartimento intracelular o extracelular de una célula y un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede reconocer un antígeno tumoral intracelular o extracelular. En algunos casos, un $\alpha\beta$ TCR en el linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente reconoce un péptido derivado ya sea de un antígeno tumoral intracelular o extracelular. Por ejemplo, un antígeno puede ser una proteína producida de forma intracelular o extracelular mediante una célula infectada con un virus, tal como una proteína de VIH, VEB, CMV o VPH. Un antígeno puede ser también una proteína expresada de forma intracelular o extracelular por una célula cancerosa.

Una fracción de reconocimiento de antígeno puede reconocer un antígeno de una célula en peligro, como una célula cancerosa o una célula infectada por un virus. Por ejemplo, los genes humanos relacionados con la cadena MHC de clase I (MICA y MICB) están localizados en la región HLA de clase I del cromosoma 6. Las proteínas MICA y MICB se consideran marcadores de una célula en peligro. Las proteínas MICA y MICB se consideran marcadores de «estrés» en los epitelios humanos, y actúan como ligandos para las células que expresan un receptor común de células asesinas naturales (NKG2D). Como marcadores de estrés, MICA y MICB pueden ser altamente expresados por células cancerosas. Una célula T $\gamma\delta$ modificada puede reconocer un epítipo tumoral MICA o MICB.

Un fracción de reconocimiento de tumores puede modificarse genéticamente para reconocer un antígeno con determinada avidéz. Por ejemplo, un fracción de reconocimiento de tumores codificado por una construcción de CAR o TCR puede reconocer un antígeno con una constante de disociación de al menos 10 fM, al menos 100 fM, al menos 1 picomolar (pM), al menos 10 pM, al menos 20 pM, al menos 30 pM, al menos 40 pM, al menos 50 pM, al menos 60 pM, al menos 7 pM, al menos 80 pM, al menos 90 pM, al menos 100 pM, al menos 200 pM, al menos 300 pM, al menos 400 pM, al menos 500 pM, al menos 600 pM, al menos 700 pM, al menos 800 pM, al menos 900 pM, al menos 1 nanomolar (nM), al menos 2 nM, al menos 3 nM, al menos 4 nM, al menos 5 nM, al menos 6 nM, al menos 7 nM, al menos 8 nM, al menos 9 nM, al menos 10 nM, al menos 20 nM, al menos 30 nM, al menos 40 nM, al menos 50 nM, al menos 60 nM, al menos 70 nM, al menos 80 nM, al menos 90 nM, al menos 100 nM, al menos 200 nM, al menos 300 nM, al menos 400 nM, al menos 500 nM, al menos 600 nM, al menos 700 nM, al menos 800 nM, al menos 900 nM, al menos 1 μ M, al menos 2 μ M, al menos 3 μ M, al menos 4 μ M, al menos 5 μ M, al menos 6 μ M, al menos 7 μ M, al menos 8 μ M, al menos 9 μ M, al menos 10 μ M, al menos 20 μ M, al menos 30 μ M, al menos 40 μ M, al menos 50 μ M, al menos 60 μ M, al menos 70 μ M, al menos 80 μ M, al menos 90 μ M o al menos 100 μ M.

En algunas instancias, un fracción de reconocimiento de tumores puede modificarse genéticamente para reconocer un antígeno con una constante de disociación de como máximo 10 fM, como máximo 100 fM, como máximo 1 picomolar (pM), como máximo 10 pM, como máximo 20 pM, como máximo 30 pM, como máximo 40 pM, como máximo 50 pM, como máximo 60 pM, como máximo 7 pM, como máximo 80 pM, como máximo 90 pM, como máximo 100 pM, como máximo 200 pM, como máximo 300 pM, como máximo 400 pM, como máximo 500 pM, como máximo 600 pM, como máximo 700 pM, como máximo 800 pM, como máximo 900 pM, como máximo 1 nanomolar (nM), como máximo 2 nM, como máximo 3 nM, como máximo 4 nM, como máximo 5 nM, como máximo 6 nM, como máximo 7 nM, como máximo 8 nM, como máximo 9 nM, como máximo 10 nM, como máximo 20 nM, como máximo 30 nM, como máximo 40 nM, como máximo 50 nM, como máximo 60 nM, como máximo 70 nM, como máximo 80 nM, como máximo 90 nM, como máximo 100 nM, como máximo 200 nM, como máximo 300 nM, como máximo 400 nM, como máximo 500 nM, como máximo 600 nM, como máximo 700 nM, como máximo 800 nM, como máximo 900 nM, como máximo 1 μ M, como máximo 2 μ M, como máximo 3 μ M, como máximo 4 μ M, como máximo 5 μ M, como máximo 6 μ M, como máximo 7 μ M, como máximo 8 μ M, como máximo 9 μ M, como máximo 10 μ M, como máximo 20 μ M, como máximo 30 μ M, como máximo 40 μ M, como máximo 50 μ M, como máximo 60 μ M, como máximo 70 μ M, como máximo 80 μ M, como máximo 90 μ M o como máximo 100 μ M.

Aislamiento de linfocitos t $\gamma\delta$

En algunos aspectos, en el presente documento descripción proporciona métodos para la modificación genética de linfocitos T $\gamma\delta$ que se aislaron de un sujeto. Un linfocito T $\gamma\delta$ puede aislarse de una muestra compleja de un sujeto. Una muestra compleja puede ser una muestra de sangre periférica, una muestra de sangre de cordón umbilical, un tumor, un precursor de célula madre, una biopsia de tumor, un tejido, linfa, o de sitios epiteliales de un sujeto, puesta directamente en contacto el entorno externo o derivada de células

precursoras madres. Un linfocito T $\gamma\delta$ puede aislarse directamente de una muestra compleja de un sujeto, por ejemplo, al clasificar los linfocitos T $\gamma\delta$ que expresan uno o más marcadores de la superficie celular con técnicas de citometría de flujo. Los linfocitos T $\gamma\delta$ presentan numerosas moléculas de adhesión, reconocimiento de antígenos, presentación de antígenos y coestimulación que pueden asociarse con un linfocito T $\gamma\delta$. Puede utilizarse uno o más marcadores de la superficie celular, tales como reconocimiento de antígenos, presentación de antígenos, ligandos, moléculas de adhesión, moléculas coestimuladoras o TCR $\gamma\delta$ específicos para aislar un linfocito T $\gamma\delta$ de tipo salvaje de una muestra compleja. Diversas moléculas asociadas con un linfocito T $\gamma\delta$, o expresadas por este, pueden utilizarse para aislar un linfocito T $\gamma\delta$ de una muestra compleja. En algunos casos, en el presente documento descripción proporciona métodos para el aislamiento de poblaciones mixtas de células V δ 1⁺, V δ 2⁺, V δ 3⁺ o cualquier combinación de estas.

Las células mononucleares de sangre periférica se pueden recoger de un sujeto, por ejemplo, con una máquina de aféresis, inclusive el sistema Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare) u otro sistema/dispositivo adecuado. Los linfocitos T $\gamma\delta$ o una subpoblación deseada de linfocitos T $\gamma\delta$ pueden purificarse a partir de la muestra recogida, por ejemplo, con tecnologías de citometría de flujo. Las células de sangre de cordón umbilical también pueden obtenerse a partir de sangre del cordón umbilical durante el nacimiento de un sujeto.

La selección positiva y/o negativa de marcadores de la superficie celular expresados en los linfocitos T $\gamma\delta$ recogidos puede utilizarse para aislar de forma directa un linfocito T $\gamma\delta$, o una población de linfocitos T $\gamma\delta$ que exprese marcadores de la superficie celular similares de una muestra de sangre periférica, una muestra de sangre de cordón umbilical, una biopsia de tumor, un tejido, linfa o a partir de una muestra epitelial de un sujeto. Por ejemplo, un linfocito T $\gamma\delta$ puede aislarse de una muestra compleja basándose en la expresión positiva o negativa de CD2, CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD44, Kit, TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ , NKG2D, CD70, CD27, CD30, CD 16, CD337 (NKp30), CD336 (NKp46), OX40, CD46, CCR7 y otros marcadores de la superficie celular adecuados.

Un linfocito T $\gamma\delta$ puede aislarse de una muestra compleja que se cultivó *in vitro*. En algunas realizaciones, la población de PBMC entera, sin eliminación previa de poblaciones celulares específicas, tales como monocitos, linfocitos T $\alpha\beta$, linfocitos B y linfocitos citolíticos pueden activarse y expandirse. En otras realizaciones, las poblaciones enriquecidas de linfocitos T $\gamma\delta$ pueden generarse antes de su activación y expansión específicas. En algunos aspectos, la activación de linfocitos T $\gamma\delta$ se realiza sin la presencia de APC naturales o modificados genéticamente. En algunos casos, el aislamiento y expansión de los linfocitos T $\gamma\delta$ a partir de muestras de tumores se puede llevar a cabo mediante el uso de mitógenos de linfocitos T $\gamma\delta$ inmovilizados, inclusive anticuerpos específicos de $\gamma\delta$ TCR y otros agentes activadores de $\gamma\delta$ TCR, inclusive lectinas. En la invención, la expansión de células T $\gamma\delta$ se realiza utilizando anticuerpos inmovilizados según las reivindicaciones.

Las células T $\gamma\delta$ pueden expandirse rápidamente en respuesta al contacto con uno o más antígenos. Algunas células T $\gamma\delta$, como las células T $\gamma\delta$ V γ 9V δ 2⁺, se expanden rápidamente *in vitro* en respuesta al contacto con algunos antígenos, como los prenilepírofosfatos, las alquilaminas y los metabolitos o extractos microbianos durante el cultivo de tejidos. Además, algunas células T $\gamma\delta$ de tipo salvaje, como las células T $\gamma\delta$ V γ 2V δ 2⁺, se expanden rápidamente *in vivo* en humanos en respuesta a ciertos tipos de vacunación. Las células T $\gamma\delta$ estimuladas pueden presentar numerosas moléculas de presentación de antígenos, coestimulación y adhesión que pueden facilitar el aislamiento de una célula o células T $\gamma\delta$ a partir de una muestra compleja. Una(s) célula(s) $\gamma\delta$ T dentro de una muestra compleja puede ser estimulada *in vitro* con al menos un antígeno durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, u otro periodo de tiempo adecuado. La estimulación de la célula T $\gamma\delta$ con un antígeno adecuado puede expandir la población de células T $\gamma\delta$ *in vitro*.

Los ejemplos no taxativos de antígenos que pueden utilizarse para estimular la expansión de los linfocitos T $\gamma\delta$ a partir de una muestra compleja *in vitro* incluyen, prenilepírofosfatos, tal como pirofosfato de isopentenilo (IPP), alquilaminas, metabolitos de patógenos microbianos humanos, metabolitos de bacterias comensales, - metil-3-butenil-1-pirofosfato (2M3B1PP), pirofosfato de (E)-4-hidroxi-3- metil-but-2-enilo (HMB-PP), pirofosfato de etilo (EPP), pirofosfato de farnesilo (FPP), fosfato de dimetilalilo (DMAP), pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), trifosfato de etil-adenosina (EPPPA), pirofosfato de geranilo (GPP), pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP), trifosfato de isopentenil-adenosina (IPPPA), fosfato de monoetilo (MEP), pirofosfato de monoetilo (MEPP), 3-formil-1-butil-pirofosfato (TUBAg 1), X-pirofosfato (TUBAg 2), trifosfato de 3-formil-1-butil-uridina (TUBAg 3), trifosfato de 3-formil-1-butil-deoxitimidina (TUBAg 4), monoetil alquilaminas, pirofosfato de alilo, pirofosfato de crotoilo, trifosfato de dimetilalil- γ -uridina, trifosfato de crotoil- γ -uridina, trifosfato de alil- γ -uridina, etilamina, isobutil amina, sec-butilamina, iso-amilamina y bisfosfonatos que contienen nitrógeno.

La activación y expansión de los linfocitos T $\gamma\delta$ puede realizarse mediante el uso de agentes de activación y coestimuladores descritos en el presente documento para activar poblaciones de persistencia y proliferación específica de linfocitos T $\gamma\delta$. En algunas realizaciones, la activación y expansión de linfocitos T $\gamma\delta$ a partir de cultivos diferentes puede lograr subconjuntos de población clonal o policlonal mixta distinta. En algunas

realizaciones, pueden utilizarse diferentes agentes agonistas para identificar agentes que proporcionan señales de activación específicas de $\gamma\delta$. En un aspecto, los agentes que proporcionan señales de activación de $\gamma\delta$ específicas pueden ser diferentes anticuerpos monoclonales (MAb) dirigidos contra los $\gamma\delta$ TCR. En un aspecto, los MAb pueden unirse a diferentes epítomos en las regiones variable o constante de γ TCR y/o δ TCR. En un aspecto, los MAb pueden dirigirse a o dominios en la región variable de V δ 1 (Mab TS8.2 (Thermo scientific n.º TCR1730; Mab TC1, Mab R9.12 (Beckman Coulter)), o la cadena de V δ 2 (Mab 15D (Thermo Scientific n.º TCR1732)). Se evaluó la capacidad de estos MAb de activar de expandir y activar de manera específica una población única de subconjuntos de células V δ 1 o V δ 2 (Figura 4). La Figura 4 representa el crecimiento de linfocitos T δ 2 en medio que contenía suero (R2: RPMI+FBS al 10 %) y medio libre de suero (AIMV + albúmina bovina; medio libre de suero CTS Optimizer con complemento libre de suero CTS). Todo el medio contenía 100 IU/mL de IL-2, glutamina 2 mM y 1x penicilina/estreptomicina. Las células se estimularon con ácido zoledrónico a 1, 5 y 20 μ M en el día 0. El medio se repuso cada 2-3 días sin adición de más ácido zoledrónico. Se indica la cantidad total de linfocitos T δ 2 expandidos a partir de 10^6 de PBMC y la proporción de la expansión después de 13 días para cada condición. En algunas realizaciones, pueden identificarse agentes coestimuladores auxiliares para asistir a activar la proliferación de linfocitos T $\gamma\delta$ sin inducir apoptosis o anergia celular. Estos agentes coestimuladores pueden incluir ligandos de receptores expresados en linfocitos $\gamma\delta$, tales como NKG2D, CD161, CD70, JAML, molécula auxiliar ADN1 (ADNM-1) ICOS, CD27, CD137, CD30, HVEM, SLAM, CD122, DAP y CD28-. En algunos aspectos, los agentes coestimuladores pueden ser anticuerpos específicos de epítomos únicos en moléculas CD2 y CD3. CD2 y CD3 pueden tener estructuras conformacionales diferentes cuando se expresan en linfocitos T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ y, en algunos casos, los anticuerpos específicos de CD3 y CD2 pueden llevar a una activación distintiva de linfocitos T $\gamma\delta$.

Una población de linfocitos T $\gamma\delta$ puede expandirse *ex vivo* antes de la modificación genética de los linfocitos T $\gamma\delta$. Los ejemplos no taxativos de reactivos que pueden utilizarse para facilitar la expansión de la población de linfocitos T $\gamma\delta$ *in vitro* incluye anticuerpos anti-CD3 o anti-CD2, anti-CD27, anti-CD30, anti-CD70, anti-OX40, IL-2, IL-15, IL-12, IL-9, IL-33, IL-18 o IL-21, CD70 (ligando de CD27), fitohemaglutinina (PHA), concavalina A (ConA), fitolaca (PWM), aglutinina de maní y proteína (PNA), aglutinina de soja (SBA), Aglutinina de Les Culinaris (LCA), Aglutinina de Pisum Sativum (PSA), aglutinina de Helix pomatia (HPA), lectina de Vicia graminea Lectin (VGA) u otro mitógeno adecuado capaz de estimular la proliferación de linfocitos T. La modificación genética de los linfocitos T $\gamma\delta$ puede comprender integrar de manera estable una construcción que expresa un fracción de reconocimiento de tumores, tal como un $\alpha\beta$ TCR, un $\gamma\delta$ TCR, un CAR que codifica un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de este o un dominio de activación de linfocitos en el genoma de los linfocitos T $\gamma\delta$ aislados, una citocina (IL-15, IL-12, IL-2, IL-7, IL-21, IL-18, IL-19, IL-33, IL-4, IL-9, IL-23, IL1(3) para potenciar la proliferación, supervivencia y función de los linfocitos T *ex vivo* e *in vivo*. La modificación genética del linfocito T $\gamma\delta$ aislado puede comprender también la eliminación o interrupción de la expresión génica de uno o más genes endógenos en el gen del linfocito T $\gamma\delta$ aislado, tal como uno o más locus de CMH.

Expansión *ex vivo* de linfocitos t $\gamma\delta$ modificados genéticamente

En otros aspectos, en el presente documento descripción proporciona métodos para la expansión *ex vivo* de una población de linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente para la terapia de transferencia adoptiva. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción puede expandirse *ex vivo*. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción puede expandirse *in vitro* sin activación mediante APC o sin cocultivo con APC y aminofosfatos.

Un método de la invención puede expandir una población de células T δ 1 o δ 2 $\gamma\delta$ según las reivindicaciones adjuntas. En algunos casos, una población de células T $\gamma\delta$ puede expandirse *in vitro* en menos de 36 días, menos de 35 días, menos de 34 días, menos de 33 días, menos de 32 días, menos de 31 días, menos de 30 días, menos de 29 días, menos de 28 días, menos de 27 días, menos de 26 días, menos de 25 días, menos de 24 días, menos de 23 días, menos de 22 días, menos de 21 días, menos de 20 días, menos de 19 días, menos de 18 días, menos de 17 días, menos de 16 días, menos de 15 días, menos de 14 días, menos de 13 días, menos de 12 días, menos de 11 días, menos de 10 días, menos de 9 días, menos de 8 días, menos de 7 días, menos de 6 días, menos de 5 días, menos de 4 días, menos de 3 días.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para expandir diversas células $\gamma\delta$ T *in vitro*, incluidas células $\gamma\delta$ T de ingeniería y no de ingeniería, poniendo en contacto las células $\gamma\delta$ T con un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el agente de activación activa de manera específica el crecimiento de poblaciones de linfocitos δ 1. En otros casos, el agente de activación activa de manera específica el crecimiento de poblaciones de linfocitos δ 2.

Un agente de activación puede estimular la expansión de linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente y no modificados genéticamente con una tasa de crecimiento elevada. Por ejemplo, un agente que estimula una expansión de la población de linfocitos T $\gamma\delta$ a una tasa promedio de 1 división celular en menos de 30 horas, 1 división celular en menos de 29 horas, 1 división celular en menos de 28 horas, 1 división celular en menos

de 27 horas, 1 división celular en menos de 26 horas, 1 división celular en menos de 25 horas, 1 división celular en menos de 24 horas, 1 división celular en menos de 23 horas, 1 división celular en menos de 22 horas, 1 división celular en menos de 21 horas, 1 división celular en menos de 20 horas, 1 división celular en menos de 19 horas, 1 división celular en menos de 18 horas, 1 división celular en menos de 17 horas, 1 división celular en menos de 16 horas, 1 división celular en menos de 15 horas, 1 división celular en menos de 14 horas, 1 división celular en menos de 13 horas, 1 división celular en menos de 12 horas, 1 división celular en menos de 11 horas, 1 división celular en menos de 10 horas, 1 división celular en menos de 9 horas, 1 división celular en menos de 8 horas, 1 división celular en menos de 7 horas, 1 división celular en menos de 6 horas, 1 división celular en menos de 5 horas, 1 división celular en menos de 4 horas, 1 división celular en menos de 3 horas, 1 división celular en menos de 2 horas.

En algunos casos, un agente de activación puede estimular la expansión de los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente y no modificados genéticamente a una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 4 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 5 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 6 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 7 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 8 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 9 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 10 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 11 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 12 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 13 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 14 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 15 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 16 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 17 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 18 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 19 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 20 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 21 horas, una tasa de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 22 horas, una tasa de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 23 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 24 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 25 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 26 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 27 horas, una tasa de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 28 horas, una tasa de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 29 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 30 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 31 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 32 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 33 horas, una tasa de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 34 horas, una tasa de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 35 horas, una tasa promedio de aproximadamente 1 división cada aproximadamente 36 horas.

Un agente de activación puede estimular la expansión de subpoblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente y no modificados genéticamente con diferentes tasas de crecimiento. Por ejemplo, un agente que estimula el crecimiento de una población de linfocitos $\delta 1$ con una tasa más elevada, de manera que durante un período de tiempo de 1 a 90 días el cultivo experimenta una expansión de 10 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 10.000 veces, 100.000 veces o 1 000.000 veces en comparación con otra población de linfocitos T $\gamma\delta$, tal como una población $\delta 2$ o $\delta 3$, u otra subpoblación $\gamma\delta$. En otros casos, el agente puede estimular el crecimiento de una población $\delta 2$ con una tasa más elevada, de manera que durante un período de tiempo de 1 a 90 días el cultivo experimenta una expansión de 10 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 10.000 veces, 100.000 veces o 1 000.000 veces sobre la población de células T $\delta 1$, la población de células T $\delta 3$ u otra subpoblación de células T $\gamma\delta$.

La invención proporciona una composición que comprende una población de células T $\gamma\delta$ y un agente que estimula una expansión de la población de células T $\gamma\delta$, de acuerdo con las reivindicaciones anexas.

Uno o más agentes de activación pueden entrar en contacto con los linfocitos T $\gamma\delta$ y después de esto una molécula coestimuladora puede entrar en contacto con los linfocitos T $\gamma\delta$ para proporcionar estimulación adicional y expandir los linfocitos T $\gamma\delta$. En algunas realizaciones, el agente coestimulador puede ser lectina de origen vegetal y no vegetal, anticuerpos monoclonales que activen linfocitos T $\gamma\delta$ y otros agentes diferentes a lectina/diferentes a anticuerpos. En otros casos, la lectina vegetal puede ser concanavalina A (ConA), aunque pueden utilizarse otras lectinas vegetales, tal como fitohemaglutinina (PHA). Otros ejemplos de lectinas incluyen aglutinina de maní y proteína (PNA), aglutinina de soja (SBA), aglutinina de les culinaris (LCA), aglutinina de pisum sativum (PSA), aglutinina de Helix pomatia (HPA), lectina de Vicia graminea Lectin (VGA).

En una realización, el agente de activación es un anticuerpo seleccionado del grupo formado por los anticuerpos TS8.2, 15D, B6, TS-1 y R0.12, en el que el anticuerpo está inmovilizado en una superficie. Los ejemplos no taxativos de moléculas coestimuladoras incluyen anticuerpos, tales como 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, y3.20, 7A5, IMMU510, R9.12, 11F2 o una combinación de estos. Otros ejemplos de moléculas coestimuladoras incluyen zoledronato, forbol 12-miristato-13-acetato (TP A), mecereína, enterotoxina estafilocócica A (SEA, por sus siglas en inglés), proteína estreptocócica A o una combinación de estos.

En otros casos, el agente coestimulador puede ser anticuerpos o ligandos de α TCR, β TCR, γ TCR, δ TCR, CD277, CD28, CD46, CTLA4, ICOS, PD-1, CD30, NKG2D, NKG2A, HVEM, 4-1 BB (CD137), OX40 (CD134), CD70, CD80, CD86, DAP, CD122, GITR, FcεRIg, CD1, CD16, CD161, ADNX, molécula auxiliar 1 (ADNM-1), SLAM, receptor de adenovirus y virus de Coxsackie o una combinación de estos.

15 Identificación de epítomos

En un aspecto, la descripción proporciona un método para identificar el epítipo de un agente que estimula la expansión de linfocitos T y modificados genéticamente y no modificados genéticamente con una tasa de crecimiento elevada. Un epítipo puede incluir al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos en una conformación espacial única. Los epítomos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el pliegue terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se pueden conservar ante la exposición a solventes desnaturizantes, mientras que los epítomos formados mediante pliegue terciario típicamente se pierden con el tratamiento con solventes desnaturizantes.

Se puede realizar el mapeo de epítomos para identificar las secuencias de aminoácidos discontinuas no lineales o lineales, es decir, el epítipo, que se reconoce mediante un agente de activación de interés, tales como los anticuerpos 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, 3.20, IMMU510, R9.12, 11F2 y 7A5. Un abordaje general para el mapeo de epítomos puede requerir la expresión de la secuencia de polipéptidos de longitud completa que es reconocida por un anticuerpo o ligando de interés, así como diversos fragmentos, es decir, formas truncadas de la secuencia de polipéptidos, generalmente en un sistema de expresión heteróloga. Estas diversas secuencias de polipéptidos recombinantes o fragmentos de estas (por ejemplo, fusionados con una proteína del extremo N (por ejemplo, GFP)) pueden utilizarse entonces para determinar si el anticuerpo o ligando de interés es capaz de unirse a una o más de las formas truncadas de la secuencia de polipéptidos. A través del uso de truncado reiterativo y la generación de secuencias de polipéptidos recombinantes con regiones superpuestas de aminoácidos es posible identificar la recombinante de la secuencia de polipéptidos que es reconocida por el anticuerpo de interés (véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)). Los métodos se basan en la capacidad de un agente, como un anticuerpo de interés, para unirse a secuencias que se han recreado a partir de bibliotecas de epítomos, como bibliotecas de epítomos derivadas de conjuntos de péptidos sintéticos en soportes de membrana o bibliotecas de péptidos combinatorias de visualización de fagos. Las bibliotecas de epítomos proporcionan entonces un abanico de posibilidades que se comparan con un anticuerpo. Además, para confirmar la identidad de un epítipo, se puede llevar a cabo una mutagénesis específica o un escaneo aleatorio de Ala, dirigido a uno o más residuos de un epítipo.

Puede crearse una biblioteca de epítomos mediante el diseño sintético de diversas recombinaciones posibles de un receptor de linfocitos T y ($\gamma\delta$ TCR) como construcciones de ADNc y la expresión de estas en un sistema adecuado. Por ejemplo, pueden diseñarse de manera sintética múltiples segmentos de genes V δ 1 que difieran en su región J δ , inclusive segmentos de genes J δ 1, J δ 2 y J δ 3. De manera alternativa, se pueden ordenar también cadenas de V62J61 y V63J61 como genes sintéticos y pueden clonarse para crear vectores adecuados. Pueden cotransfectarse múltiples cadenas de δ TCR clonadas de forma sintética, tal como las cadenas V δ 1J δ 1, V δ 1J δ 2, V δ 1J δ 3, V51J54, V δ 2 y V δ 3 en un sistema huésped con cadenas γ TCR clonadas de forma sintética, tal como los segmentos de genes Vy2, Vy3, Vy4, Vy5, Vy8, Vy9 y Vy10 diseñados de forma sintética. En otros casos, las cadenas de δ TCR, tales como las cadenas V δ 1J δ 1, V δ 1J δ 2, V δ 1J δ 3, V δ 1J δ 4, V δ 2 y V δ 3, pueden amplificarse a partir de ARN total extraído de PBMC humanas o linfocitos T y aislados de tejido humano normal y maligno.

El sistema huésped puede ser cualquier sistema de expresión adecuado, como células 293, células de insecto o un sistema de traducción in vitro adecuado. La pluralidad de varias recombinaciones posibles de segmentos de células y T sintéticamente diseñados transfectados en un sistema huésped puede proporcionar, por ejemplo, más de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, o 90 combinaciones de emparejamiento posibles de y δ TCRs. La unión de un agente a uno de los epítomos de la biblioteca descrita previamente puede detectarse poniendo en contacto un anticuerpo marcado, como TS-1, 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, y3.20, R9.12, 7A5, con un epítipo de la biblioteca y detectando una señal del marcado.

Para la cartografía de epítomos también se han desarrollado algoritmos computacionales que han

demostrado cartografiar epítomos conformacionales discontinuos. Los epítomos conformacionales pueden identificarse determinando la conformación espacial de los aminoácidos con métodos que incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Algunos métodos de mapeo de epítomos, como los análisis de rayos X de cristales de complejos antígeno-anticuerpo, pueden proporcionar una resolución atómica del epítomo. En otros casos, pueden emplearse métodos combinatorios computacionales para la cartografía de epítomos con el fin de modelizar un epítomo potencial basado en la secuencia del anticuerpo, como el anticuerpo TS-1 o el anticuerpo TS8.2. En dichos casos, la parte de unión al antígeno del anticuerpo se secuencia y se utilizan modelos informáticos para reconstruir y predecir un sitio de unión potencial del anticuerpo.

En algunos casos la descripción proporciona un método para determinar un epítomo de un receptor de linfocitos T $\gamma\delta$, que comprende: (a) preparar una biblioteca de epítomos del receptor de linfocitos T $\gamma\delta$; (b) poner en contacto la biblioteca de epítomos con el anticuerpo; y (b) identificar la secuencia de aminoácidos de al menos un epítomo en la biblioteca de epítomos que está unido con el anticuerpo. En algunos casos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en los anticuerpos 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, R9.12, 11F2 y 7A5. En una instancia, el anticuerpo está acoplado a un soporte sólido. La biblioteca de epítomos puede comprender secuencias que corresponden a epítomos continuos y discontinuos de un receptor de linfocitos T, tal como un γ TCR o un δ TCR. En algunos casos, la biblioteca de epítomos comprende fragmentos de un receptor de linfocitos T $\gamma\delta$ cuya longitud oscile entre alrededor de 10 aminoácidos y alrededor de 30 aminoácidos, entre alrededor de 10 aminoácidos y alrededor de 20 aminoácidos, o entre alrededor de 5 aminoácidos y alrededor de 12 aminoácidos. En algunos casos, el anticuerpo está marcado y la etiqueta es una molécula radiactiva, una molécula luminiscente, una molécula fluorescente, una enzima o biotina.

Métodos de tratamiento

Las composiciones farmacéuticas que contienen un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente descrito en el presente documento pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se pueden administrar a un sujeto que ya padezca una enfermedad o afección, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad o afección. Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente también puede administrarse para disminuir la probabilidad de desarrollar, contraer o empeorar una afección. Las cantidades eficaces de una población de linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente para uso terapéutico pueden variar dependiendo de la gravedad y la evolución de la enfermedad o afección, terapia previa, el estado de salud del paciente, el peso y/o la respuesta a los fármacos, y/o el criterio del médico tratante.

Un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción puede utilizarse para tratar a un sujeto que necesite tratamiento para una afección. Los ejemplos de afecciones incluyen cáncer, enfermedad infecciosa, trastorno autoinmunitario y sepsis. Los sujetos pueden ser seres humanos, primates no humanos, tales como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja, tales como ganado, caballos, ovejas, cabras, porcinos; animales domésticos, tales como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio, inclusive roedores, tales como ratones, ratas y conejillos de indias, y similares. Un sujeto puede tener cualquier edad. Los sujetos pueden ser, por ejemplo, adultos mayores, adultos, adolescentes, preadolescentes, niños, lactantes, bebés.

Un método de tratamiento de una afección (por ejemplo, una enfermedad) en un sujeto con un linfocito T $\gamma\delta$ puede comprender administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente. Un linfocito T $\gamma\delta$ de la descripción puede administrarse con diversos regímenes (por ejemplo, cronograma, concentración, dosificación, separación entre tratamientos y/o formulación). Un sujeto también puede precondicionarse, por ejemplo, con quimioterapia, radiación o una combinación de ambas, antes de recibir un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la descripción. Como parte de un tratamiento, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede administrarse a un sujeto según un primer régimen y el sujeto puede monitorearse para determinar si el tratamiento con el primer régimen alcanza un nivel dado de eficacia terapéutica. En algunos casos, el linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente y otro linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede administrarse al sujeto según un segundo régimen. La **Figura 2** ilustra esquemáticamente un método para tratar a un sujeto. En una primera operación **201**, se administra al menos un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una afección dada (por ejemplo, cáncer). El linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede administrarse según un primer régimen. En una segunda operación **202**, el sujeto es monitoreado, por ejemplo, por un proveedor de cuidados de la salud (por ejemplo, médico tratante o enfermero). En algunos ejemplos, se monitorea el sujeto para determinar o medir una eficacia del linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente en el tratamiento de la afección del sujeto. En algunas situaciones, el sujeto también puede monitorearse para determinar la expansión *in vivo* de una población de linfocitos T $\gamma\delta$ en el sujeto. A continuación, en una tercera operación **203**, se administra al menos otro linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente al sujeto según un segundo régimen. El segundo régimen puede ser el mismo que el primer régimen o puede ser diferente del primer régimen. En algunas situaciones, la tercera operación **203** no se realiza, por ejemplo, si la administración de

las células T γδ modificadas en la primera operación 201 resulta eficaz (por ejemplo, una única ronda de administración puede ser suficiente para tratar la enfermedad). Debido a sus características alogénicas y de donante universal, una población de células T γδ modificadas puede administrarse a varios sujetos, con diferentes haplotipos CMH. Una célula T γδ modificada puede congelarse o crioconservarse antes de ser administrada a un sujeto.

Una población de células T γδ modificadas también puede congelarse o crioconservarse antes de administrarse a un sujeto. Una población de células T γδ modificadas por ingeniería puede comprender dos o más células que expresen moléculas de reconocimiento tumoral idénticas, diferentes o una combinación de moléculas idénticas y diferentes. Por ejemplo, una población de células T γδ modificadas por ingeniería puede comprender varias células T γδ modificadas por ingeniería distintas que están diseñadas para reconocer antígenos diferentes, o epítomos diferentes del mismo antígeno. Por ejemplo, las células humanas afectadas por un melanoma pueden expresar el oncogén NY-ESO-1. Las células humanas infectadas pueden procesar el oncogén NY-ESO-1. Las células humanas infectadas pueden procesar la oncoproteína NY-ESO-1 en fragmentos más pequeños y presentar diversas porciones de la proteína NY-ESO-1 para el reconocimiento del antígeno. Una población de células T γδ modificadas por ingeniería puede comprender varias células T γδ modificadas por ingeniería que expresan diferentes moléculas de reconocimiento de tumores diseñadas para reconocer diferentes porciones de la proteína NY-ESO-1. La **Figura 3** ilustra esquemáticamente un método para tratar a un sujeto con una población de células T γδ de ingeniería que reconoce diferentes epítomos del antígeno de melanoma NY-ESO-1. En una primera operación **301**, se selecciona una población de células T γδ de ingeniería que reconocen diferentes epítomos del mismo antígeno. Por ejemplo, la población de células T γδ de ingeniería puede comprender dos o más células que expresen restos de reconocimiento de tumores diferentes que reconozcan partes diferentes de la proteína NY-ESO-1. En una segunda operación **302**, la población de linfocitos T γδ modificados genéticamente puede administrarse según un primer régimen. En una segunda operación **303**, el sujeto es monitoreado, por ejemplo, por un proveedor de cuidados de la salud (por ejemplo, médico tratante o enfermero).

Un linfocito T γδ de la descripción puede utilizarse para tratar diversas afecciones. En algunos casos, un linfocito T γδ modificado genéticamente de la descripción puede utilizarse para tratar un cáncer, inclusive tumores sólidos y neoplasias malignas hematológicas. Los ejemplos no taxativos de cánceres incluyen: leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el sida, linfoma relacionado con el sida, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitomas, neuroblastoma, carcinoma de células basales, cáncer del ducto biliar, cáncer de vejiga, cánceres óseos, tumores cerebrales, tal como astrocitoma cerebelar, glioma maligno/astrocitoma cerebral, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma hipotalámico y de la vía óptica, cáncer de mama, adenomas bronquiales, linfoma de Burkitt, carcinoma de origen primario desconocido, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebelar, cáncer del cuello del útero, cánceres infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfomas de linfocitos T cutáneos, tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, tumores de células germinales, cáncer de vesícula, tumor de estroma gastrointestinal, gliomas, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cardíaco, cáncer hepatocelular (del hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, carcinoma de células del islote, sarcoma de Kaposi, cáncer renal, cáncer de laringe, cáncer de labios y la cavidad bucal, liposarcoma, cáncer hepático, cánceres de pulmón, tales como cáncer de pulmón no microcítico y microcítico, linfomas, leucemias, macroglobulinemia, histiocitoma fibroso maligno de huesos/osteosarcoma, meduloblastoma, melanomas, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico con tumor primario oculto, cáncer de la boca, síndrome de neoplasia endócrina múltiple, síndromes mielodisplásicos, leucemia mieloide, cáncer de senos paranasales y la cavidad nasal, carcinoma nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer bucal, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de huesos, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales del ovario, cáncer de páncreas, cáncer de células del islote pancreático, cáncer de los senos paranasales y la cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, astrocitoma pineal, germinoma pineal, adenoma de la pituitaria, blastoma pleuropulmonar, neoplasia de células de plasma, linfoma del sistema nervioso central primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales, carcinoma de células de transición de pelvis renal y de uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcomas, cánceres de la piel, carcinoma cutáneo de células de merkel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago, linfoma de linfocitos T, cáncer de garganta, timoma, carcinoma tímico, cáncer de tiroides, tumor trofoblástico (gestacional), cánceres de sitio primario desconocido, cáncer de uretra, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms.

En algunos casos, un linfocito T γδ modificado genéticamente de la descripción puede utilizarse para tratar una enfermedad infecciosa. Una enfermedad infecciosa puede ser causada, por ejemplo, por una bacteria patógena o por un virus. Una célula enferma puede expresar diversos ácidos nucleicos, lípidos, proteínas patógenas, o fragmentos de estos. Una célula que presente antígenos puede internalizar dichas moléculas patógenas, por ejemplo, mediante fagocitosis o mediante endocitosis mediada por receptores y expresar un

fragmento de un antígeno unido a una molécula de CMH adecuada. Por ejemplo, pueden expresarse diversos fragmentos de 9 mer de una proteína patogénica mediante un APC. Los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente de la descripción pueden diseñarse para reconocer diversos antígenos y fragmentos de antígeno de una bacteria patógena o un virus. Los ejemplos no taxativos de bacterias patógenas pueden encontrarse en:

- a) el género *Bordetella*, tal como la especie *Bordetella pertussis*; b) el género *Borrelia*, tal como *Borrelia burgdorferi*; c) el género *Brucella*, tal como la especie *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis* y/o *Brucella suis*; d) el género *Campylobacter*, tal como la especie *Campylobacter jejuni*; e) los géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila*, tal como la especie *Chlamydia pneumonia*, *Chlamydia trachomatis* y/o *Chlamydophila psittaci*; f) el género *Clostridium*, tal como la especie *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*; g) el género *Corynebacterium*, tal como la especie *Corynebacterium diphtheriae*; h) el género *Enterococcus*, tal como la especie *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*; i) el género *Escherichia*, tal como la especie *Escherichia coli*; j) el género *Francisella*, tal como la especie *Francisella tularensis*; k) el género *Haemophilus*, tal como la especie *Haemophilus influenza*; l) el género *Helicobacter*, tal como la especie *Helicobacter pylori*; m) el género *Legionella*, tal como la especie *Legionella pneumophila*; n) el género *Leptospira*, tal como la especie *Leptospira interrogans*; o) el género *Listeria*, tal como la especie *Listeria monocytogenes*; p) el género *Mycobacterium*, tal como la especie *Mycobacterium leprae*, *mycobacterium tuberculosis* y/o *mycobacterium ulcerans*; q) el género *Mycoplasma*, tal como la especie *Mycoplasma pneumonia*; r) el género *Neisseria*, tal como la especie *Neisseria gonorrhoeae* y/o *Neisseria meningitidis*; s) el género *Pseudomonas*, tal como la especie *Pseudomonas aeruginosa*; t) el género *Rickettsia*, tal como la especie *Rickettsia rickettsii*; u) el género *Salmonella*, tal como la especie *Salmonella typhi* y/o *Salmonella typhimurium*; v) el género *Shigella*, tal como la especie *Shigella sonnei*; w) el género *Staphylococcus*, tal como la especie *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y/o *Staphylococcus saprophyticus*; x) el género *Streptococcus*, tal como la especie *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumonia* y/o *Streptococcus pyogenes*; y) el género *Treponema*, tal como la especie *Treponema pallidum*; z) el género *Vibrio*, tal como la especie *Vibrio cholera*; y/o aa) el género *Yersinia*, tal como la especie *Yersinia pestis* species.

En algunos casos, una célula T $\gamma\delta$ modificada por ingeniería de la divulgación puede utilizarse para tratar una enfermedad infecciosa, una enfermedad infecciosa que puede estar causada por un virus. Ejemplos no limitantes de virus pueden encontrarse en las siguientes familias de virus y se ilustran con especies ejemplares:

- a) la familia *Adenoviridae*, tal como la especie de *Adenovirus*; b) la familia *Herpesviridae*, tal como la especie de *Herpes simple tipo 1*, *Herpes simple tipo 2*, virus de la *Varicela-zóster*, virus *Epstein-barr*, citomegalovirus humano, herpesvirus humano tipo 8; c) la familia *Papillomaviridae*, tal como la especie de *papilomavirus humano*; d) la familia *Polyomaviridae*, tal como la especie de virus BK, virus JC; e) la familia *Poxviridae*, tal como la especie de virus de la viruela; f) la familia *Hepadnaviridae*, tal como la especie del virus de la *Hepatitis B*; g) la familia *Parvoviridae*, tal como la especie de *bocavirus humano*, *Parvovirus B19*; h) la familia *Astroviridae*, tal como la especie de *astrovirus humano*; i) la familia *Caliciviridae*, tal como la especie del virus de *Norwalk*; j) la familia *Flaviviridae*, tal como la especie del virus de la *Hepatitis C (VHC)*, virus de la *fiebre amarilla*, virus del *dengue*, virus del *Nilo Occidental*; k) la familia *Togaviridae*, tal como la especie del virus de la *rubeola*; l) la familia *Hepeviridae*, tal como la especie del virus de la *Hepatitis E*; m) la familia *Retroviridae*, tal como la especie del virus de *inmunodeficiencia humana (VIH)*; n) la familia *Orthomyxoviridae*, tal como la especie del virus de la *Influenza*; o) la familia *Arenaviridae*, tal como la especie del virus *Guanarito*, virus *Junin*, virus de *Lassa*, virus *Machupo* y/o virus *Sabiá*; p) la familia *Bunyaviridae*, tal como la especie del virus de la *fiebre hemorrágica del Congo y Crimea*; q) la familia *Filoviridae*, tal como la especie del virus del *Ebola* y/o del virus de *Marburgo*; *Paramyxoviridae*, tal como la especie de virus del *sarampión*, virus de las *paparas*, virus de la *Parainfluenza*, virus *sincitial respiratorio*, *metapneumovirus humano*, virus *Hendra* y/o virus *Nipah*; r) el género de *Rhabdoviridae*, tal como la especie del virus de la *rabia*; s) la familia *Reoviridae*, tal como la especie de *Rotavirus*, *Orbivirus*, *Coltivirus* y/o *Banna virus*. En algunos ejemplos, un virus no está asignado a una familia viral, tal como la *Hepatitis D*.

En algunos casos, una célula T $\gamma\delta$ modificada de la divulgación puede utilizarse para tratar una enfermedad inmunitaria, como una enfermedad autoinmunitaria. Las enfermedades inflamatorias, incluidas las enfermedades autoinmunes, también son una clase de enfermedades asociadas con trastornos de las células B. Los ejemplos de enfermedades o afecciones inmunitarias, inclusive afecciones autoinmunitarias, que pueden tratarse con un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente descrito en el presente documento incluyen: *artritis reumatoide*, *fiebre reumática*, *esclerosis múltiple*, *encefalomielitis autoinmunitaria experimental*, *psoriasis*, *uveítis*, *diabetes mellitus*, *lupus eritematoso sistémico (LES)*, *lupus nefritis*, *eccema*, *esclerodermia*, *polimiositis/esclerodermia*, *polimiositis/dermatomiositis*, *proctitis ulcerativa*, *inmunodeficiencia combinada grave (IDCG)*, *síndrome de DiGeorge*, *ataxia-telangiectasia*, *alergias estacionales*, *alergias persistentes*, *alergias a los alimentos*, *anafilaxis*, *mastocitosis*, *rinitis alérgica*, *dermatitis atópica*, *Parkinson*, *Alzheimer*, *hiperesplenismo*, *deficiencia de la adhesión de leucocitos*, *enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma X*, *agammaglobulinemia ligada al cromosoma X*, *deficiencia selectiva de inmunoglobulina A*, *síndrome de hiper-IgM*, *VIH*, *síndrome linfoproliferativo autoinmunitario*, *síndrome de Wiskott-Aldrich*, *enfermedad granulomatosa crónica*, *inmunodeficiencia común variable (IDCV)*, *síndrome de hiperinmunoglobulina E*, *tiroiditis de Hashimoto*, *púrpura trombocitopénica idiopática aguda*, *púrpura trombocitopénica idiopática crónica*, *dermatomiositis*, *corea de Sydenham*, *miastenia gravis*, *síndromes*

5 poliglandulares, penfigoide bulloso, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis postestreptocócica, eritema nodoso, eritema multiforme, nefropatía de gA, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, sarcoidosis, colitis ulcerosa, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterante, síndrome de Sjogren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirototoxicosis, hepatitis activa crónica, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegner, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes, polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva, psoriasis, alveolitis fibrosante y cáncer.

10 El tratamiento con una célula T $\gamma\delta$ de la divulgación puede proporcionarse al sujeto antes, durante y después del inicio clínico de la enfermedad. El tratamiento puede proporcionarse al sujeto después de 1 día, 1 semana, 6 meses, 12 meses o 2 años tras el inicio clínico de la enfermedad. El tratamiento puede proporcionarse al sujeto durante más de 1 día, 1 semana, 1 mes, 6 meses, 12 meses, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años o más tras el inicio clínico de la enfermedad. El tratamiento puede administrarse al sujeto durante menos de 1 día, 1 semana, 1 mes, 6 meses, 12 meses o 2 años tras el inicio clínico de la enfermedad. El tratamiento también puede incluir el tratamiento de un humano en un ensayo clínico. Un tratamiento puede comprender la administración a un sujeto de una composición farmacéutica que comprende una célula T $\gamma\delta$ modificada por ingeniería de la divulgación.

20 En algunos casos, la administración de una célula T $\gamma\delta$ modificada de la divulgación a un sujeto modula la actividad de los linfocitos endógenos en el organismo del sujeto. En algunos casos, la administración de la(s) célula(s) T $\gamma\delta$ modificada(s) a un sujeto proporciona un antígeno a una célula T endógena y puede potenciar una respuesta inmunitaria. En algunos casos, la célula T de memoria es una célula T CD4⁺. En algunos casos, la célula T de memoria es una célula T CD8⁺. En algunos casos, la administración de la(s) célula(s) T $\gamma\delta$ modificada(s) a un sujeto activa la citotoxicidad de otra célula inmunitaria. En algunos casos, la otra célula inmunitaria es una célula T CD8⁺. En algunos casos, la otra célula inmunitaria es una célula T asesina natural. En algunos casos, la administración de la(s) célula(s) T $\gamma\delta$ modificada(s) a un sujeto suprime una célula T reguladora. En algunos casos, la célula T reguladora es una célula Treg Fox3⁺. En algunos casos, la célula T reguladora es una célula Treg Fox3⁻. Ejemplos no limitantes de células cuya actividad puede ser modulada por una célula T $\gamma\delta$ modificada de la divulgación incluyen: células madre hematopoyéticas; células B; CD4; CD8; glóbulos rojos; glóbulos blancos; células dendríticas, incluidas las células dendríticas presentadoras de antígeno; leucocitos; macrófagos; células B con memoria; células T con memoria; monocitos; células asesinas naturales; granulocitos neutrófilos; células T colaboradoras; y células T asesinas.

35 Durante la mayoría de los trasplantes de médula ósea, se emplea una combinación de ciclofosfamida con irradiación total del cuerpo para prevenir el rechazo de las células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) en el trasplante por el sistema inmunitario del sujeto. En algunos casos, se realiza la incubación de médula ósea del donante con interleucina-2 (IL-2) *ex vivo* para potenciar la generación de linfocitos citolíticos en la médula del donante. La interleucina-2 (IL-2) es una citocina que es necesaria para el crecimiento, proliferación y diferenciación de linfocitos de tipo salvaje. Los estudios actuales de transferencia adoptiva de linfocitos T $\gamma\delta$ en seres humanos pueden requerir la coadministración de linfocitos T $\gamma\delta$ e interleucina-2. Sin embargo, tanto las dosificaciones altas como bajas de IL-2 pueden tener efectos secundarios altamente tóxicos. La toxicidad por IL-2 puede manifestarse en múltiples órganos/sistemas, de manera más significativa en el corazón, pulmones, riñones y sistema nervioso central. En algunos casos, la descripción proporciona un método para administrarle un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente a un sujeto sin la coadministración de una citocina, tal como IL-2, IL-15, IL-12, IL-21. En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede administrarse a un sujeto sin la coadministración de IL-2. En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente se administra a un sujeto durante un procedimiento, tal como un trasplante de médula ósea, sin la coadministración de IL-2.

50 Métodos de administración

Puede administrarse uno o múltiples linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente a un sujeto en cualquier orden o de forma simultánea. Si se administran de forma simultánea, los múltiples linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente pueden proporcionarse en una forma unitaria y unificada, tal como una inyección intravenosa, 55 o en formas múltiples, por ejemplo, como múltiples infusiones intravenosas, s.c., inyecciones o píldoras. Los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente pueden empacarse juntos o por separado, en un único paquete o en múltiples paquetes. Uno o todos los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente pueden proporcionarse en múltiples dosis. Si no se administran de forma simultánea, el tiempo entre las múltiples dosis puede variar tanto como alrededor de una semana, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis 60 meses o alrededor de un año. En algunos casos, un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente puede expandirse dentro del cuerpo de un sujeto *in vivo*, después de la administración a un sujeto. Los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente pueden congelarse para múltiples tratamientos con la misma preparación celular. Los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente de la descripción y las composiciones farmacéuticas que los comprenden pueden empacarse como un kit. Un kit puede incluir instrucciones (por ejemplo, 65 instrucciones escritas) acerca del uso de los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente y las composiciones que lo comprenden.

En algunos casos, un método de tratamiento de un cáncer comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito T γδ modificado genéticamente, donde la administración trata el cáncer. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de linfocitos T γδ modificados genéticamente se administra durante al menos alrededor de 10 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o 1 año. En algunos casos, la cantidad terapéuticamente eficaz de linfocitos T γδ modificados genéticamente se administra durante al menos una semana. En algunos casos, la cantidad terapéuticamente eficaz de los linfocitos T γδ modificados genéticamente se administra durante al menos dos semanas.

Un linfocito T γδ modificado genéticamente descrito en el presente documento puede administrarse antes, durante o después de la aparición de una enfermedad o afección, y el tiempo de administración de una composición farmacéutica que contiene un linfocito T γδ modificado genéticamente puede variar. Por ejemplo, el linfocito T γδ modificado genéticamente puede utilizarse como un profiláctico y puede administrarse de forma continua a sujetos con propensión a afecciones o enfermedades para disminuir la probabilidad de la aparición de la enfermedad o afección. Los linfocitos T γδ modificados genéticamente pueden administrarse durante la aparición de los síntomas, o tan pronto como sea posible después de esta. La administración de los linfocitos T γδ modificados genéticamente se puede iniciar inmediatamente después de la aparición de los síntomas, dentro de las primeras 3 horas después de la aparición de los síntomas, dentro de las primeras 6 horas después de la aparición de los síntomas, dentro de las primeras 24 horas después de la aparición de los síntomas, dentro de las 48 horas después de la aparición de los síntomas, o dentro de cualquier período de tiempo desde la aparición de los síntomas. La administración inicial puede ser a través de cualquier vía práctica, tal como mediante cualquier vía descrita en el presente documento mediante el uso de cualquier formulación descrita en el presente documento. En algunos ejemplos, la administración de un linfocito T γδ modificado genéticamente de la descripción se realiza a través de una administración intravenosa. Pueden administrarse una o múltiples dosificaciones de un linfocito T γδ modificado genéticamente tan pronto como sea posible después de la aparición de un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inmunitaria, sepsis o con un trasplante de médula ósea, y durante un período de tiempo necesario para el tratamiento de la enfermedad inmunitaria, tal como, por ejemplo, entre alrededor de 24 horas y alrededor de 48 horas, entre alrededor de 48 horas y alrededor de 1 semana, entre alrededor de 1 semana y alrededor de 2 semanas, entre alrededor de 2 semanas y alrededor de 1 mes, entre alrededor de 1 mes y alrededor de 3 meses. Para el tratamiento del cáncer, puede administrarse una o múltiples dosificaciones de un linfocito T γδ modificado genéticamente después de la aparición del cáncer y antes o después de otro tratamiento. En algunos ejemplos, un linfocito T γδ modificado genéticamente puede administrarse durante al menos alrededor de 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas, al menos 96 horas, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 1 año, al menos 2 años al menos 3 años, al menos 4 años o al menos 5 años. La duración del tratamiento puede variar para cada sujeto.

Dosificaciones

Un linfocito T γδ modificado genéticamente descrito en el presente documento puede formularse en formas de dosificación unitarias adecuadas para una administración única de dosificaciones precisas. En algunos casos, las formas de dosificación unitaria comprenden linfocitos adicionales. En la forma de dosificación unitaria, la formulación se divide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas de uno o más compuestos. La dosificación unitaria puede encontrarse en forma de un envase que contenga cantidades separadas de la formulación. Los ejemplos no taxativos son comprimidos o cápsulas empacadas, y polvos en viales o ampollas. Las composiciones en suspensión acuosa pueden empacarse en recipientes con dosis únicas que no se puedan volver a cerrar. Pueden utilizarse recipientes de múltiples dosis que se puedan volver a cerrar, por ejemplo, en combinación con un conservante o sin un conservante. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica no comprende un conservante. Las formulaciones para inyección parenteral se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en recipientes de múltiples dosis con un conservante.

Un linfocito T γδ modificado genéticamente descrito en el presente documento puede estar presente en una cantidad de al menos 5 células, al menos 10 células, al menos 20 células, al menos 30 células, al menos 40 células, al menos 50 células, al menos 60 células, al menos 70 células, al menos 80 células, al menos 90 células, al menos 100 células, al menos 200 células, al menos 300 células, al menos 400 células, al menos 500 células, al menos 600 células, al menos 700 células, al menos 800 células, al menos 900 células, al menos 1×10^3 células, al menos 2×10^3 células, al menos 3×10^3 células, al menos 4×10^3 células, al menos 5×10^3 células, al menos 6×10^3 células, al menos 7×10^3 células, al menos 8×10^3 células, al menos 9×10^3 células, al menos 1×10^4 células, al menos 2×10^4 células, al menos 3×10^4 células, al menos 4×10^4

- | | | | | |
|----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | células, al menos 5×10^4 | células, al menos 6×10^4 | células, al menos 7×10^4 | células, al menos 8×10^4 |
| | células, al menos 9×10^4 | células, al menos 1×10^5 | células, al menos 2×10^5 | células, al menos 3×10^5 |
| | células, al menos 4×10^5 | células, al menos 5×10^5 | células, al menos 6×10^5 | células, al menos 7×10^5 |
| | células, al menos 8×10^5 | células, al menos 9×10^5 | células, al menos 1×10^6 | células, al menos 2×10^6 |
| 5 | células, al menos 3×10^6 | células, al menos 4×10^6 | células, al menos 5×10^6 | células, al menos 6×10^6 |
| | células, al menos 7×10^6 | células, al menos 8×10^6 | células, al menos 9×10^6 | células, al menos 1×10^7 |
| | células, al menos 2×10^7 | células, al menos 3×10^7 | células, al menos 4×10^7 | células, al menos 5×10^7 |
| | células, al menos 6×10^7 | células, al menos 7×10^7 | células, al menos 8×10^7 | células, al menos 9×10^7 |
| | células, al menos 1×10^8 | células, al menos 2×10^8 | células, al menos 3×10^8 | células, al menos 4×10^8 |
| 10 | células, al menos 5×10^8 | células, al menos 6×10^8 | células, al menos 7×10^8 | células, al menos 8×10^8 |
| | células, al menos 9×10^8 | células, al menos 1×10^9 | células, o más. | |

- [illegible]

- En algunos casos, la dosis terapéuticamente eficaz de un linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente de la divulgación puede ser de entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 1 célula y alrededor de 2×10^3 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 3×10^3 células, entre alrededor de 1×10^3 células y
55 alrededor de 4×10^3 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 5×10^3 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 6×10^3 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 7×10^3 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 8×10^3 células, entre alrededor de 1×10^3 células y
alrededor de 9×10^3 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 1×10^4 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 2×10^4 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 3×10^4
60 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 4×10^4 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 5×10^4 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 6×10^4 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 7×10^4 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 8×10^4 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 9×10^4 células, entre alrededor de 1×10^3 células y
alrededor de 1×10^5 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 2×10^5 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 3×10^5 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 4×10^5
65 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 5×10^5 células, entre alrededor de 1×10^3 células y

alrededor de 6×10^5 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 7×10^5 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 8×10^5 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 9×10^5 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 1×10^6 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 2×10^6 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 3×10^6 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 4×10^6 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 5×10^6 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 6×10^6 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 7×10^6 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 8×10^6 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 9×10^6 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 1×10^7 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 2×10^7 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 3×10^7 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 4×10^7 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 5×10^7 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 6×10^7 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 7×10^7 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 8×10^7 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 9×10^7 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 1×10^8 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 2×10^8 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 3×10^8 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 4×10^8 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 5×10^8 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 6×10^8 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 7×10^8 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 8×10^8 células, entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 9×10^8 células, o entre alrededor de 1×10^3 células y alrededor de 1×10^9 células.

Conservación

En algunas realizaciones, los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden formularse en un medio de congelamiento y se pueden colocar en unidades de almacenamiento criogénico, tales como refrigeradores de nitrógeno líquido (-195°C) o congeladores de temperaturas ultra bajas (-65°C , -80°C o -120°C) para almacenamiento a largo plazo de al menos alrededor de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 3 años o al menos 5 años. El medio de congelamiento puede contener dimetilsulfóxido (DMSO), y/o cloruro de sodio (NaCl), y/o dextrosa, y/o sulfato de dextrano y/o hidroxietil almidón (HES) con agentes fisiológicos amortiguadores de pH para mantener el pH entre alrededor de 6,0 y alrededor de 6,5, entre alrededor de 6,5 y alrededor de 7,0, entre alrededor de 7,0 y alrededor de 7,5, entre alrededor de 7,5 y alrededor de 8,0, o entre alrededor de 6,5 y alrededor de 7,5. Los linfocitos T $\gamma\delta$ criopreservados pueden descongelarse y procesarse adicionalmente mediante estimulación con anticuerpos, proteínas, péptidos y/o citocinas, tal como se describe en el presente documento. Los linfocitos T $\gamma\delta$ criopreservados pueden descongelarse y modificarse genéticamente con vectores virales (inclusive vectores retrovirales y lentivirales) o por medios no virales (inclusive ARN, ADN y proteínas), tal como se describe en el presente documento. Los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados pueden criopreservarse adicionalmente para generar bancos genéticos en cantidades de al menos alrededor de 1, 5, 10, 100, 150, 200, 500 viales con al menos alrededor de 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o al menos alrededor de 10^{10} células por mL en medio de congelamiento. Los bancos de células criopreservadas pueden conservar su funcionalidad y pueden descongelarse y estimularse y expandirse adicionalmente. En algunos aspectos, las células descongeladas pueden estimularse y expandirse en recipientes adecuados cerrados, tales como biorreactores y/o bolsas de cultivo celular para generar cantidades de células como producto celular alogénico. Los linfocitos T $\gamma\delta$ criopreservados pueden conservar sus funciones biológicas durante al menos alrededor de 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 13 meses, 15 meses, 18 meses, 20 meses, 24 meses, 30 meses, 36 meses, 40 meses, 50 meses, o al menos alrededor de 60 meses en condiciones de almacenamiento criogénico. En algunos aspectos, no se utilizan conservantes en la formulación. Los linfocitos T $\gamma\delta$ criopreservados pueden descongelarse e infundirse en múltiples pacientes como producto celular alogénico listo para su uso.

En el presente documento invención puede comprenderse mejor haciendo referencia a los ejemplos que siguen a continuación, los cuales no se pretende que limiten el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1. Aislamiento de células primarias

Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) primarias humanas de donantes sanos mediante el uso de una máquina de aféresis. Las PBMC se purificaron con el sistema Ficoll- Paque™ PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) o sistemas similares. Las células entonces se resuspendieron en un medio de cultivo adecuado.

De manera alternativa, se recogieron células humanas primarias de sangre periférica, sangre del cordón umbilical, médula ósea, tejidos sanos o tejidos afectados con una enfermedad, tales como tejidos cancerosos.

Ejemplo 2. Tejido de donantes sanos

Se recibieron tejidos frescos de donantes sanos de la Cooperative Human Tissue Network (CHTN) y se transportaron al laboratorio en medio RPMI-1640. Los tejidos se cortaron en fragmentos de 1-3 mm³ con un escalpelo. 2-5 fragmentos/pocillo se colocaron en una placa de 24 pocillos (Costar) en 2 mL de RPMI-1640 complementado con GlutaMAX, HEPES 25 mM con pH 7.2, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina y suero AB humano al 10 % y 100 IU/mL de rhIL-2 o se digieren como se describe a continuación. Las placas se incubaron en una incubadora humidificada a 37 °C, con CO₂ al 5 % en aire. Los cultivos se inspeccionaron cada día por medio para monitorear la proliferación de linfocitos. La mitad del medio se reemplazó en todos los pocillos cada 7 días después del inicio del cultivo. Se recogieron los linfocitos cuando una capa densa de linfocitos cubría los alrededores de los fragmentos o la población de linfocitos derivada de tejidos digeridos alcanzó la concentración adecuada, tal como se describirá más adelante.

Ejemplo 3. Digestión enzimática de tejidos

Se recibieron muestras frescas de tejido de donantes sanos de la Cooperative Human Tissue Network (CHTN) y se transportaron al laboratorio en medio RPMI-1640. Se aislaron los linfocitos mediante digestión enzimática mediante el uso de dos mezclas de enzimas Liberase™ DL Research Grade (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) o Liberase™ TM Research Grade (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO). Los tejidos se cortaron en fragmentos de 2-3 mm³ y se digirieron durante 1 hora a 37 °C y CO₂ al 5 %. La suspensión celular digerida se pasó a través de un filtro de 40 micrones, se centrifugó y se lavó con medio RPMI-1640. Las células se contabilizaron y se resuspendieron en medio RPMI (GIBCO BRL), se complementaron con suero AB humano al 10 % (Corning) y 100 IU/mL de rhIL-2. La población celular recogida se colocó en placas de cultivo de 24 pocillos en una cantidad de 0,5 a 1 X 10⁶ células/mL. Las células se dividieron en medio que contenía RPMI e IL2 cuando la concentración celular excedía 1,5 X 10⁶ células/mL.

Ejemplo 4. Cultivo de muestras de tumores

Se recibieron muestras frescas de tumores de pacientes con cánceres primarios y metastásicos, inclusive de colon, mama, ovario, riñón, cabeza y cuello, cavidad bucal, páncreas e hígado de la Cooperative Human Tissue Network (CHTN) y se transportaron al laboratorio en medio RPMI. Las muestras de tumores se cortaron en fragmentos de 1-3 mm³ con un escalpelo. 2-5 fragmentos/pocillo se colocaron en una placa de 24 pocillos (Costar) en 2 mL de RPMI-1640 complementado con GlutaMAX, HEPES 25 mM con pH 7.2, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina y suero AB humano al 10 % y 100 IU/mL de rhIL-2. Las placas se incubaron en una incubadora humidificada a 37 °C, con CO₂ al 5 % en aire. Los cultivos se inspeccionaron cada día por medio para monitorear la proliferación de linfocitos. La mitad del medio se reemplazó en todos los pocillos cada 7 días después del inicio del cultivo. Se recogieron los linfocitos cuando una capa densa de linfocitos cubría los alrededores de los fragmentos.

Ejemplo 5. Digestión enzimática de muestras frescas de tumores

Se recibieron muestras frescas de tumores de pacientes con cánceres primarios y metastásicos, inclusive de colon, mama, ovario, riñón, cabeza y cuello, cavidad bucal, páncreas e hígado de la Cooperative Human Tissue Network (CHTN) y se transportaron al laboratorio en medio RPMI. Se aislaron los linfocitos mediante digestión enzimática mediante el uso de dos mezclas de enzimas Liberase™ DL Research Grade (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) o Liberase™ TM Research Grade (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO). Los tejidos se cortaron en fragmentos de 2-3 mm³ y se digirieron durante 1 hora a 37 °C y CO₂ al 5 % en aire. La suspensión celular digerida se pasó a través de un filtro de 40 micrones, se centrifugó y se lavó con medio RPMI-1640. Las células se contabilizaron y se resuspendieron en medio RPMI (GIBCO BRL), se complementaron con suero AB humano al 10 % (Corning) y 100 IU/mL de rhIL-2. La población celular recogida se colocó en placas de cultivo de 24 pocillos en una cantidad de 0,5 a 1 X 10⁶ células/mL. Las células se dividieron en medio que contenía RPMI e IL2 cuando la concentración celular excedía 1,5 X 10⁶ células/mL.

Ejemplo 6. Cultivo de células primarias en ejemplo de medio complementado con suero

Se generaron poblaciones de PBMC mediante separación a partir de capas leucocitarias derivadas de donantes sanos, mediante el uso de Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences PA, EUA). Se cultivaron las PBMC a 1 X 10⁶ células/mL en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos en RPMI-1640 (Corning CellGro) complementado con suero fetal bovino al 10 % (Gibco), 2 mmol/L de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina y 100 rhIL-2/mL.

Se pueden utilizar condiciones de cultivo similares para cultivar células humanas primarias recogidas de sangre periférica, sangre del cordón umbilical, médula ósea, tejidos sanos o tejidos afectados con una enfermedad, tales como los tejidos cancerosos descritos anteriormente.

Ejemplo 7. Cultivo de células primarias en ejemplo de medio libre de suero

Se generaron poblaciones de PBMC mediante separación a partir de capas leucocitarias derivadas de donantes sanos, mediante el uso de Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences PA, EUA). Se cultivaron las PBMC a 1×10^6 células/mL en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos en medio libre de suero CTS con complemento CTS-OpTmizer.

Se pueden utilizar condiciones de cultivo similares para cultivar células humanas primarias recogidas de sangre periférica, sangre del cordón umbilical, médula ósea, tejidos sanos o tejidos afectados con una enfermedad, tales como los tejidos cancerosos descritos anteriormente.

10 Ejemplo 8: Eliminación de macrófagos y monocitos adherentes

Se recogieron PMBC con métodos de aféresis, tal como se describió anteriormente, y se retiraron los eritrocitos mediante tratamiento hipotónico o separación por densidad mediante el uso de centrifugación con gradiente de Ficoll. Las PBMC libres de eritrocitos se incubaron en recipientes de cultivo de tejido a gran escala, tal como una pila de 10 placas o de 40 placas de Cell Factory (Nunc), botellas de cultivo (Nunc). Las poblaciones adherentes, que comprenden macrófagos y monocitos, permanecen típicamente unidas a la superficie de los recipientes de cultivo celular. La población celular cultivada en población de suspensión se enriqueció con linfocitos T $\gamma\delta$. Se incubaron aproximadamente 10^8 , 10^9 o 10^{10} PBMC con microperlas que contienen hierro cubiertas con CD4 y CD8 (por ejemplo, microperlas Miltenyi Biotec). Los flujos de población celular incubada se pasaron por un campo magnético donde se retuvieron los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$. La población celular "pasada" se encontraba enriquecida con linfocitos T $\gamma\delta$.

25 Ejemplo 9: Eliminación de macrófagos y monocitos

Se recogieron PMBC con métodos de aféresis, tal como se describió anteriormente, y se retiraron los eritrocitos mediante tratamiento hipotónico o separación por densidad mediante el uso de centrifugación con gradiente de Ficoll. Las PBMC libres de eritrocitos se incubaron en recipientes de cultivo de tejido a gran escala, tal como una pila de 10 placas o de 40 placas de Cell Factory (Nunc), botellas de cultivo (Nunc). Se retiraron los monocitos y macrófagos mediante el flujo de las PBMC sin eritrocitos sobre una columna de lana de vidrio compactada. La población celular "pasada" se enriqueció con linfocitos T $\gamma\delta$ para su procesamiento adicional.

35 Ejemplo 10: Enriquecimiento de células T $\gamma\delta$

Las PBMC se recogen con métodos de aféresis como se ha descrito previamente y los glóbulos rojos se eliminan mediante tratamiento hipotónico o separación por densidad utilizando centrifugación en gradiente de Ficoll. Las PBMC libres de glóbulos rojos se incuban en recipientes de cultivo de tejidos a gran escala, como Cell Factory (Nunc) de 10 o 40 pilas, botellas de rodillo (Nunc). Los monocitos y macrófagos se eliminan con los métodos descritos en el Ejemplo 8 o en el Ejemplo 9. Se incuban aproximadamente 10^8 , 10^9 o 10^{10} PBMC con microesferas que contienen hierro recubiertas de CD4 y CD8 (por ejemplo, Miltenyi Biotec Microbeads). La población celular incubada pasa a través de un campo magnético en el que se retienen las células T $CD4^+$ y $CD8^+$. La población celular "de paso" se enriquece en células T $\gamma\delta$. Las células no deseadas, como NK, células T $\gamma\delta$, células B, monocitos y macrófagos se eliminan mediante separación con perlas inmunomagnéticas (por ejemplo, sistema Miltenyi Biotec AutoMACS) utilizando un cóctel de anticuerpos dirigidos contra los tipos celulares no deseados.

Alternativamente, los tipos celulares no deseados se eliminan utilizando un complejo tetramérico de anticuerpos o anticuerpos biespecíficos dirigidos contra los receptores de superficie de las células NK, ab T, B, monocitos y macrófagos.

50 Ejemplo 11: Aislamiento de células T $\gamma\delta$ a partir de células primarias con anticuerpos

En un ejemplo, se aislaron células T $\gamma\delta$ naturales a partir de cultivos primarios con clasificación por citometría de flujo basándose en la expresión positiva (es decir, $\gamma\delta$ TCR) o negativa (es decir, $\alpha\beta$ TCR, CD4, CD8, CD56) de marcadores de la superficie celular.

Ejemplo 12: Aislamiento de células T $\gamma\delta$ a partir de tumores primarios

Se obtuvieron muestras de tumor recién extraídas de NCI Cooperative Human Tissue Network (CHTN). Se envió metástasis al hígado de adenocarcinoma de colon (TIL 1) y tumor renal (TIL 2) en medio RPMI-1640. Los tejidos tumorales se cortaron en partes pequeñas de 2 mm^3 mediante el uso de una hoja plana, seguido por digestión con 2 mL de cóctel de enzimas Liberase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en RPMI y 3000 unidades de DNasa, tal como se describe. Después de la digestión, se filtraron los tumores a través de una malla de nylon de 40 micrones de gasa estéril y se lavaron dos veces con RPMI-1640. Las células se contabilizaron y colocaron en una placa de 24 pocillos a 1×10^6 /mL en RPMI-1640 que contenía suero AB

humano al 10 % complementado con L-glutamina, y 100 U/mL de rhIL-2. Se recogieron los linfocitos de infiltración de tumores después de 6 días en cultivo. La presencia de linfocitos T $\gamma\delta$ se analizó mediante citometría de flujo contra $\delta 1$ TCR (contra V $\delta 1$ TS8.2 conjugado con FITC (Thermo Fisher) y contra V $\delta 2$ B6 (Biolegend). Los datos se analizaron con el software FlowJo.

La **Figura 4** representa un gráfico que ilustra el crecimiento de linfocitos $\gamma\delta 1$ y $\gamma\delta 2$ aislados de metástasis de adenocarcinoma de colon en tumores hepáticos (TIL 1) y renales (TIL 2). Se ha demostrado que estos linfocitos expresan CCR4 y CCR7. Como se ilustra en la **Figura 4**, el subconjunto V $\delta 1$ fue la población predominante aislada de ambos tipos de tumores.

Ejemplo 13. Estimulación y expansión de células T $\gamma\delta$

Se estimularon y expandieron los células T $\gamma\delta$ en medio libre de suero, tal como Ex-Vivo 10, Ex-Vivo 15, Ex-Vivo 20, medio AIMV, Optimizer CTS, que contiene citocinas (IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, IL-12, IL-21, IL-23 o IL-33), factores de crecimiento (factores de crecimiento de insulina y transferrina, similares a insulina), albúmina, lípidos (colesterol, soluciones lipídicas, precursores de lípidos), vitaminas, cobre, hierro, selenio, hidrolizado de proteína, aminoácidos esenciales, aminoácidos no esenciales y protector contra el cizallamiento (Pluronic F-68).

El medio libre de suero descrito en estos ejemplos puede complementarse con aditivos para sustentar un crecimiento de linfocitos T $\gamma\delta$ de densidad celular elevada entre 10^5 y 2×10^7 células/mL en cultivo de suspensión (por ejemplo, biorreactor WAVE) a la vez que se mantiene la funcionalidad biológica de los linfocitos T $\gamma\delta$.

Ejemplo 14. Aditivos que proporcionan un crecimiento potente de células T $\gamma\delta$ en medio libre de suero

Los aditivos adicionales que proporcionaron un crecimiento potente de los células T $\gamma\delta$ incluyen cloruro de calcio, anhídrido, nitrato de calcio, sulfato cúprico, pentahidrato, citrato férrico, nitrato férrico, sulfato ferroso, sulfato de cinc y/o putrescina.

Los metales traza se suministraron en los medios libres de suero para proporcionar un bajo nivel de componentes elementales que sustituyeran al suero, incluyendo Paramolibdato de Amonio, Vanadio, Manganeso, Níquel, Selenito de Sodio, Metasilicato de Sodio, Nonahidrato, Cloruro Estanoso, Cloruro de Aluminio, Acetato de Bario, Cloruro de Cadmio, Cloruro Crómico, Cobalto, Dióxido de Germanio, Bromuro de Potasio, Yoduro de Potasio, Cloruro de Rubidio, Nitrato de Plata, Fluoruro de Sodio, y/o Cloruro de Circonilo.

Otros componentes añadidos a los medios de cultivo celular que favorecen el crecimiento robusto de células T $\gamma\delta$ son Adenosina, Guanosina, Citidina, Uridina, Betaína, Taurina, Ácido folínico, Etanolamina, Ácido linoleico, Ácido oleico Hidrocortisona, piruvato, hidrolizados de plantas, hidrolizados de levadura, y/o beta-mercaptopetanol.

Las vitaminas añadidas para promover el crecimiento robusto de células $\gamma\delta$ T incluyen: Biotina (B7), D-pantotenato cálcico (B5), cloruro de colina, cianocobalamina (B12), ácido fólico (B9), i-inositol (mio-inositol), niacinamida (B3), piridoxal, monohidrocloruro, piridoxina, monohidrocloruro (B6), riboflavina (B2), tiamina y/o monohidrocloruro (B1).

Ejemplo 15: Caracterización de células T $\gamma\delta$ expandidas: Inmunofenotipo

Las poblaciones de células T expandidas se caracterizaron mediante tinción con FACS para verificar los marcadores de la superficie celular que distinguen entre las diferentes poblaciones. Las células se lavaron una vez con solución salina amortiguada con HEPES (HBSS) que contenía suero fetal bovino al 2 %, se incubaron con cantidades adecuadas de MAb a 4 °C durante 30 minutos y se volvieron a lavar en HBSS. A grandes rasgos, 1×10^6 células se tiñeron en un volumen de 100 μ l de medio de tinción con FACS (FSM; HBSS que contenía suero fetal bovino al 2 %) que contenía MAb conjugados con fluoroisotiocianato (FITC) o ficoeritrina (PE) dirigidos contra CD2, CD3 (BioLegend, clon OKT3), CD4 (BioLegend clon OKT4), CD7, CD8 (BioLegend, clon RPAT8), CD11a, CD16, CD18, CD19, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD56, CD57, CD69, CD71, CD95, CD107, ICAM-1, MICA/B, NKG2D DR5, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 CCR6, CCR7, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR5, CXCR6, CXCR7, IL-2R, IL-7R, Ki67, L-selectina, VLA-4, JAML, PD1, PDL1, CTLA-4, Ox40, TCR V $\delta 1$ (ThermoFisher Scientific, clon TS8.2) o TCR V $\delta 2$ (BioLegend, clon B6).

Además de los marcadores de la superficie celular, la secreción de citocina, citocinas intracelulares y/o citocinas asociadas con la membrana se caracterizaron, inclusive TNF- α IFN- γ , GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-17 o IL-21.

Se determinaron las células vivas mediante la ausencia o incorporación baja del tinte de amida zombie violet

(BioLegend). Se utilizaron controles de Fluorescencia Menos Uno (FMO, por sus siglas en inglés) para definir límites de regulación positivos y negativos de la expresión en la superficie de cada antígeno. Las células teñidas se recogieron en un citómetro Sony SH800 y se analizaron los datos mediante el uso de FlowJo v10. 1. Los datos de citometría de flujo se visualizan como gráficos de puntos.

5

Ejemplo 16. Expansión de células T $\delta 2$ en medio que contiene suero y libre de suero

Se evaluó el crecimiento y tasa de expansión de diferentes células T $\delta 2$ en medio que contenía suero (R2:RPMI + FBS al 10 %) y medio libre de suero (AIMV + albúmina bovina; complemento libre de suero CTS). La **Figura 5** representa una gráfica que ilustra el crecimiento de linfocitos T $\delta 2$. Todo el medio utilizado en el experimento actual contenía 100 IU/mL de IL-2, glutamina 2 mM y 1x penicilina/estreptomicina. Además, las células se estimularon con ácido zoledrónico a 1, 5 y 20 μ M en el día 0. El medio se repuso cada 2-3 días sin adición de más ácido zoledrónico. La cantidad total de linfocitos T $\delta 2$ expandidos a partir de 10^6 PBMC y la proporción de expansión de cada tratamiento después de un período de tiempo de 13 días se muestra en la **Figura 5**.

15

Ejemplo 17. Ensayos de competencia y bloqueo de anticuerpo contra $\gamma\delta$ TCR

La **Figura 6** y la **Figura 7** representan gráficas que ilustran experimentos de bloqueo del anticuerpo contra $\gamma\delta$ TCR y la **Figura 8** y la **Figura 9** representan ensayos de competencia de anticuerpos. La **Figura 6** y la **Figura 7** ilustra los resultados de los experimentos de bloqueo donde se preincubaron las PBMC con diversos anticuerpos, a saber, 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B3, B6, TS-1, y3.20, IMMU510 o 11F2. Las células se lavaron y tiñeron posteriormente con los anticuerpos secundarios TS8.2-FITC (específico de $\delta 1$) o B6-PE (específico de $\delta 2$). Se analizaron las muestras de PBMC mediante citometría de flujo. La reducción en la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI, por sus siglas en inglés) se utilizó para evaluar el grado de bloqueo. Se ilustra el nivel de inhibición contra TS8.2-FITC (**Figura 6**) y contra B6- PE (**Figura 7**).

20

25

Se llevaron a cabo estudios de competencia entre MAb TS-1 y TS8.2, y los anticuerpos 5A6.E9, B1, IMMU510, R9.12-2 o 11F2 para verificar la unión a la línea celular BE13 que expresa $\gamma\delta 1$ TCR mediante la incubación de 1×10^5 células con 1, 2 o 10 μ g de anticuerpos de competencia sin marcar (IgG1, 5A6.E9, B1, TS8.2, TS-1, R9.12, IMMU510 u 11F2) y 0.2 μ g de anti- $\gamma\delta 1$ TCR conjugado con FITC clon TS8.2 (**Figura 8**) o anti- $\gamma\delta 1$ TCR clon TS-1 (**Figura 9**) de forma simultánea en hielo durante 30 minutos. Se calculó el porcentaje (%) de competencia mediante el cambio en la fluorescencia media geométrica dividido entre el cambio máximo en la fluorescencia media geométrica. Tal como se ilustró en la **Figura 9**, el anticuerpo TS-1 compitió con la unión a células de TS8.2 de una manera tan eficaz como el anticuerpo TS8.2 en sí. Ninguno de los otros anticuerpos pudo competir con la unión de TS8.2. El anticuerpo TS8.2 compitió con la unión de la TS-1 a las células, pero no tan eficazmente como la propia TS-1. También se observó cierto nivel de competencia con la unión de la TS-1 con el anticuerpo 11F2. Estos resultados indican que los anticuerpos TS-1 y TS8.2 se unen a $\gamma\delta 1$ pero probablemente no al mismo epítipo.

30

35

40

Ejemplo 18. Digestión enzimática de muestras de tumor y expansión de células T $\gamma\delta$ con anticuerpos de epítomos de $\gamma\delta$ específicos

Se recubrieron placas de 24 pocillos con 0,5-1 μ g de anticuerpos contra $\gamma\delta$ TCR. Las células aisladas de tejidos tumorales digeridos tal como se describe en el ejemplo 10 se contabilizaron y se colocaron en placas recubiertas con anticuerpo a 0,5-1 $\times 10^6$ célula/mL en un medio RPMI 1640 complementado con suero AB humano al 10 % y rhIL-2 (100 IU/mL). Los cultivos se incubaron a 37° C, con CO₂ al 5 % durante 74-21 días.

45

Ejemplo 19. Digestión enzimática de muestras de tumor y expansión de células T $\gamma\delta$ con anticuerpos de epítomos de $\gamma\delta$ específicos

Las células aisladas de tejidos tumorales digeridos tal como se describe en el ejemplo 5 se contabilizaron y se colocaron en placas recubiertas con anticuerpo de una placa de cultivo celular 3D (placas de múltiples pocillos de acoplamiento ultra-bajo Corning® Costar®) a 0,5-1 $\times 10^6$ célula/mL en medio RPMI 1640 complementado con suero AB humano al 10 % y rhIL-2 (100 IU/mL). Los cultivos se incubaron a 37° C, con CO₂ al 5 % durante 74-21 días.

55

Ejemplo 20. Activación y expansión de células T $\gamma\delta$ a partir de PBMC

Los agentes activadores se probaron como agentes solubles o como agentes inmovilizados en los pocillos de cultivo. Los antígenos y anticuerpos solubles se añadieron a una concentración final de 0,1-5 μ g/mL a PBMC humanas cultivadas en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 1×10^6 células/mL. Alternativamente, los mismos anticuerpos anti $\gamma\delta$ TCR se inmovilizaron recubriendo pocillos de placas de cultivo de 24 pocillos. Los anticuerpos anti $\gamma\delta$ TCR se añadieron a una concentración de 0,1-10 μ g/mL. Los pocillos se lavaron dos veces con PBS y, a continuación, las PBMC se transfirieron a las placas y se cultivaron en medios RPMI-1640, AIM-V o CTS-OpTmizer, tal como se ha descrito anteriormente. Los medios de cultivo se

60

65

complementaron con 100 IU/mL de rIL-2.

Ejemplo 21. Activación y expansión de células T $\gamma\delta$ a partir de PBMC

5 Un millón de PBMC/mL del donante B3 se estimularon el Día-0 con varios anticuerpos inmovilizados a 0,5, 1 y 2 μ g por pocillo en placas de 24 pocillos. Los anticuerpos ensayados fueron Mouse IgG1 Isotype control clon MG1-45 (Bio Legend), UCHT-1, 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, γ 3.20, 7A5, y Zoledronate. Las FIG. 10 y FIG. 11 representan gráficos que ilustran la activación y expansión de células T δ 1 y δ 2 respectivamente a partir de PBMC. Las células se activaron y expandieron en medio que contenía RPMI con FBS al 10 %, 100 IU/mL de rIL-2, glutamina y 1x penicilina estreptomycin. En el Día 7 después de la estimulación inicial, se pasaron las células en medio nuevo y se colocaron en una placa de 24 pocillos recubierta recientemente con los mismos anticuerpos a las mismas concentraciones. El medio en los cultivos que se volvieron a estimular se repuso cada 2-3 días hasta el Día 13 y se analizó mediante citometría de flujo.

15 La **Figura 12** ilustra la cantidad total de linfocitos T δ 1 y **Figura 13** ilustra la cantidad total de linfocitos T δ 2 después de 13 días de crecimiento y expansión. La cantidad total de linfocitos T $\gamma\delta$ se calculó mediante la multiplicación del porcentaje de linfocitos T δ 1 y δ 2 (tal como se determinó mediante citometría de flujo mediante el uso de TS8.2-FITC y B6-PE, respectivamente) por la cantidad de células viables y la sustracción de los valores de control negativo de linfocitos T δ 1 y δ 2 activados por IgG MG 1-45 de ratón no específico.

La activación para la expansión de células se obtuvo solamente cuando los anticuerpos se inmovilizaron en las placas de cultivo y no se detectó expansión cuando se agregaron estos anticuerpos al cultivo en forma soluble, inclusive en una población de células PBMC entera (no se muestran los datos). Los Pan $\gamma\delta$ TCR MAb 5A6.E9 y B1 y activaron el crecimiento tanto de la población de células δ 1 como δ 2. Los MAb 15D y B6 indujeron el crecimiento selectivo de la población de células δ 2. Los MAb TS8.2 y TS-1 indujeron el crecimiento selectivo de la población de células δ 1. Es de interés que, si bien los MAb TS-1 y TS8.2 compiten entre para unirse a TCR de la superficie celular, la proliferación inducida por TS-1 fue 3 veces más grande. De manera similar, se detectó una extensión diferente de la inducción de la proliferación de la población de células δ 2 entre los anticuerpos B1, 5A6.E9, 15D, B6 y B3. Estos datos indican que son necesarios epítomos únicos para activar una expansión específica y potente de las poblaciones de linfocitos $\gamma\delta$.

Ejemplo 22. Mapeo de epítomos de $\gamma\delta$ TCR MAb activadores

35 Se identificaron los epítomos activadores específicos en $\gamma\delta$ TCR tal como se describe más adelante para TS-1 MAb. Se llevaron a cabo etapas similares para identificar los epítomos activadores de los otros anticuerpos activadores $\gamma\delta$ descritos en el presente documento.

Primero, se identificó la recombinación específica de $\gamma\delta$ reconocida por TS-1. Se generó el anticuerpo TS-1 (Thermo Fisher Scientific) mediante inmunización de ratones con la línea celular $\gamma\delta$ MOLT-13 de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T humanos (Brenner et ál., US005260223A). Se secuenciaron las cadenas de MOLT-13 $\gamma\delta$ TCR y se identificó la reorganización de la cadena específica de δ para que consistiera en los segmentos de genes V δ 1D δ 3J δ 1. Para determinar si la especificidad de unión de TS-1 es con la región variable de V δ 1 o si el sitio de unión se extiende en la región TCR CDR3 que incluye la unión V δ 1-J δ 1 y para evaluar el papel de la cadena γ y en el reconocimiento de epítomos, se clonó un conjunto extenso de cadenas γ y δ en un vector de expresión pCI (Promega). Las cadenas γ y δ TCR diseñadas de forma diferente se ordenaron como bloques g sintéticos a partir de IDT. Los genes sintéticos digeridos con NheI-NotI se clonaron en el vector pCI-neo. La secuencia de ADN de plásmido de colonias bacterianas individuales se confirmó mediante secuenciación.

50 Se diseñaron tres segmentos de genes V δ 1 que difieren en su región J δ (J δ 1, J δ 2 y J δ 3). Además, se ordenaron las cadenas V δ 2J δ 1 y V δ 3J δ 1 como genes sintéticos y se clonaron de manera similar. Cinco cadenas δ TCR (V δ 1J δ 1, V δ 1J δ 2, V δ 1J δ 3, V δ 2 y V δ 3) se transfectarán con cadenas γ TCR mediante el uso de los segmentos de genes V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5, V γ 8, V γ 9 y V γ 10. Se transfectaron 35 combinaciones de pares posibles de $\gamma\delta$ TCR y se expresaron en la superficie de células 293 transfectadas. La transfección transitoria de células 293 con vectores pCI que codifican cadenas $\gamma\delta$ se realiza con Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Las células 293 transfectadas se caracterizan por la expresión de $\gamma\delta$ TCR mediante citometría de flujo utilizando un conjunto de anticuerpos anti $\gamma\delta$ TCR de diferentes especificidades. Los análisis FACS se realizan en un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences), y se analizan utilizando el software FlowJo (Tree Star). Una vez identificado el emparejamiento específico de cadenas $\gamma\delta$ TCR reconocido por el mAb TS-1, el epítomo de unión específico se caracteriza como lineal o dependiente de la conformación.

La capacidad del anticuerpo para unirse al TCR desnaturalizado o nativo se confirma mediante análisis Western Blot. Los lisados celulares de las células que expresan el TCR se preparan por homogeneización en tampón de lisis RIPA modificado enfriado en hielo con un cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma). La concentración de proteínas se determina mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad protein assay, Microplate

Standard assay). El lisado celular se hierve durante 5 minutos en tampón de carga 1 x SDS (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 12,5 % glicerol, 1 % dodecilsulfato sódico, 0,01 % azul de bromofenol) que contiene 5 % b-mercaptoetanol, y se pasa por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Tras la electroforesis, las moléculas separadas se transfieren a una membrana de PVDF. A continuación, se bloquea la membrana y se incuba con el anticuerpo. Se utiliza un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente para la detección con la ayuda de un sistema de formación de imágenes fluorescentes.

En caso de que la unión a la cadena δ se detecte mediante análisis Western blot, se utiliza un conjunto de péptidos sintéticos solapados unidos a la membrana derivados de la secuencia polipeptídica de la cadena reactiva. (JPT peptide technology GmbH Alemania). La matriz de péptidos consiste en péptidos solapados de 12-mer, con un desplazamiento de un solo residuo que cubre toda la secuencia V δ 1 el análisis SPOTscan se realiza de la siguiente manera. La membrana se lava tres veces en TBS y se bloquea durante la noche en tampón de bloqueo (5 % de leche baja en grasa en TBST (0,05 % de Tween 20 en TBS). La membrana se lava en TBS y se incuba con el MAb TCS-1 diluido en tampón de bloqueo a 1 μ g/mL durante 3 horas a RT.

Luego de lavar la membrana tres veces en TBS, se detectó el MAb unido con IgG anti-ratón de cabra conjugada con HRP (Jackson immunResearch) diluida en amortiguador de bloqueo durante 2 horas a TA. La membrana se lavó finalmente tres veces en TBS y se incubó con solución de revelado de señal. La reacción de color se dejó revelar durante 10 a 40 minutos a TA. El sitio de unión está representado por la secuencia de los puntos de péptidos positivos.

Ejemplo 23. Mapeo de epítopos conformacionales

Los epítopos que requieren la formación de enlaces de disulfuro para el pliegue/montaje adecuado del epítipo de unión del anticuerpo son conocidos como epítopos conformacionales. La identificación de residuos de unión cruciales puede llevarse a cabo mediante mutagénesis dirigida al sitio de la cadena reactiva delta V. Las cadenas mutadas se evaluaron para verificar la pérdida de reactividad para un anticuerpo específico. Puede identificarse un residuo que comprende un sitio de unión cuando la mutagénesis del residuo crucial en una cadena no reactiva de otro modo lleva a la restauración de la unión del anticuerpo TS-1.

Puede utilizarse un Ala scan aleatorio de las cadenas reactivas de TCR para evaluar el cambio en la afinidad de unión, pérdida del reconocimiento o aumento de la afinidad por el TS-1 mAb.

Ejemplo 24. Mapeo de epítopos de moduladores novedosos de la activación y expansión de células T $\gamma\delta$

Epítopos de CD2:

La molécula CD2 consiste en dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulina extracelular, el dominio tipo V similar a Ig y el dominio tipo C similar a Ig, en los cuales se han descrito tres regiones inmunogénicas principales (Davis et ál., Immunol Today 1996; 17: 177-187). Las regiones 1 y 2 están ubicadas en el primer dominio y la región 3 está ubicada en el segundo dominio. Los anticuerpos monoclonales (MAb) que reconocen la región 1 se unen a linfocitos T tanto en reposo como activados y pueden inhibir de forma potente la unión de CD58 con CD2. Los anticuerpos monoclonales que reconocen la región 2 tienen propiedades de unión similares, pero no son eficaces para bloquear la unión de CD58. Los anticuerpos monoclonales que reconocen la región 3, reconocen únicamente CD2 en linfocitos T activados y no bloquean la unión de CD58.

El mapeo de los epítopos de unión de MAb agonistas de CD2 se realiza mediante ensayos de competencia contra CD58, el ligando natural de CD2, y ensayos de activación. Además, la mutagénesis dirigida al sitio de residuo de unión con CD2 cruciales que lleva a la pérdida de unión de CD58 se evalúa para la unión de los MAb. Los ejemplos de mutaciones incluyen la mutagénesis de la secuencia de CD2 en la posición 67 (K a R), 70 (Q a K), 110 (Y a D) y en la posición 111 (D a H). Para diseñar construcciones para el mapeo del epítipo de unión de CD2, se lleva a cabo una alineación de secuencia de CD2 humana y de ratón mediante el uso de VectorNTI (Thermo Fisher). Estas alineaciones muestran una homología de secuencia del 50 % entre CD2 humana y de ratón. Los MAb que se unen al dominio extracelular de CD2 humana no se espera que tengan reacción cruzada con CD2 de ratón. Para identificar los epítopos de unión, se generaron cambios de dominio de construcciones químicas de CD2 de ratón/humana. En dichas construcciones, el dominio tipo V similar a Ig del extremo N humano (residuos 25-128) se reemplaza con residuos de ratón (23-121) en el vector de expresión que expresa el dominio extracelular de CD2. Las especies de ADNc quiméricas se transfectan de forma transitoria en células 293 o CHO. Las construcciones quiméricas de ratón y humano y de CD2 humana de tipo salvaje se expresan en la superficie de células CHO. La expresión en la superficie celular de CD2 quimérica se analizó mediante FACScanto. La unión o pérdida de unión con una molécula quimérica se detectó mediante citometría de flujo y se validó mediante ensayos de activación.

Epítopos de NKG2D:

El mapeo de epítomos de MAb activadores contra NKG2D se comprueba por la capacidad del anticuerpo anti-hNKG2D de reducir o bloquear las interacciones de NKG2D con uno o más de sus ligandos, (MICA/MICB) o por competencia con un anticuerpo conocido por bloquear la interacción del ligando hNKG2D.

- 5 El MAb agonista se identifica por su capacidad de reducir la activación de células NK o T mediada por NKG2D. Esto puede evaluarse mediante ensayos de citotoxicidad típicos, la adición de anticuerpos bloqueantes del ligando o el bloqueo de la destrucción mediada por células T $\gamma\delta$ de células tumorales que expresan MICA de forma dependiente de la dosis.

10 Epítomos de CD27:

El mapeo del epítipo de los anticuerpos agonistas contra CD27 se realiza mediante un ensayo funcional y su capacidad para bloquear la interacción entre CD27 humano y su ligando natural CD70 humano. Las células que expresan CD27 se incuban durante 30 min con 5 μ g de MAb a 4 °C, tras lo cual se añade al tubo 1 μ g de CD70 biotinilado. La mezcla se incuba durante otros 15 min a 4 °C antes de lavar. A continuación, las células se incuban durante 30 min con una mezcla de estreptavidina-PE (para la detección de la unión del ligando CD70) seguida de varios pasos de lavado y análisis mediante FACS. El bloqueo de la unión a CD70 indica que el MAb y CD70 comparten el mismo epítipo.

20 Ejemplo 25: Caracterización del repertorio de TCR V β de una población de células T $\gamma\delta$ expandidas

La diversidad clonal de células $\gamma\delta$ T expandidas de donantes individuales se evalúa con reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La diversidad clonal de PBMC recién aisladas de donantes sanos se compara con la diversidad clonal de cultivos que se estimulan durante 7 y 13 días con diferentes agentes de activación descritos en el presente documento, incluidos anticuerpos específicos anti-TCR, ligando y lectinas.

- 25 Se extrajo el ARN de los linfocitos T $\gamma\delta$ mencionados anteriormente, se sometió a transcriptasa inversa en ADNc y se amplificó mediante PCR mediante el uso de pares de cebadores específicos de V δ 1, V δ 2 y V δ 3. El cebador directo de V δ 1 (5'ATGCTGTTCTCCAGCCTGCTGTGTGTTT 3'; SEQ ID NO: 1) el cebador directo de V δ 2 (5'ATGCAGAGGATCTCTCCCTCATCCATCT 3'; SEQ ID NO: 2) y el cebador directo de V δ 3 (5'ATGATTCTTACTGTGGGCTTTAGCTTTT 3'; SEQ ID NO: 3) se utilizaron en combinación con el cebador inverso de A C δ (5'CTTGGGGTAGAATTCCTTCACCAGACAAGC3'; SEQ ID NO: 4) para amplificar fragmentos de ADN de 500 pb.

- 35 La cadena γ se amplificó en una reacción de RT-PCR separada, mediante el uso de cebadores específicos de Vy para amplificar Vy2, Vy3, Vy4 y Vy5 (5' GGTGCTTCTAGCTTTCCTGTCTCCTGC3'), Vy8 (5'ATGCTGTTGGCTCTAGCTCTGCTTCTA3') y Vy9 (5'ATGCTGTCACTGCTCCACACATCAACG3'); los cebadores Vy se ponen en pares con el cebador inverso de Cy (5'GGAAGAAAAATAGTGGGCTTGGGGAA3'). El cebador inverso de γ se basa en la secuencia de consenso de Cy1 y Cy2. Los fragmentos de PCR se clonaron y se obtuvo la secuencia de nucleótidos de 80 inserciones independientes de Vy. Se analizaron las secuencias de unión de V δ , D δ y J δ junto con la alineación de secuencia de CDR3.

45 Ejemplo 26: MAb y construcciones de direccionamiento relacionadas para la modificación genética de células T $\gamma\delta$

Se obtuvo del gen CD20 humano a partir de un clon de ADNc (Origene Technologies, Inc., 6 Taft Court, Suite 100, Rockville, Md. 20850). El gen CD20 se amplificó mediante el uso del cebador directo (5' ATGACAACACCCAGAAATTCAGTAAATGG3') y el cebador inverso (5' TCAAGGAGAGCTGTCATTTTCTATTGGTG3'); el ADNc de CD20 amplificado se incorporó en pCADN3.4 (Thermo Fisher Scientific) como un vector de expresión elevada para células de mamífero, y se transfirió en células CHO como células huéspedes. Se identificaron las células CHO recombinantes (células CHO/CD20) que expresan moléculas CD20 a un nivel elevado en sus superficies celulares mediante análisis por FACS.

- 55 Las células CHO/CD20 se utilizaron para inmunizar ratones BALB/C o ratones transgénicos modificados genéticamente para producir anticuerpos completamente humanos, tal como se describe en Jakobovits y Bomstein (Jakobovits Curr. Opin. Biotechnol. 1995 6:561-6; Bornstein et ál., Invest New Drugs. 2010 28:561-74.). Los anticuerpos con afinidad y especificidad elevada con CD20 humano se evaluaron mediante ensayos por FACS. Los anticuerpos de ratón se humanizaron mediante injerto de CDR (Kim y Hong Methods Mol Biol. 2012;907:237-45. También se generaron anticuerpos de CD20 de dominio simple humano a partir de ratas o ratones modificados genéticamente para producir anticuerpos humanos de dominio simple de cadena pesada (Janssens et ál., PNAS 2006 vol. 103:15130).

- 65 El gen que codifica el anticuerpo de CD20 de afinidad/especificidad alta descrito en el presente documento se clonó en la estructura principal del vector retroviral de MSGV1 o el vector lentiviral de pCAG. Los dominios VH y VL se clonaron ya sea a partir de hibridoma de ratón que expresa el MAb seleccionado o a partir de

cadenas de anticuerpo humanizado. Los linfocitos T $\gamma\delta$ se modificaron genéticamente con MAb de CD20 descritos en el presente documento.

Ejemplo 27: Construcciones de TCR para la modificación genética de células T $\gamma\delta$

Se aislaron construcciones que expresan TCR que comprenden secuencias de cadenas de $\alpha\beta$ TCR altamente reactivas a partir de linfocitos T que expresan complejos de péptido específicos de NY-ESO-1-CMH. Los complejos de péptido específicos de NY-ESO-1-CMH inducen actividad antitumoral potente *in vitro* e *in vivo* contra diversos tumores que expresan NYESO-1.

Las cadenas de $\alpha\beta$ TCR altamente reactivas se aislaron a partir de pacientes con melanoma, sarcoma o de ratones con xenoinjertos derivados de pacientes derivados de tumores de sarcoma o melanoma humano. De manera alternativa, el TCR se derivó de ratones alterados para tener un sistema inmunitario humanizado que exprese péptidos de NY-ESO-1 o complejos de péptido de NYESO-1 (véase Gonzales et ál., Immunol Res. 2013 57: 326-334; Boucherma et ál., J Immuno. 2013. 191; 583-593; Liang-PingL. Et ál., Nature Med. 2010, 16:1029-1035). Se identificaron los linfocitos T que reconocen epítomos de NY-ESO-1 en el contexto de alelos de clase I de HLA-A*02 (por ejemplo, péptido SLLMWITQC, residuos 157-167) y péptido asociado con HLA-A*01 dominante.

Las secuencias de los transcritos TCR α y TCR β se generan mediante transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando el kit One step RT-PCR (Qiagen Hilden Alemania) de acuerdo con las sugerencias del fabricante. El ADNc de primera cadena se genera a partir del ARN aislado de la célula T reactiva. El ARN total se extrae con TRIzol Total RNA Isolation Reagent (Invitrogen Life Technologies) de los clones CTL. La amplificación de las cadenas α y β del TCR se realiza mediante un conjunto de cebadores degenerados que pueden unirse a la región altamente conservada de las regiones V de las cadenas α y β del TCR centradas alrededor de los residuos de triptófano-tirosina en las posiciones de aminoácidos 34 y 35 (numeración de Kabat) se utilizan en combinación con los cebadores inversos de la región constante α y β (Moonka y Loh Journal of Immunological Methods 169 (1994) 41-51). Los fragmentos de PCR amplificados se purifican en gel y se secuencian directamente. La información de la secuencia se utiliza para diseñar cebadores de PCR adecuados para la clonación de los ADNc de longitud completa individuales.

Los genes TCRs se clonan e insertan en vectores retrovirales basados en MSGV y los cADNs de longitud completa se amplifican a partir de células T seleccionadas. Los vectores retrovirales que codifican las cadenas α y β del TCR humano reactivo al NY-ESO-1 de tipo salvaje se construyen utilizando un esqueleto MSGV1. La unión de las cadenas TCR α y TCR β se realiza a través de un elemento de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) en una construcción, o por separación utilizando una secuencia de péptido picorovirus escindible.

Se generaron sobrenadantes retrovirales mediante contranfección de células 293 que expresaban de forma estable proteínas gag y pol de MMLV con cada vector de TCR de MSGV1 y un vector que codifica la proteína de envoltura retroviral de virus endógeno mediante el uso de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) tal como se describió anteriormente o mediante el uso de electroporación mediante el uso de Nucleofector (Lonza). Los sobrenadantes se recogieron en el día 2 y 3 posteriores a la transfección y se diluyeron 1:1 con DMEM fresco que contenía FCS al 10 %. Los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente son capaces de expresar de manera adecuada los genes que codifican las cadenas de TCR α y β sin purificación adicional.

Ejemplo 28. Modificación genética de células T $\gamma\delta$ con una construcción de $\alpha\beta$ TCR

Se clona un polinucleótido que comprende un $\alpha\beta$ TCR (fracción de reconocimiento tumoral) a partir de células T seleccionadas para ser específicas del antígeno deseado mediante técnicas estándar. Las células T $\gamma\delta$ endógenas de tipo salvaje aisladas se cultivan con los métodos descritos en ejemplos anteriores hasta alcanzar al menos 6×10^6 células antes de la infección con el retrovirus o un lentivirus que comprende un casete de expresión que codifica la fracción de reconocimiento tumoral. Puede utilizarse un protocolo estándar de infección viral para introducir el sistema vectorial en la célula T $\gamma\delta$ de tipo salvaje. La expresión del marcador de selección se utiliza para seleccionar las células que han sido transfectadas con éxito.

La expresión del $\alpha\beta$ TCR modificado genéticamente puede evaluarse mediante citometría de flujo y/o mediante QRT-PCR cuantitativa y mediante ensayos funcionales con células objetivo para verificar la citotoxicidad y secreción de citocina. La expresión del dominio de activación modificado genéticamente también puede evaluarse mediante citometría de flujo y/o mediante qRT-PCR cuantitativa. La cantidad de linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente que expresa un marcador de la superficie celular de interés se determina mediante citometría de flujo. El linfocito T $\gamma\delta$ modificado genéticamente se modifica genéticamente de manera adicional con una metodología adecuada descrita en el presente documento, tal como las tecnologías de CRISPR-Cas, talen, meganucleasas, dedos de cinc o transposón bella durmiente para eliminar un exón asociado con un gen de HLA o un gen de $\beta 2M$.

Ejemplo 29: Modificación genética de células T γδ con construcciones de CAR y TCR

- 5 Los linfocitos T γδ se sometieron a transducción con vectores de base retroviral o lentiviral para expresar restos de direccionamiento que puedan dirigir los linfocitos T γδ modificados genéticamente para reconocer específicamente células tumorales y activarse para matarlas. Los restos de direccionamiento transducidos incluyen MAb dirigidos contra proteínas de la superficie específicas de tumores o péptidos intracelulares específicos de tumores. Los linfocitos T γδ también se modifican genéticamente con TCR de afinidad alta dirigidos a complejos de péptido y CMH.
- 10 De manera alternativa, las células pueden modificarse genéticamente por medio de transducción con vectores no virales.

Ejemplo 30: Modificación genética de células T γδ con restos de direccionamiento

- 15 El diseño del constructo CAR consta de diferentes dominios funcionales principales, una molécula diana que reconoce una proteína o un péptido de interés asociado al CMH que se muestra en una célula tumoral, un espaciador corto que conecta el elemento diana del receptor extracelular con el dominio transmembrana, que atraviesa la membrana celular y conecta con el dominio de señalización de activación intracelular.
- 20 El receptor de la molécula diana expresado en la superficie de una célula T γδ se diseñará para unirse específicamente a una proteína diana expresada en una célula cancerosa. Las moléculas de reconocimiento de tumores se diseñarán contra dianas leucémicas como CD19, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, glicolípidoF77, proteína activadora de fibroblastos, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, mesotelina, c-met, CSPG4, Nectin-4, VEGFR2, PSCA, receptor/proteína de unión a folato, SLC44A4, Cripto, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R y SLTRK6.
- 25 El receptor de la molécula diana puede derivarse de una porción de un anticuerpo específico de la glicoproteína tumoral expresada en la superficie de las células tumorales, o, alternativamente, el receptor diseñado puede derivarse de un receptor TCR con una especificidad conocida o de un anticuerpo que reconozca una secuencia peptídica específica derivada de un antígeno específico tumoral intracelular presentado en la superficie en asociación con el complejo CMH, incluyendo gp100, MART1, tirosinasa, SSX2, SSX4, NYESO-1, antígeno tumoral epitelial (ETA), genes de la familia MAGEA (como MAGE3A, MAGE4A), KKL1, ras mutado, βraf, p53, molécula A relacionada con la cadena I del CMH (MICA), molécula B relacionada con la cadena de clase I del CMH (MICB), VPH o CMV. Estas moléculas de reconocimiento tumoral de alta afinidad similares a los receptores de células T reconocerán el complejo péptido-CMH con un alto grado de especificidad.
- 30 El receptor de la molécula diana puede derivarse de una porción de un anticuerpo específico de la glicoproteína tumoral expresada en la superficie de las células tumorales, o, alternativamente, el receptor diseñado puede derivarse de un receptor TCR con una especificidad conocida o de un anticuerpo que reconozca una secuencia peptídica específica derivada de un antígeno específico tumoral intracelular presentado en la superficie en asociación con el complejo CMH, incluyendo gp100, MART1, tirosinasa, SSX2, SSX4, NYESO-1, antígeno tumoral epitelial (ETA), genes de la familia MAGEA (como MAGE3A, MAGE4A), KKL1, ras mutado, βraf, p53, molécula A relacionada con la cadena I del CMH (MICA), molécula B relacionada con la cadena de clase I del CMH (MICB), VPH o CMV. Estas moléculas de reconocimiento tumoral de alta afinidad similares a los receptores de células T reconocerán el complejo péptido-CMH con un alto grado de especificidad.
- 35 El receptor de la molécula diana puede derivarse de una porción de un anticuerpo específico de la glicoproteína tumoral expresada en la superficie de las células tumorales, o, alternativamente, el receptor diseñado puede derivarse de un receptor TCR con una especificidad conocida o de un anticuerpo que reconozca una secuencia peptídica específica derivada de un antígeno específico tumoral intracelular presentado en la superficie en asociación con el complejo CMH, incluyendo gp100, MART1, tirosinasa, SSX2, SSX4, NYESO-1, antígeno tumoral epitelial (ETA), genes de la familia MAGEA (como MAGE3A, MAGE4A), KKL1, ras mutado, βraf, p53, molécula A relacionada con la cadena I del CMH (MICA), molécula B relacionada con la cadena de clase I del CMH (MICB), VPH o CMV. Estas moléculas de reconocimiento tumoral de alta afinidad similares a los receptores de células T reconocerán el complejo péptido-CMH con un alto grado de especificidad.
- 40 El receptor de la molécula diana puede derivarse de una porción de un anticuerpo específico de la glicoproteína tumoral expresada en la superficie de las células tumorales, o, alternativamente, el receptor diseñado puede derivarse de un receptor TCR con una especificidad conocida o de un anticuerpo que reconozca una secuencia peptídica específica derivada de un antígeno específico tumoral intracelular presentado en la superficie en asociación con el complejo CMH, incluyendo gp100, MART1, tirosinasa, SSX2, SSX4, NYESO-1, antígeno tumoral epitelial (ETA), genes de la familia MAGEA (como MAGE3A, MAGE4A), KKL1, ras mutado, βraf, p53, molécula A relacionada con la cadena I del CMH (MICA), molécula B relacionada con la cadena de clase I del CMH (MICB), VPH o CMV. Estas moléculas de reconocimiento tumoral de alta afinidad similares a los receptores de células T reconocerán el complejo péptido-CMH con un alto grado de especificidad.

Ejemplo 31: Direccionamiento de construcciones de restos con un espaciador y un dominio transmembrana

- 45 Se diseñarán diferentes espaciadores en un constructo de fracción de reconocimiento tumoral para optimizar la potencia de una célula T diseñada frente a una célula cancerosa. El tamaño de cada espaciador variará en función del tamaño de la proteína diana, el epítipo reconocido por el receptor, el tamaño de la fracción de reconocimiento tumoral diseñada y la afinidad del receptor. Los espaciadores que pueden adaptarse a cambios conformacionales incluyendo secuencias de IgG humana, CD8a y la región bisagra de CD4.
- 50 Los espaciadores se evaluaron para que consistieran en aminoácidos de Gly, Ser y Thr utilizados con diferentes longitudes (de 19 a 9 residuos) para proporcionar un receptor quimérico con propiedades de afinidad de unión mejoradas. Las partes de transmembrana y bisagra de cada construcción derivan de la secuencia de CD8a (residuos 117 a 178 de CD8a humana) o, de manera alternativa, el ADNc de Fc de la bisagra de IgG1 humana con dominio transmembrana de CD28 (residuos 153-179).

Ejemplo 32: Direccionamiento de construcciones de restos con dominios coestimuladores

- 55 Se modificarán genéticamente diferentes dominios coestimuladores en una construcción que comprende un fracción de reconocimiento de tumores. Un dominio coestimulador que comprende la señalización coestimuladora de CD28, 4-1BB, CD2, CD27, NKG2D, CD161, CD30, JAML, CD244 o CD100 se modifica genéticamente en un linfocito T γδ para imitar una "segunda señal" que amplifique la activación a través del receptor quimérico, lo cual lleva a una señal más potente para multiplicarse y matar la célula cancerosa.
- 60 La región citoplasmática deriva de los endodominios de moléculas coestimuladoras de linfocitos T αβ y/o γδ, inclusive: moléculas CD28 (residuos 180-220), CD137 (residuos 214-255), ICOS (residuos 165-199) CD27 (residuos 213-260) NKG2D (residuos 1-51), JAML (residuos 297 - 394) CD2 (residuos 236 - 351), CD30 (residuos 408 - 595) OX40 (residuos 1 - 23), HVEM (residuos 224 - 283) o CD46. Las construcciones óptimas

se seleccionan basándose en su grado de activación de las poblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente para la citotoxicidad celular inducida y basándose en el grado de secreción de citocina *in-vitro* e *in-vivo*.

5 Ejemplo 33: Direccionamiento de restos que comprenden un dominio de activación de CD3 ζ

El CD3 ζ intracelular (residuos 52-164) que contiene tres dominios ITAM (ITAM1: APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR, (SEQ ID NO: 5); ITAM 2: PQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM, (SEQ ID NO: 6); e ITAM3: ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ, (SEQ ID NO: 7) se clonó.

El dominio intracelular de TCR ζ se amplificó mediante el uso de los cebadores 5' AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA -3' (SEQ ID NO: 8) y el cebador inverso 5' CTCGAGTGGCTGTTAGCCAGA-3' (SEQ ID NO: 9).

Las construcciones de CAR se generaron mediante PCR de extensión superpuesta de múltiples etapas. Los productos se fusionaron en una reacción de PCR separada impulsada por cebadores seguidos por el kit de alta fidelidad de polimerasa de ADN Platinum Taq (Invitrogen), mediante el uso del protocolo de reacción en cadena de polimerasa de extensión superpuesta. El ADN que codifica la construcción de longitud completa se ligó en un vector retroviral de MSGV1. La construcción proporciona un resto de direccionamiento de CAR que comprende un dominio de activación de CD3 ζ .

Ejemplo 34: Modificación genética de células T $\gamma\delta$ con más de un fracción de reconocimiento

Las células T $\gamma\delta$ se transdujeron con más de una construcción que comprende un fracción de reconocimiento de tumores, inclusive un TCR y un MAb dirigido a la misma proteína específica intracelular de tumores. Cada construcción se seleccionó para reconocer un péptido específico en el contexto de haplotipos de CMH diferentes, tales como A2 y A1, anticuerpos dirigidos a objetivos diferentes expresados en las mismas células tumorales o anticuerpos dirigidos a epítopos diferentes en el mismo objetivo.

Ejemplo 35: Expansión *in vitro* de células T $\gamma\delta$ modificadas genéticamente

Las células T $\gamma\delta$ modificadas genéticamente se cultivan y expanden en un medio de cultivo de tejido adecuado, tal como el medio de cultivo de tejido descrito en los ejemplos anteriores. Los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente se cultivan de forma exponencial hasta 1×10^6 en una incubadora con CO₂ al 5 % a 37° C con o sin estimulación mediante un antígeno externo y sin cocultivo con APC o aminofosfatos.

Ejemplo 36: Caracterización funcional de las citocinas liberadas por células T $\gamma\delta$ activadas diseñadas y no diseñadas.

La expresión de IFN- γ , TNF- α (R&D Systems), IL-1 β , IL-2, (Biosource International), IL-12 (Diacclone Research) e IL-18 se medirá utilizando kits comerciales de ensayo inmunoenzimático (ELISA). Los ensayos inmunoenzimáticos se realizarán siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de citocina se medirá en diferentes puntos temporales (de 24 a 72 horas) en una placa de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorb, Nunc) recubierta con una IgG1 monoclonal de ratón contra la citocina humana, a una concentración de 1 μ g/ml en tampón de bicarbonato sódico 0,05 M durante la noche a 4 °C. Tras el lavado con PBS que contenga 0,05% de Tween 20, la placa se bloqueará con 3% de albúmina de suero bovino (BSA, p/vol, Sigma) en PBST durante 1 h a 37 °C. Se añadirá un estándar (citoquina humana recombinante de I+D) y sobrenadante de muestras de cultivos de $\gamma\delta$ y la placa se incubará a RT durante 2 h. Detección con un par de anticuerpos emparejados en relación con los estándares de citoquina humana recombinante.

Ejemplo 37: Identificación de agentes coestimuladores

Se evaluó la capacidad de diferentes agentes coestimuladores de sustentar la activación, expansión y viabilidad de linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente y no modificados genéticamente mediante la adición de agentes coestimuladores a PBMC enteras o poblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente y no modificados genéticamente enriquecidos. Los agentes coestimuladores se agregaron en una forma soluble o inmovilizada a diferentes agentes activadores, inclusive MAb específicos contra $\gamma\delta$ TCR. Se colocaron en placas PBMC humanas purificadas a partir de capas leucocitarias, tal como se describió en ejemplos anteriores, o linfocitos aislados de tejidos, a 2×10^6 en 1 mL de medio RPMI-1640 completo, complementado con 100 IU/mL de rIL-2 en placas de tejido de 24 pocillos de fondo plano con 2-10 μ g de anticuerpo contra $\gamma\delta$ TCR en presencia o ausencia de anticuerpos solubles o inmovilizados de CD2, CD27, CD28, CD30, CD 137, ICOS, CD161, CD122, CD244 y NKG2D, o ligandos estimulantes, inclusive, CD70-FC (ligando de CD27) MICA, MICB y ULBP (ligandos de NKG2D), 4-1BB (ligando de CD137) y Pilar 9 (ligando de CD 161).

Ejemplo 38: Activación de soporte de citocina

Se evaluó la capacidad de diferentes citocinas de sustentar la activación, expansión y viabilidad de linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente y no modificados genéticamente mediante la adición de citocinas a PBMC enteras o poblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente y no modificados genéticamente enriquecidos. Para evaluar el soporte de activación de citocina, se agregaron diversas citocinas individualmente a cultivos celulares separados cada 3 días a 100 IU/mL. Las citocinas evaluadas incluyen IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-33, IL-21, IL-18, IL-19, IL-4, IL-9, IL-23 e IL1 β . Después del final de un período de tiempo seleccionado, se recogió una muestra de células y la composición de la población celular, es decir, los porcentajes de linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos T $\alpha\beta$, linfocitos B y linfocitos citolíticos se determinaron mediante citometría de flujo.

Las células se mantuvieron en cultivo y la expansión de poblaciones seleccionadas se evaluó en el día 14 y el día 21.

Ejemplo 39: Ensayo de citotoxicidad *in vitro* de células T $\gamma\delta$ diseñadas y no diseñadas *in vitro*

El ensayo de citotoxicidad *in vitro* de células $\gamma\delta$ -T diseñadas o no diseñadas se determina mediante 4 ensayos de citotoxicidad diferentes: 1) Lisis de células tumorales; 2) liberación de citocinas por células T activadas; 3) ensayo de LDH; y 4) activación de la expresión de CD107a. Como células diana se utilizan diversas líneas celulares tumorales humanas o células derivadas de tumores humanos (líneas tumorales de xenoinjerto derivadas de pacientes) derivadas de cáncer de colon, mama, ovario, riñón, cabeza y cuello, cavidad oral, páncreas e hígado, entre otros. Las células epiteliales mamarias humanas normales (HMEC) se utilizan como control negativo. Brevemente, las células diana proliferantes se siembran a 1×10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Después de 24 horas, se retira el medio y se añaden células $\gamma\delta$ -T activadas en medio RPMI (RPMI-1640 de Corning, 10 % de suero fetal bovino Hyclone, 2 mmol/L de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomina) a una proporción de efector a diana de 20:1 o 40:1 y se incuban durante 5 horas a 37° C en atmósfera humidificada al 5 % de CO₂. La citoquina liberada por las células $\gamma\delta$ -T diseñadas y no diseñadas, tras esta incubación, se determina recogiendo el sobrenadante del co-cultivo y cuantificando la secreción de citoquinas, incluyendo IFN- γ , IL2, TNF α , IL-6, e IL1 β utilizando un kit ELISA disponible comercialmente (BioLegend). El ensayo LDH se realiza utilizando un kit de detección de citotoxicidad LDH (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se determinó la expresión de CD107a mediante la adición de 5 μ l de anticuerpo CD107a conjugado con Cy7PE (BioLegend) luego de la adición de linfocitos T $\gamma\delta$ a las células objetivo. La placa se centrifugó brevemente y se incubó durante 1 hora a 37 °C en una atmósfera humidificada para CO₂ al 5 % y luego se agregaron 8,5 μ L de una dilución 1:50 de Golgi stop de BD Biosciences (BD). Se incubaron las células durante 2 horas adicionales a 37 °C en una atmósfera humidificada para CO₂ al 5 %. Luego de esta incubación, se recogieron las células en hielo, se lavaron una vez con HBSS fría y se tñieron con 1 μ l de tinte de amina zombie aqua (BioLegend) para determinar la población de células vivas en 100 μ l de HBSS. Las células se lavaron en medio de tinción con FACS (FSM; HBSS que contenía suero fetal bovino al 2 %) y se volvieron a suspender en 100 μ l de FSM que contenía cantidades saturantes de anticuerpos, inclusive anticuerpos V61 conjugados con FITC (clon TS8.2 de ThermoFisher) y anticuerpos V δ 2 conjugados con PE (clon B6 de BioLegend). Los anticuerpos se incubaron con células durante 30 minutos en hielo y luego se lavaron con una cantidad en exceso de HBSS. Las poblaciones teñidas se recogieron en un BD FACSCanto II y se analizaron mediante el uso del software FlowJo v 10.1.

Ejemplo 40: Actividad antitumoral de linfocitos T $\gamma\delta$ expandidos *in vitro*

Se evaluó la actividad citotóxica contra diversas líneas celulares tumorales y células tumorales primarias con una proporción entre efector y objetivo de entre 1:1 y 40:1. Se midieron las lisis de líneas celulares tumorales y células de tumores primarios mediante la detección de la liberación de enzimas intracelulares lactato deshidrogenasa. Se midió el porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ que expresan restos de reconocimiento de tumores modificados genéticamente en el cultivo mediante ensayos de citometría de flujo, ELISA y/o ELISPOT.

Ejemplo 41: Actividad antitumoral *in vivo*

Se inyectaron cohortes de ratones inmunodeficientes injertados con xenoinjertos de tumores humanos o ratones huPBMC-NOG (Taconic), o ratones con sistemas inmunitarios humanizados, tal como se describió anteriormente, por vía subcutánea u ortotópica con células derivadas de un tumor derivado de un paciente o líneas celulares tumorales, inclusive cánceres de colon, mama, ovario, renales, de cabeza y cuello, próstata, vejiga, cavidad bucal, páncreas y hepáticos, y se permitió que alcanzaran un tamaño promedio de 100 mm³. Los linfocitos T $\gamma\delta$ aislados o enriquecidos, ya sea sin tratamiento o modificados genéticamente, se inyectaron por vía intravenosa en ratones o directamente en el tumor con un rango de dosis. La regresión del tumor se definió como una reducción del volumen tumoral después de la dosificación de linfocitos T $\gamma\delta$ y se comparó con un estándar de cuidado y sin tratamiento para el diagnóstico específico. En algunos experimentos, se marcaron los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente o sin tratamiento con GFP o

luciferasa y se inyectaron en ratones con tumores para seguir su persistencia y migración guiada. Al final del estudio, se recogieron los tumores y se analizaron las células GFP positivas mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica.

5 Ejemplo 42. Criopreservación de linfocitos T γδ en medio de congelamiento para generar bancos de células para su procesamiento adicional

10 Se formularán linfocitos T γδ no modificados genéticamente en medio de congelamiento y se colocarán en unidades de almacenamiento criogénico, tales como congeladores de nitrógeno líquido (-195 °C) o congeladores a temperatura ultra baja (-65 °C, -80 °C o -120 °C) para su almacenamiento a largo plazo. El medio de congelamiento contendrá dimetilsulfóxido (DMSO), cloruro de sodio (NaCl), dextrosa, sulfato de dextrano o hidroxietil almidón (HES) con agentes fisiológicos amortiguadores del pH en el intervalo entre 6,5 y 7,5

15 Los linfocitos T γδ criopreservados se descongelarán y procesarán adicionalmente mediante estimulación con anticuerpos, proteínas, péptidos y citocinas. Los linfocitos T γδ criopreservados se descongelarán y se modificarán genéticamente, tal como se describió anteriormente en el presente documento solicitud. Los linfocitos T γδ modificados genéticamente se criopreservarán de forma adicional para generar bancos de células en cantidades de 10, 100, 200 viales de 10^6 a 10^8 células por mL en medio de congelamiento.

20 Ejemplo 43. Criopreservación alternativa de linfocitos T γδ en medio de congelamiento para generar bancos de células para su procesamiento adicional

25 Se agregan otros crioprotectores al soporte de criopreservación descrito en el ejemplo anterior para proporcionar sustento nutricional y protección celular biofísica contra la lisis durante el proceso de congelamiento y descongelamiento. Estos incluyen D-glucosa, manitol, sacarosa, adenina, guanosina, albúmina humana recombinante, citrato, anticoagulante, Benzonase, DNasa, propilenglicol, etilenglicol, 2-metil-2,4-pentanodiol. Los aditivos adicionales diseñados para proporcionar capacidad de amortiguación para un producto congelado de densidad celular elevada incluyen fosfato inorgánico, bicarbonato de sodio y HEPES.

30 Ejemplo 44. Criopreservación de linfocitos T γδ en medio de congelamiento para generar bancos de células para su procesamiento adicional

35 La congelación inicial de los linfocitos T γδ se realiza con un aumento gradual de temperatura controlado que está diseñado para lograr una velocidad de congelamiento de entre -0,1 °C y -5 °C por minuto mediante el uso de un congelador de velocidad controlada (por ejemplo, congelador de velocidad controlada CryoMed) o un congelador mecánico a -70 °C con un sistema de estantes aislado de manera adecuada para proporcionar la velocidad de congelamiento deseada. Las células congeladas se colocan en congeladores a -70 °C para su almacenamiento a corto plazo de entre 30 y 60 días. Las células congeladas se colocan en almacenamiento de N₂ líquido para su almacenamiento a largo plazo de hasta 12, 24, 36 y 48 meses mientras se mantiene la cantidad de linfocitos T γδ y funciones celulares sin deterioro, tal como se mide mediante métodos descritos en secciones anteriores.

45 Las células criopreservadas descritas en este ejemplo se descongelarán y se estimularán y expandirán de forma adicional en recipientes cerrados adecuados, tales como biorreactores y/o bolsas de cultivo celular para generar cantidades adecuadas de linfocitos T γδ modificados genéticamente para su administración a un sujeto.

50 Ejemplo 45. Formulación de linfocitos T γδ para infusión directa a pacientes

Los linfocitos T γδ modificados genéticamente se concentraron mediante centrifugación y/o diafiltración en membrana entre 5×10^6 células/mL y 10^8 células/mL en amortiguador fisiológico que contenía excipientes crioprotectores y se colocaron en unidades de almacenamiento criogénicas, tales como refrigeradores de nitrógeno líquido o de temperatura ultra baja, para su almacenamiento a largo plazo.

55 Ejemplo 46. Tratamiento de un sujeto humano que padece cáncer

60 Se descongelan los linfocitos T γδ modificados genéticamente frescos o congelados junto a la cama del paciente y se infunden por vía intravenosa a sujetos humanos. Se infunde alrededor de 1 célula por kilogramo a alrededor de 1×10^{10} células por kilogramo de linfocitos T γδ modificados genéticamente al sujeto humano durante un período de tiempo de 30-60 minutos. Los linfocitos T γδ modificados genéticamente se administran con o sin la ayuda de la citocina coestimuladora IL-2 u otras citocinas. Opcionalmente, se repite el procedimiento. La expansión *in vivo* de los linfocitos T γδ en el sujeto se mide mediante citometría de flujo.

Reivindicaciones

1. Una composición que comprende una población de células T $\gamma\delta$ y un agente que estimula una expansión de la población de células T $\gamma\delta$, en la que el agente es un anticuerpo y en la que:
 - a. el agente es un anticuerpo que está dirigido a un dominio específico único de la cadena V δ 1, y el anticuerpo activa y expande específicamente poblaciones de células T δ 1 $\gamma\delta$, de tal manera que la población expandida de células T $\gamma\delta$ comprende un porcentaje de células T δ 1, en donde el porcentaje de células T δ 1 es superior al 60 %; o
 - b. el agente es un anticuerpo dirigido a un dominio específico exclusivo de la cadena V δ 2, y el anticuerpo activa y expande específicamente poblaciones de células T δ 2 $\gamma\delta$, de manera que la población expandida de células T $\gamma\delta$ comprende un porcentaje de células T δ 2, en donde el porcentaje de células T δ 2 es superior al 60 %.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que:
 - a. la población expandida de células T $\gamma\delta$ comprende un porcentaje de células T δ 1, en donde el porcentaje de células T δ 1 en la población expandida de células T $\gamma\delta$ es superior al 90 o 90 %; o
 - b. la población expandida de células T $\gamma\delta$ comprende un porcentaje de células T δ 2, en donde el porcentaje de células T δ 2 en la población expandida de células T $\gamma\delta$ es superior al 80 o 90 %.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos TS8.2, 15D, B6, TS-1 y R9.12, en donde el anticuerpo se inmoviliza en una superficie.
4. Un método para la expansión *in vitro* de una población de células $\gamma\delta$ T, comprendiendo el método el contacto de la población de células $\gamma\delta$ T con un agente de activación que estimula la expansión de la población de células $\gamma\delta$ T, en donde:
 - a. el agente de activación es un anticuerpo que se dirige a un dominio específico exclusivo de la cadena V δ 1, y el anticuerpo activa y expande específicamente poblaciones de células δ 1 $\gamma\delta$ T, en donde el método genera una población expandida de células $\gamma\delta$ T que comprende un porcentaje de células δ 1 T, en donde el porcentaje de células δ 1 T en la población expandida de células $\gamma\delta$ T es superior al 60 %, opcionalmente superior al 80 % o al 90 %; o bien
 - b. el agente es un anticuerpo dirigido a un dominio específico exclusivo de la cadena V δ 2, y el anticuerpo activa y expande específicamente poblaciones de células δ 2 $\gamma\delta$ T, en donde el método genera una población expandida de células $\gamma\delta$ T que comprende un porcentaje de células δ 2 T, en donde el porcentaje de células δ 2 T en la población expandida de células $\gamma\delta$ T es mayor del 60 %, opcionalmente mayor del 80 % o 90 %.
5. El método de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo está inmovilizado en una superficie, más preferentemente en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos TS8.2, 15D, B6, TS-1 y R9.12.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o el método de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde las células T $\gamma\delta$ se derivan de una célula T $\gamma\delta$ aislada de una muestra compleja de un sujeto, preferiblemente una muestra de sangre, una muestra de sangre de cordón umbilical, un tumor, un precursor de células madre, una biopsia tumoral, un tejido, una linfa o sitios epiteliales de un sujeto en contacto directo con el medio externo.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 6 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde las células T $\gamma\delta$ de la población de células T $\gamma\delta$ se modifican para expresar una fracción de reconocimiento tumoral, preferentemente en donde:
 - a. las células T $\gamma\delta$ modificadas carecen de un locus HLA;
 - b. Las células T $\gamma\delta$ modificadas son células donantes universales;
 - c. las células T $\gamma\delta$ modificadas son células T $\gamma\delta$ alogénicas específicas de tumor; o
 - d. las células T $\gamma\delta$ modificadas están diseñadas para expresar dos o más moléculas de reconocimiento

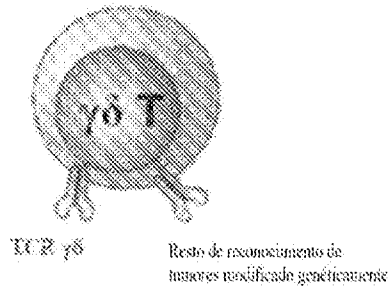
tumoral, preferiblemente:

- i. en las que las dos o más moléculas de reconocimiento tumoral son diferentes, en las que cada molécula de reconocimiento tumoral diferente está diseñada para reconocer diferentes epítomos del mismo antígeno; o
 - ii. en los que las dos o más moléculas de reconocimiento tumoral son diferentes, en los que cada molécula de reconocimiento tumoral diferente está diseñada para reconocer epítomos diferentes de antígenos diferentes.
8. La composición de la reivindicación 7 o el método de la reivindicación 7, en donde:
- a. la fracción de reconocimiento tumoral se deriva de un linfocito infiltrante tumoral;
 - b. La fracción de reconocimiento tumoral se clona a partir de una célula T;
 - c. la fracción de reconocimiento tumoral es un receptor de células T manipulado, preferiblemente en donde:
 - i. el receptor de células T manipulado se deriva de un receptor de células T humano o de ratón;
 - ii. el receptor de células T manipulado es un TCR $\alpha\beta$ manipulado; o
 - iii. el receptor de células T manipulado es un TCR $\gamma\delta$ manipulado;
 - d. la fracción de reconocimiento tumoral es un anticuerpo, un anticuerpo de dominio único, un fragmento de anticuerpo, un Fab, un fragmento de unión a antígeno del mismo, que reconoce un antígeno tumoral, preferentemente cuando la fracción de reconocimiento tumoral se deriva de una célula B de camello o una célula B de llama; o
 - e. el antígeno tumoral es un complejo péptido-CMH, y la fracción de reconocimiento tumoral reconoce el complejo péptido-CMH.
9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 6 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde las células T $\gamma\delta$ de la población de células T $\gamma\delta$ se diseñan para expresar una fracción de reconocimiento de antígeno, en donde la fracción de reconocimiento de antígeno reconoce un antígeno asociado con una enfermedad autoinmune o en donde la fracción de reconocimiento de antígeno reconoce un antígeno patógeno.
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 7-9 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde la población de células T $\gamma\delta$ modificadas por ingeniería comprende al menos 1×10^7 células T $\gamma\delta$ modificadas por ingeniería.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en donde el agente de activación estimula la expansión de la población de células T $\gamma\delta$ a una tasa media de 1 división celular en menos de 24 horas.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4-11, en donde
- a. dicho anticuerpo estimula el crecimiento de la población de células $\delta 1 \gamma\delta$ a una tasa tal que durante un periodo de tiempo de 1 día a 90 días de cultivo resulta en una expansión superior a 10 veces sobre otra población de células $\gamma\delta$ T; o
 - b. dicho anticuerpo estimula el crecimiento de la población de células $\delta 2 \gamma\delta$ a un ritmo tal que durante un periodo de tiempo de 1 día a 90 días de cultivo resulta en una expansión superior a 10 veces sobre otra población de células $\gamma\delta$ T.
13. El método de la reivindicación 5, en donde:
- a. el anticuerpo que expande selectivamente las células $\delta 1 \gamma\delta$ T se selecciona entre el anticuerpo TS-1 o el anticuerpo TS 8.2; o
 - b. el anticuerpo que expande selectivamente las células T $\delta 2 \gamma\delta$ se selecciona entre el anticuerpo B6 o el anticuerpo 15D.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4-13, en donde la población de células $\gamma\delta$ T se expande usando una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 o IL-33.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4-14, en donde la población de células T $\gamma\delta$ se expande

sin estimulación de antígeno mediante una célula presentadora de antígeno o un aminofosfato.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4-15, en donde las células $\gamma\delta$ T se expanden a partir de una población PMBC completa sin agotamiento previo de poblaciones celulares específicas de monocitos, células $\alpha\beta$ T, células B y células NK.
- 5

Panel A



Panel B

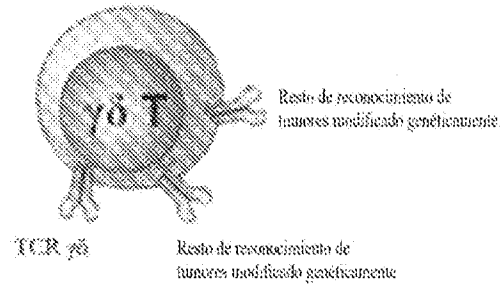


Fig. 1

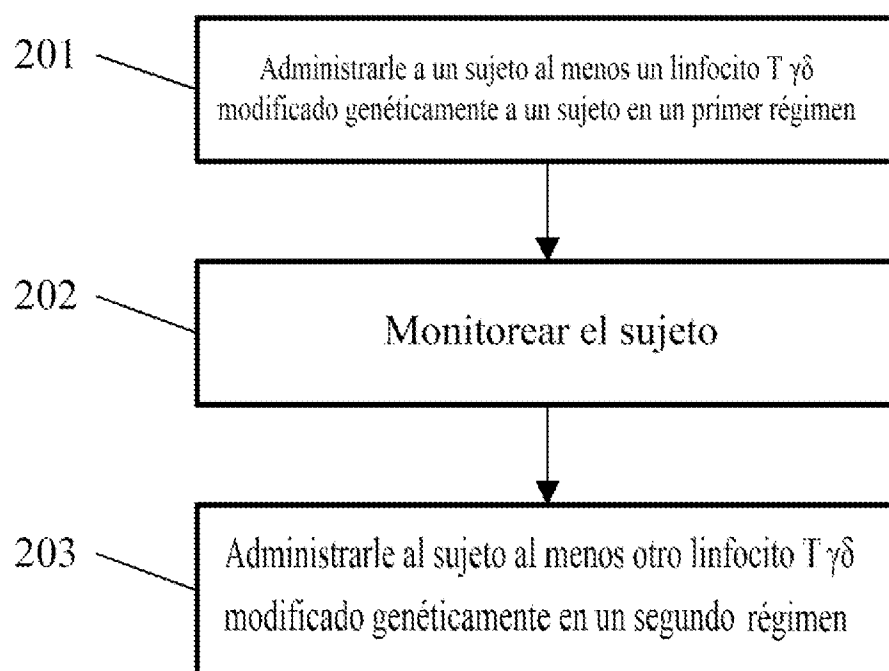


Fig. 2

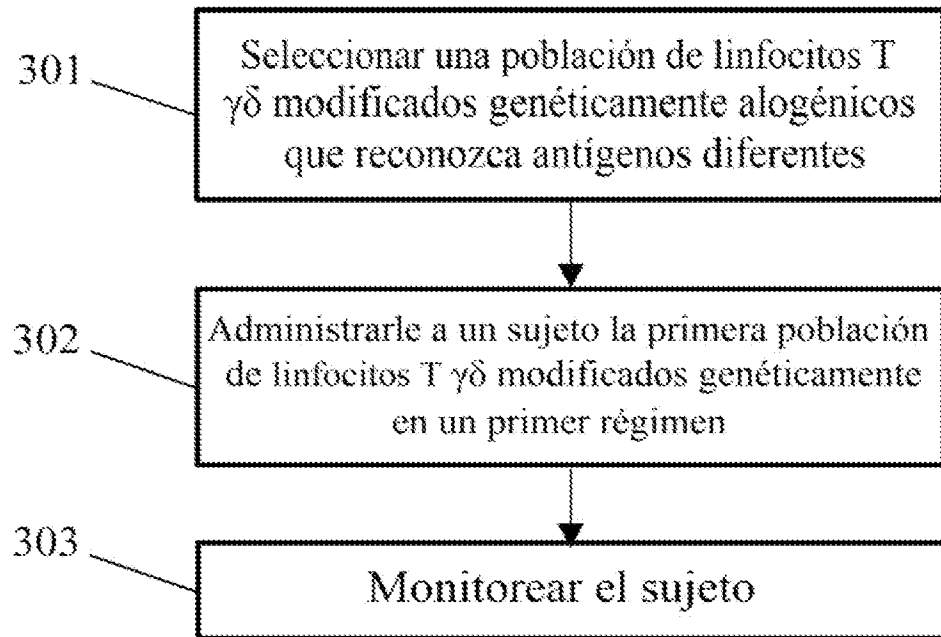


Fig. 3

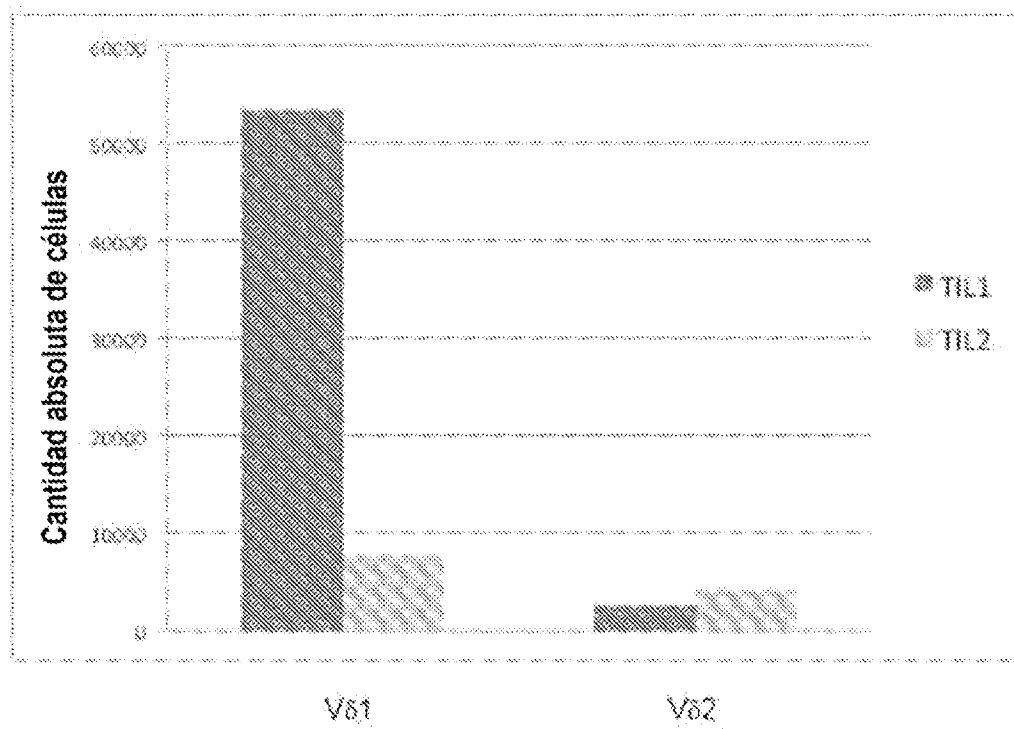


Fig. 4

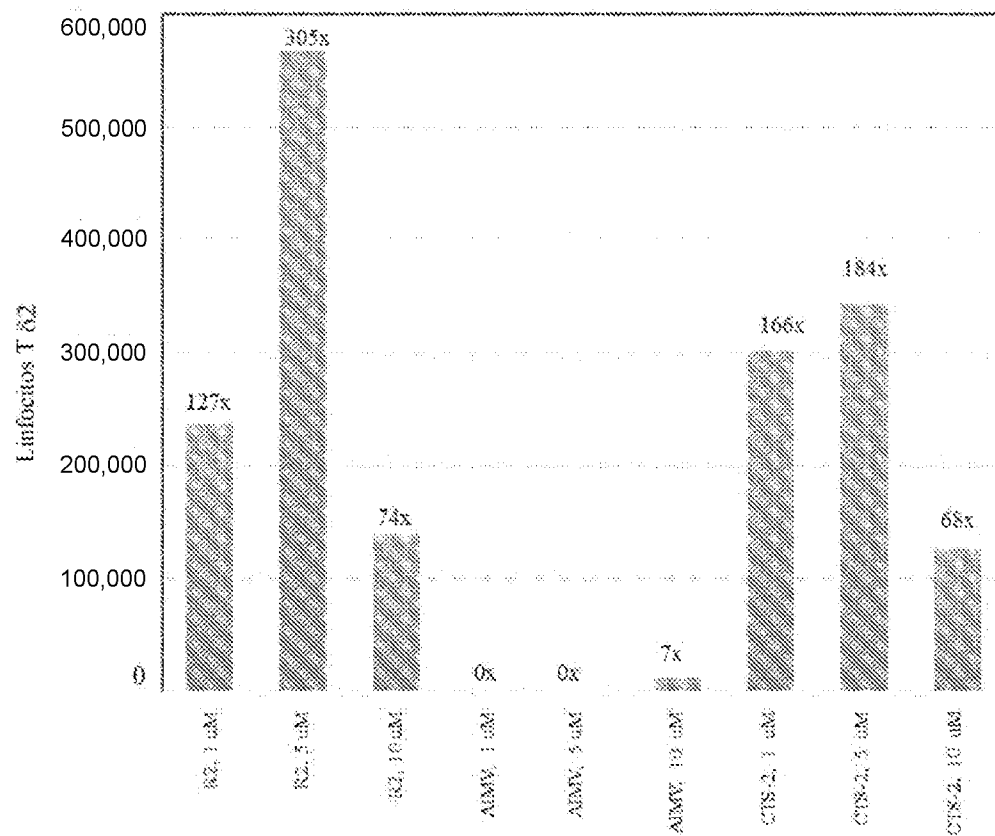
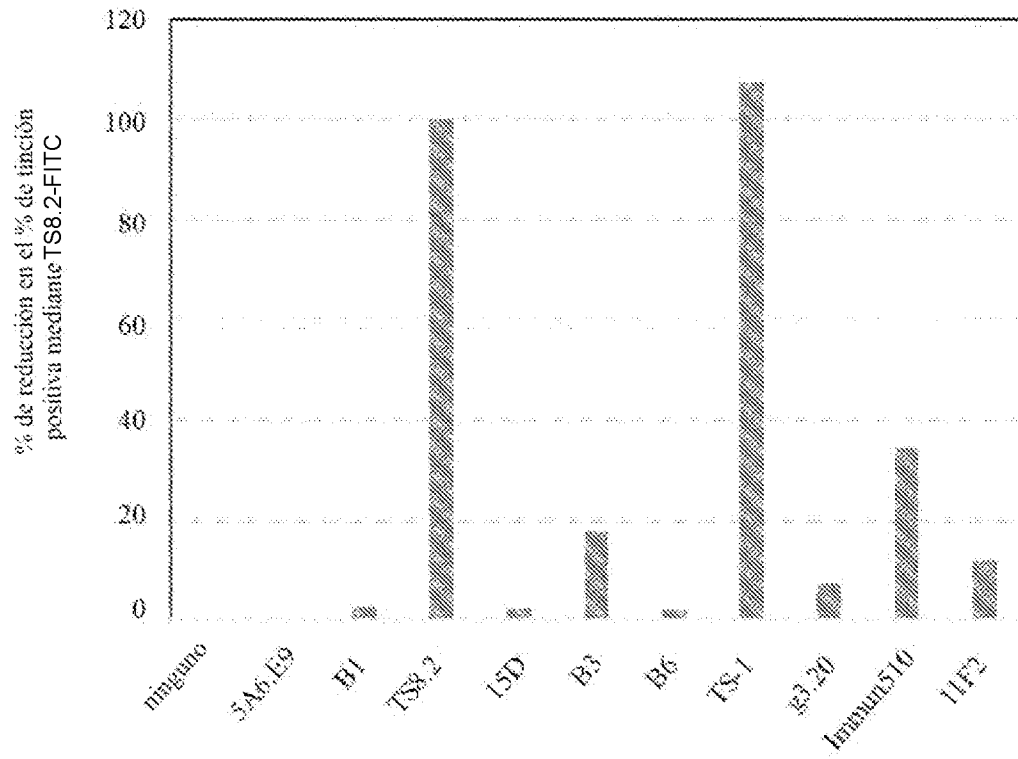


Fig. 5

Fig. 6



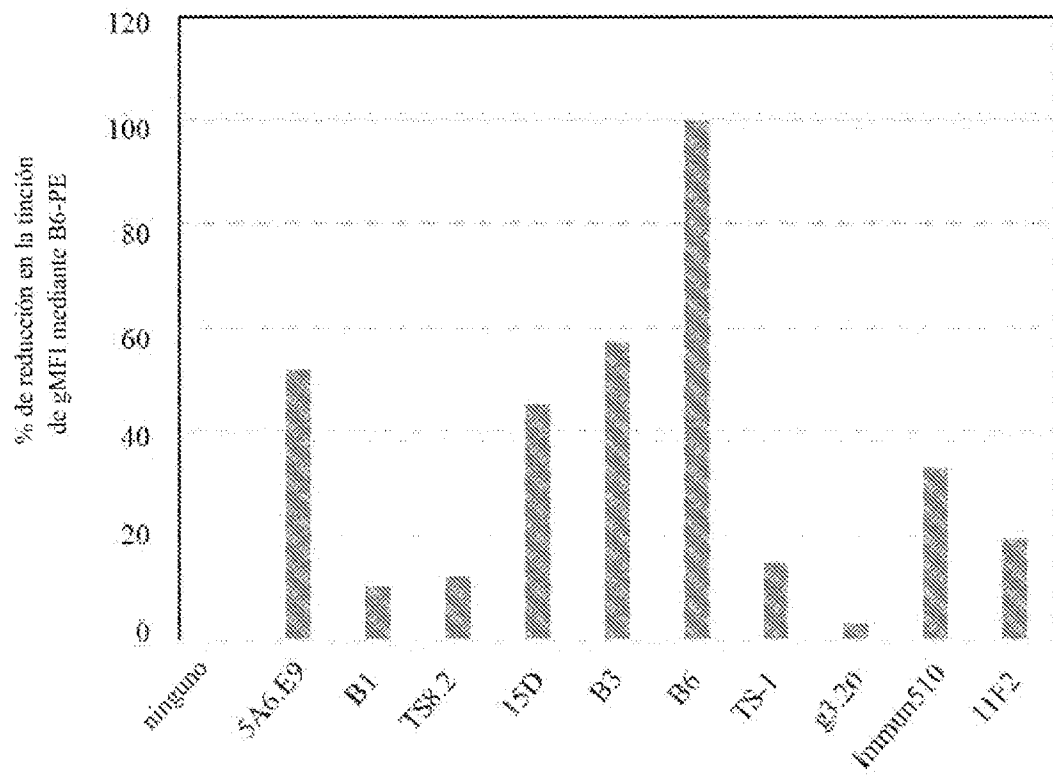


Fig. 7

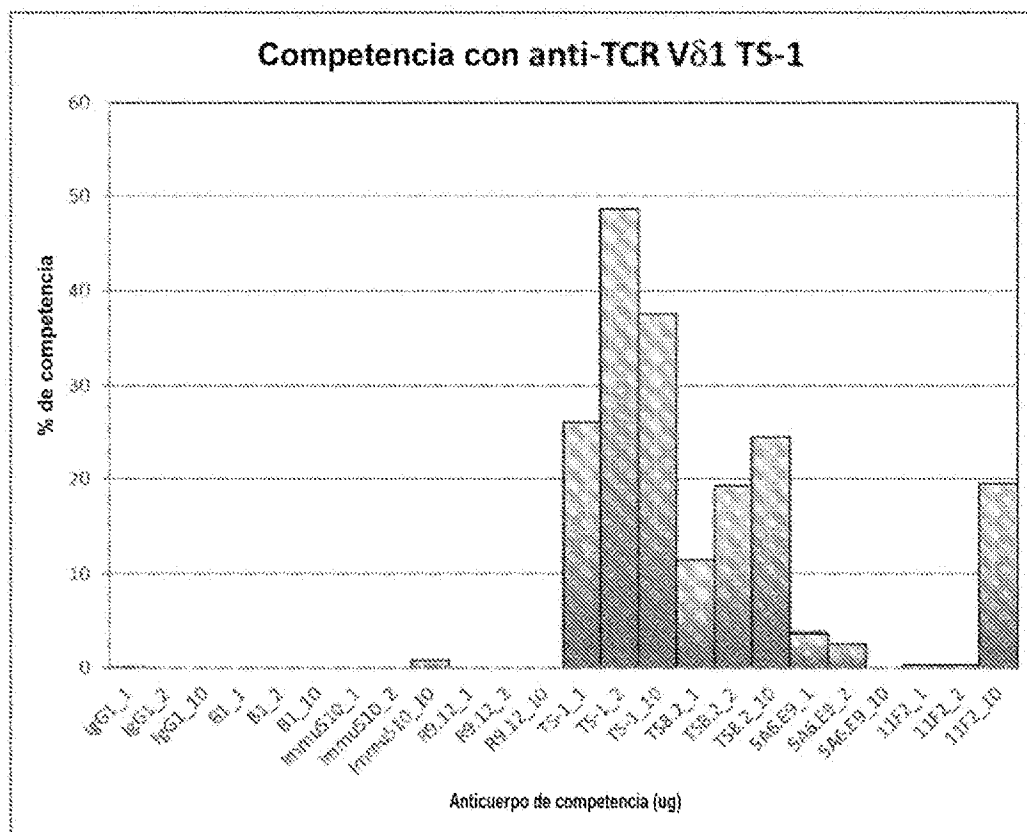


Fig. 8

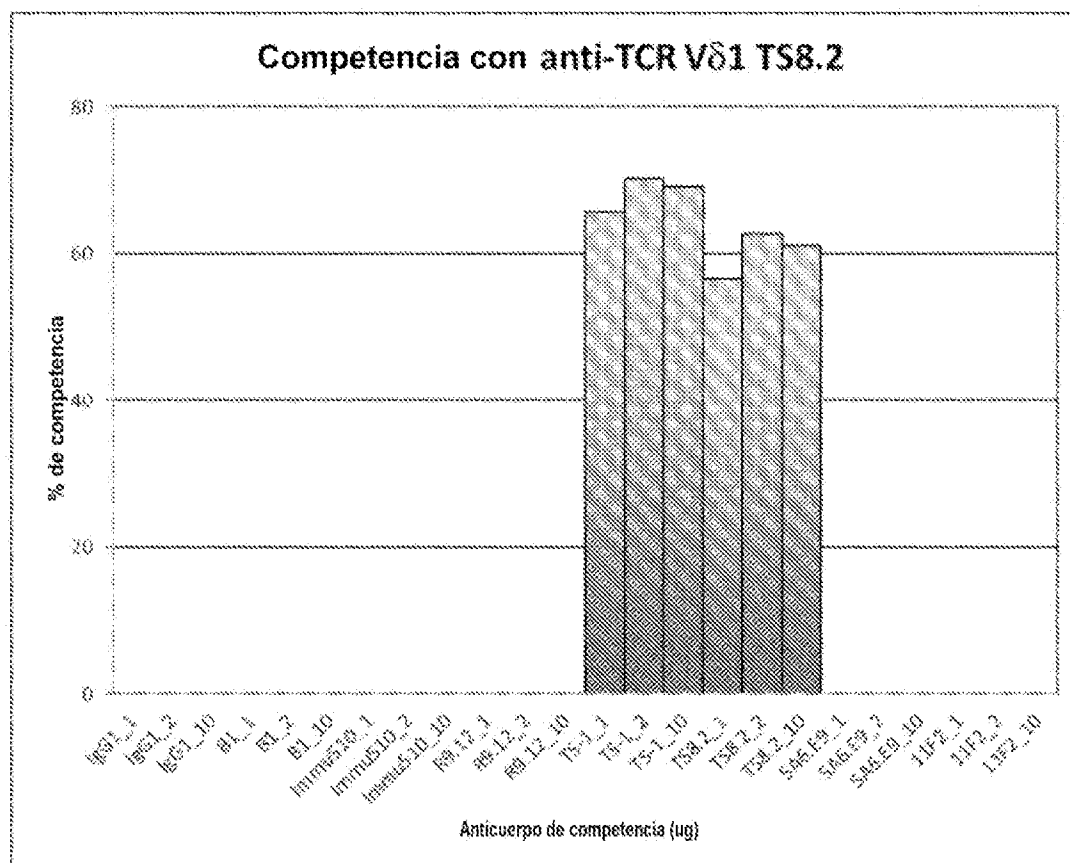


Fig. 9

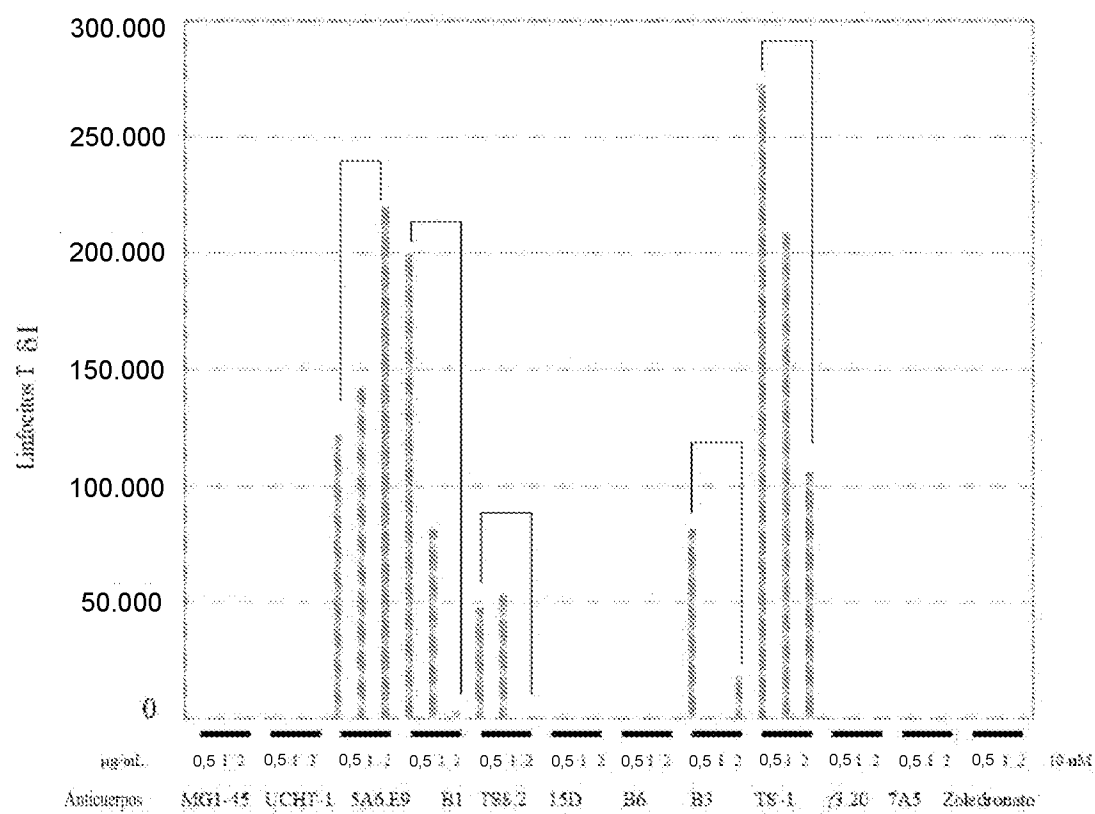


Fig. 10

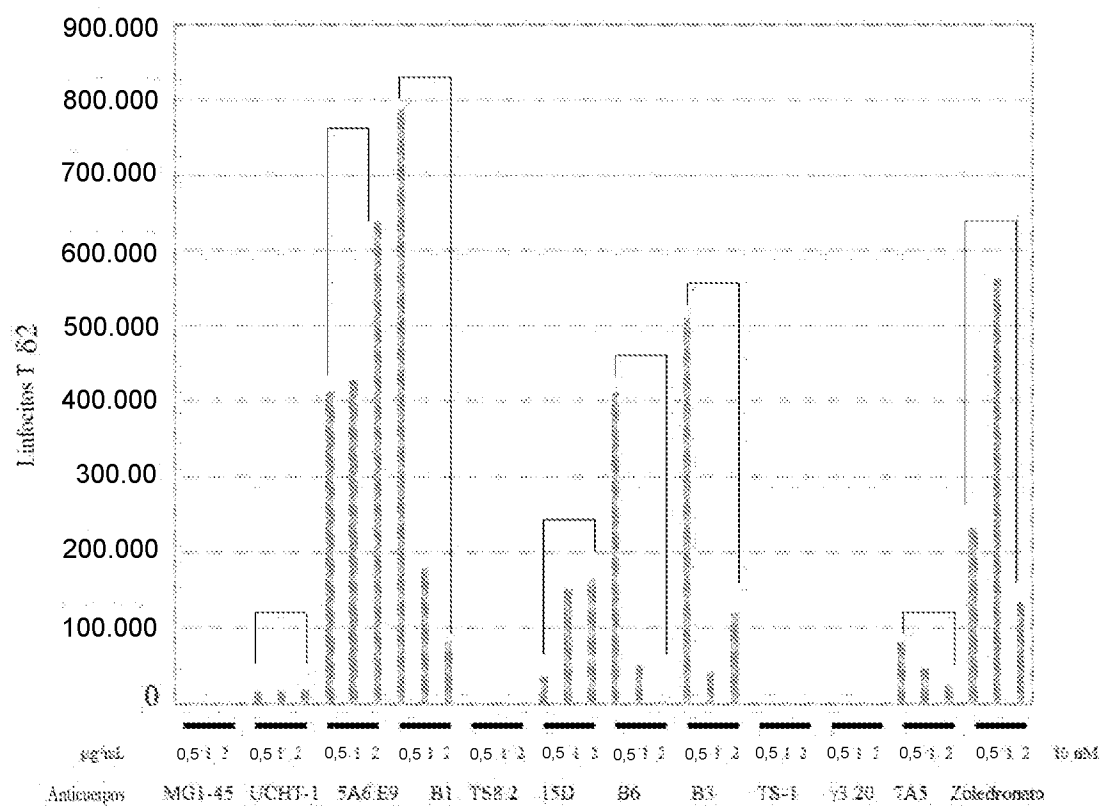


Fig. 11

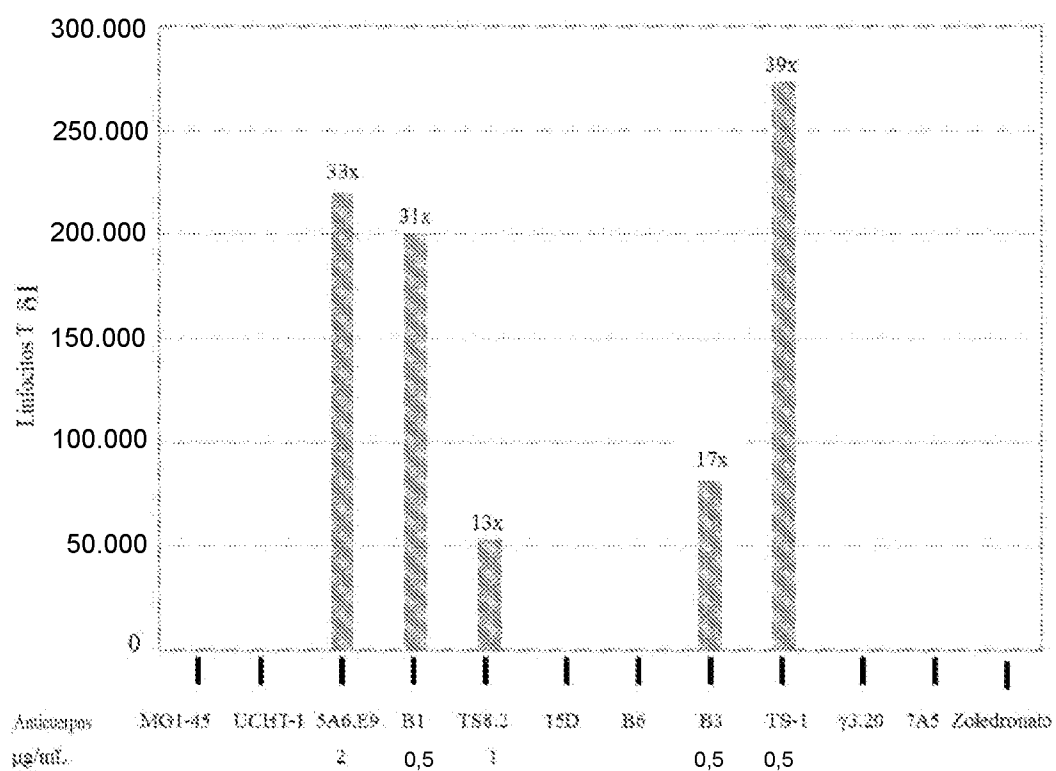


Fig. 12

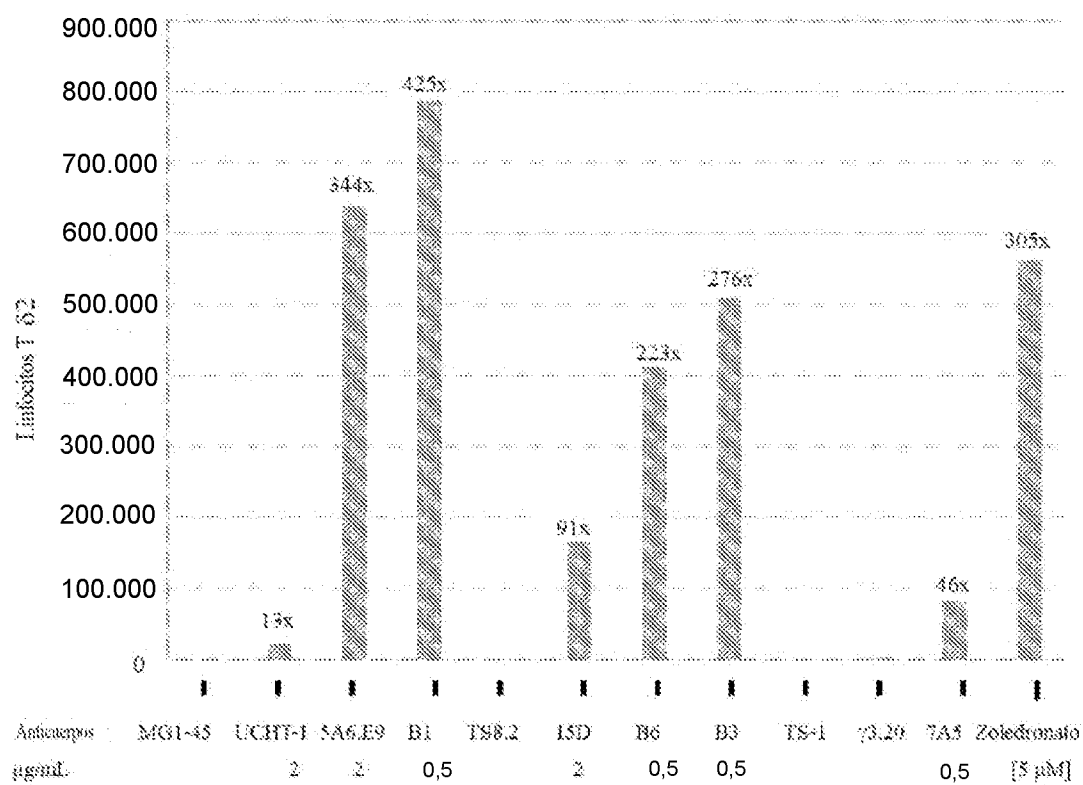


Fig. 13