

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 987 986**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2017 PCT/EP2017/064325**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2017 WO17212074**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2017 E 17732050 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024 EP 3469361**

(54) Título: **Nuevo método para identificar cadenas de receptores de células T delta (o células T gamma) o partes de estas que intervienen en una respuesta antitumoral o antiinfecciosa**

(30) Prioridad:

**10.06.2016 EP 16173970
10.06.2016 EP 16173986**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2024

(73) Titular/es:

**GADETA B.V. (50.0%)
Yalelaan 62
3584 CM Utrecht, NL y
ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG
(50.0%)**

(72) Inventor/es:

**KUBALL, JÜRGEN HERBERT ERNST;
JANSSEN, ANKE;
BERINGER, DENNIS;
FISCH, PAUL y
VILLACORTA HIDALGO, JOSE ALBERTO**

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

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

ES 2 987 986 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

Nuevo método para identificar cadenas de receptores de células T delta (o células T gamma) o partes de estas que intervienen en una respuesta antitumoral o antiinfecciosa

- 5 [0001] La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. La presente invención se refiere a un método para identificar cadenas de receptores de células T δ (o células T γ) o partes de estas que intervienen en una respuesta antitumoral o antiinfecciosa identificando secuencias de aminoácidos que comprenden cadenas de receptores de células T δ (o células T γ) o partes de estas que se comparten entre diferentes donantes.

Antecedentes de la invención

- 10 [0002] Nuestro sistema inmunitario utiliza diferentes líneas de defensa para protegernos de las infecciones, así como del cáncer. Para cubrir la magnitud de potenciales invasores y amenazas internas, nuestro sistema inmunitario adaptativo tiene la posibilidad de presentar hasta 10^{16} combinaciones de TCR αβ, así como 10^{11} variaciones de inmunoglobulinas (1). Aunque las amenazas suelen ser idénticas y muchos tipos de HLA se comparten entre individuos, hasta ahora solo se ha constatado un poco de coincidencia en el uso de regiones CDR3 definidas en las 15 cadenas de TCR α y β entre individuos. Las "especificidades privadas", es decir, las TCR α y β con secuencias muy distintas, que solo se observan en un individuo, suelen ser dominantes (2). Ocasionalmente, también se observan especificidades públicas. Estas consisten en secuencias de TCR β muy compartidas y solo se observan en presencia del mismo complejo de péptido y CPH en el contexto de infecciones crónicas tales como VEB, CMV, gripe o 20 respuestas inmunitarias alorreactivas (3, 4). Los análisis de la diversidad de las respuestas de inmunoglobulina implican una diversidad similar y uso aleatorio de secuencias de CDR3. Aunque se observa una correlación 25 aumentada en los usos de los segmentos génicos de anticuerpos, características de unión y tasas de mutación en gemelos, los conjuntos de anticuerpos muestran poca similitud en las respuestas clonales a estímulos agudos contra el mismo antígeno (5). Estos datos sugieren que las respuestas inmunitarias protectoras normalmente no se 30 comparten en detalle en secuencias entre diferentes individuos en el muy diverso repertorio de TCR αβ e inmunoglobulina. En consecuencia, cada individuo tiene que presentar su propio conjunto de cadenas de TCR tanto α como β e inmunoglobulinas. Por lo tanto, los análisis de secuencias por sí solos no permitirán la identificación de secuencias con gran interés terapéutico. Esto también se refleja en el hecho de que las cadenas protectoras de TCR tanto α como β (6) e inmunoglobulinas, que se usan actualmente en la clínica, se identifican normalmente mediante 35 análisis funcionales seguidos de análisis de secuencia, y no al contrario.

- 35 [0003] Entre todas las cadenas de receptores inmunitarios, los TCR δ tienen incluso la mayor diversidad potencial en el bucle de CDR3 (aproximadamente 10^{16} combinaciones para TCR δ murino) debido a la presencia de múltiples 40 segmentos génicos D (dos en ratones, tres en humanos y hasta cinco en ganado vacuno) que pueden unirse entre sí. Cada segmento genético D puede leerse en los tres marcos de lectura abiertos, y pueden insertarse N nucleótidos en las uniones de los segmentos de unión. Por tanto, a pesar de la diversidad limitada en las uniones VJ de las 45 cadenas de TCR γ, la diversidad potencial generada en las uniones de CDR3 combinadas (aproximadamente 10^{18} combinaciones) es aún mayor que la de TCR αβ (~ 10^{16}) y las inmunoglobulinas (~ 10^{11}). (1) Esto sugiere también un uso muy diverso de regiones CDR3 para cadenas de TCR δ en cada individuo y, de nuevo, se corresponde con consideraciones mencionadas para el uso de cadenas de TCR αβ o inmunoglobulinas, según las cuales el análisis de secuencias por sí solo no dará como resultado la identificación de cadenas de TCR δ terapéuticamente relevantes.

- 50 [0004] En los documentos CN102532269A y CN105296431A se describe GTM, una cadena del receptor de células T δ1 aislada de linfocitos infiltrantes de tumores en pacientes humanos con cáncer gástrico, un receptor de células T (TCR) que comprende la cadena, y células transfectadas con TCR. Pauza et al. (2015) Immunology 296(1):22-30 describen que la selección y amplificación de receptores de células T públicos son pasos importantes en el desarrollo de un repertorio de TCR anticipatorio. Xu et al. (2007) Molecular Immunology 44(4):302-310 describen que la Ig de injerto CDR3 delta puede mostrar una especificidad de unión similar a células SKOV3 o HO8910 con péptidos promotores de CDR3 delta.

- 55 [0005] Sorprendentemente, los inventores han sido capaces de identificar cadenas de receptores de células T δ (o células T γ) compartidas o partes de estas que intervienen en una respuesta antitumoral o antiinfecciosa.

Descripción de las figuras

- 60 [0006]

- Figura 1.** Corrección de clones únicos para los identificadores moleculares únicos (UMI) superpuestos. Se muestra la relación entre el porcentaje de clones únicos superpuestos frente al porcentaje de UMI superpuestos basados en tres donantes sanos (HD 18 19 20).
- Figura 2.** Frecuencia de clones superpuestos cuando se corrigen los UMI y tamaño de repertorio. La relación entre el porcentaje de clones únicos superpuestos frente al porcentaje de UMI superpuestos dividida por el tamaño medio del repertorio se muestra en una escala logarítmica. Los datos se basan en tres donantes sanos (HD 18 19 20)
- Figura 3.** Comparación de los resultados de secuenciación de NGS (aminoácidos) de las cadenas de TCR δ de 4 donantes diferentes y el 7º donante virtual como se indica en un diagrama de Venn. Están representados el donante sano 18, 19, 20, el "donante combinado" (HD 11, 12, 15) y el 7º donante virtual.
- Figura 4.** El TCR γδ FE11 depende críticamente del co-receptor CD8 para el reconocimiento de tumores. (A) Se generó el clon de células T γδ FE11 mediante dilución limitante. Para evaluar la reactividad tumoral, se incubaron células FE11 con dianas tumorales Daudi, SW480 o EBV-LCL en presencia de anticuerpo de control o anticuerpos que bloquean CD8α o CD8β. La secreción de IFNy se midió mediante ELISPOT. Las PBMC sanas sirvieron como dianas de control negativo. (B) Las cadenas γ y δ de TCR del clon FE11 se secuenciaron y transdijeron retrovíricamente en células T qβ (panel izquierdo; se indica la expresión de TCR γδ en células T transducidas de manera simulada (curva ligera) y transducidas con TCR γδ). La transferencia de reactividad tumoral mediada por TCR γδ se evaluó coincubando células T transducidas con TCR γδ o de manera simulada con células diana indicadas en un ELISPOT de IFNy (panel derecho). (C) Se clasificaron células T αβ CD4+ y CD8+ transducidas con el TCR γδ FE11 y se cocultivaron con las células diana indicadas. La activación de las células T se evaluó mediante ELISPOT de IFNy. (D) Las células T qβ CD4+ y CD8+ que expresan el TCR γδ FE11 se coincubaron con células diana SW480 como en (C), pero esta vez en presencia de un anticuerpo de control o anticuerpos de bloqueo contra CD8α o CD8β. Los datos son representativos de tres (A, D), dos (B) y cinco (C) experimentos separados. Las barras de error representan el E.E.M. (*P < 0,01; ***P < 0,001).
- Figura 5.** Resumen de las secuencias compartidas de TCR δ y TCRβ. (A) Resumen de secuencias compartidas de TCR δ encontradas en donantes sanos (conjunto de datos 1). Las secuencias incluidas en los donantes sanos tenían todas una frecuencia clonal > 0,1 %. En el eje horizontal, el número de secuencias compartidas entre donantes. En el eje vertical, el porcentaje de secuencias compartidas del total de secuencias de esos dos donantes. (B) Resumen de las secuencias compartidas de TCRβ encontradas en donantes sanos. En el eje horizontal, el número de secuencias compartidas entre donantes. En el eje vertical, el porcentaje de secuencias compartidas del total de secuencias de esos dos donantes. (C) Resumen de secuencias de Vδ2 compartidas entre los diferentes conjuntos de datos. En el eje horizontal, el número de secuencias compartidas entre donantes. (D) Resumen de secuencias de Vδ1 compartidas entre los diferentes conjuntos de datos. En el eje horizontal, el número de secuencias compartidas entre donantes. (E) Resumen de secuencias Vδ3 compartidas entre los diferentes conjuntos de datos. En el eje horizontal, el número de secuencias compartidas entre donantes.
- Figura 6.** Distribución del gen Vδ (A) La mayoría de las secuencias de TCR δ identificadas por NGS en la sangre periférica son de células T γδ Vδ2. Se muestran las frecuencias y la mediana de la distribución del gen Vδ en 14 donantes sanos.
- Figura 7.** Las células T γδ activadas están en contacto con las células positivas para tumores apoptóticos. (A) Inmunohistoquímica doble usando anticuerpo TCR γ y caspasa 3 escindida (las áreas con células T doble positivas se indican con un círculo). T en estas imágenes indica tejido tumoral (B) Análisis de TIL γδ en sección congelada de TNBC con CD69 como marcador de activación. La flecha muestra las células positivas, los núcleos están teñidos con azul DAPI.
- Figura 8.** Secuencias compartidas de TCR δ y TCR γ y de TIL γδ. Resumen de las secuencias compartidas de (A) TCR δ y (B) TCR γ y encontradas en muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama triple negativo. A la derecha, se muestran las secuencias identificadas totales y las secuencias únicas por paciente. A la izquierda, el solapamiento entre pacientes se representa por los números de la tabla.
- Figura 9.** Actividad antitumoral mejorada de TEG001 en comparación con una población masiva de linfocitos T Vy9Vδ2. Un panel de líneas celulares tumorales (A) o muestras tumorales de LMA primaria (B) se incubó con TEG001 o con una población de células T γδ primarias con o sin pamidronato (PAM) 10 pM durante 20 h y se midió la secreción de IFNy mediante ELISPOT. Se muestran las manchas de IFNy por 15000 células T como media de triplicados (+DE). Las significaciones estadísticas se calcularon mediante anova bidireccional; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.
- Figura 10.** Clones de células T γδ y TEG con cadenas de TCR γ o δ compartidas. (A) Los clones de Vδ1 aislados del repertorio periférico y las TEG modificadas genéticamente con cadenas de TCR δ compartidas muestran reactividad contra diferentes líneas celulares tumorales. Se probaron clones de células T Vδ2^{neg}γδ de un donante sano frente a un amplio panel de líneas celulares tumorales mediante un ensayo ELISPOT. La reactividad de Fe11 en formato TEG (TEG-011) se midió por ELISA. ^ indica la cadena Vdelta1 compartida con D13 y D19. (B) Las TEG modificadas genéticamente con cadenas de TCR γ o δ compartidas aisladas de TIL γδ muestran reactividad contra líneas celulares tumorales. La reactividad medida hacia líneas celulares tumorales

de TCR TIL $\gamma\delta$ en formato TEG se midió mediante ELISPOT. \$ Indica la secuencia compartida V γ 4 publicada por Lafarge et al. (51). % Indica la secuencia compartida V δ 5 dentro de los TIL $\gamma\delta$ y también publicada por Lafarge et al (51), & Indica la secuencia de cadenas de TCR y publicada por Uldrich et al. (32). ! Indica la secuencia de V γ 8 compartida. § indica la secuencia de V γ 2 compartida. ¶ indica la secuencia de V γ 4 compartida. θ Indica V61 compartido dentro de TIL $\gamma\delta$.

Figura 11. Inhibición del crecimiento tumoral y supervivencia global aumentada en ratones con tumores tratados con TEG001. Se trataron ratones NSG con TEG001 (n=17) o células simuladas (TEG-LM1, n=7) el día 7 y el día 14 después del injerto del tumor. (A) Se usó adquisición de imágenes de bioluminiscencia para monitorizar el crecimiento tumoral cada 7 días. Los datos representan la media de todos los ratones por grupo (+/-EEM). (B) Se monitorizó la supervivencia global de los ratones tratados hasta el final del experimento y se presenta en el panel derecho. Las significaciones estadísticas se calcularon mediante la prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox); ***p<0,0001.

Figura 12. Tinción de tetrámeros de TEG-AU2.3 (específicos para CD1d) y TEG-B9.

15 Descripción de la invención

Método

[0007] En un primer aspecto, la invención proporciona un método para identificar cadenas de receptores de células T δ o partes de estas que intervienen en una respuesta antitumoral o antiinfecciosa que comprende los pasos de:

- a) proporcionar secuencias de aminoácidos obtenidas de al menos 2 donantes diferentes, donde al menos un donante está sano, que comprenden cadenas de receptores de células T δ o partes de estas, comprendiendo cada una de dichas cadenas de receptores o partes de estas una región CDR3;
- b) identificar secuencias de aminoácidos que comprenden cadenas de receptores de células T δ o partes de estas obtenidas en el paso a) que se comparten entre diferentes donantes, donde dichas secuencias compartidas están comprendidas dentro de dicha región CDR3 o comprenden dicha región CDR3 o consisten en dicha cadena del receptor;
- c) confirmar la respuesta antitumoral o antiinfecciosa de las cadenas de receptores de células T δ o partes de estas identificadas en el paso b) evaluando la respuesta antitumoral o antiinfecciosa de una célula T $\alpha\beta$ o una célula NK que expresa una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos proporcionada en el paso a).

[0008] En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para identificar cadenas de receptores de células T γ o partes de estas que intervienen en una respuesta antitumoral o antiinfecciosa que comprende los pasos de:

- a) proporcionar secuencias de aminoácidos obtenidas de al menos 2 donantes diferentes, donde al menos un donante está sano, que comprenden cadenas de receptores de células T γ o partes de estas, comprendiendo cada una de dichas cadenas de receptores o partes de estas una región CDR3;
- b) identificar secuencias de aminoácidos que comprenden cadenas de receptores de células T γ o partes de estas obtenidas en el paso a) que se comparten entre diferentes donantes, donde dichas secuencias compartidas están comprendidas dentro de dicha región CDR3 o comprenden dicha región CDR3 o consisten en dicha cadena del receptor;
- c) confirmar la respuesta antitumoral o antiinfecciosa de las cadenas de receptores de células T γ o partes de estas identificadas en el paso b) evaluando la respuesta antitumoral o antiinfecciosa de una célula T $\alpha\beta$ o una célula NK que expresa una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos proporcionada en el paso a).

[0009] Por tanto, en un aspecto de la invención, se proporciona un método para identificar cadenas de receptores de células T δ o células T γ o partes de estas que intervienen en una respuesta antitumoral o antiinfecciosa que comprende los pasos de:

- a) proporcionar secuencias de aminoácidos obtenidas de al menos 2 donantes diferentes, donde al menos un donante está sano, que comprenden cadenas de receptores de células T δ o células T γ o partes de estas, comprendiendo cada una de dichas cadenas de receptores o partes de estas una región CDR3;
- b) identificar secuencias de aminoácidos que comprenden cadenas de receptores de células T δ o células T γ o partes de estas obtenidas en el paso a) que se comparten entre diferentes donantes, donde dichas secuencias compartidas están comprendidas dentro de dicha región CDR3 o comprenden dicha región CDR3 o consisten en dicha cadena del receptor;
- c) confirmar la respuesta antitumoral o antiinfecciosa de las cadenas de receptores de células T δ o células T γ o partes de estas identificadas en el paso b) evaluando la respuesta antitumoral o antiinfecciosa de una célula T

$\alpha\beta$ o una célula NK que expresa una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos proporcionada en el paso a).

5 [0010] A menos que se indique lo contrario en el presente documento, la explicación proporcionada para cada característica del método del primer aspecto a continuación también se mantiene para cada característica del método del segundo aspecto; la única diferencia es que el método del segundo aspecto trata de la identificación de cadenas de receptores de células T γ o partes de estas, mientras que el método del primer aspecto trata de la identificación de cadenas de receptores de células T δ o partes de estas.

10 Paso a del método del primer y segundo aspectos

[0011] El paso a) comprende la provisión de las secuencias de aminoácidos de un donante, que comprenden cadenas de receptores de células T δ (o células T γ para el método del segundo aspecto) o partes de estas que comprenden una región CDR3. En primer lugar, las células T o linfocitos T deben aislarse primero.

15 [0012] Las células T, o linfocitos T, pertenecen a un grupo de glóbulos blancos denominados linfocitos, que desempeñan un papel en la inmunidad mediada por células. Las células T se originan a partir de células madre hematopoyéticas de la médula ósea, maduran en el timo (de donde se deriva la T) y alcanzan su función completa en tejidos linfoideos periféricos. Durante el desarrollo de las células T, las células T CD4 $^+$ CD8 $^-$ (negativas tanto para el co-receptor CD4 como para CD8) tienen un destino $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ como resultado de una redispersión génica de TCR β o δ inicial. Las células que experimentan una redispersión temprana de la cadena β expresan una estructura de pre-TCR compuesta por una cadena β completa y una cadena de pre-TCR α en la superficie celular. Tales células cambian a un estado CD4 $^+$ CD8 $^+$, reorganizan el locus de la cadena de TCR α y expresan un TCR $\alpha\beta$ maduro en la superficie. Las células T CD4 $^+$ CD8 $^+$ que completan con éxito la transposición del gen y antes de la transposición del gen β expresan un TOP $\gamma\delta$ funcional y se mantienen como CD4 $^+$ CD8 $^+$. (Claudio Tripodo et al. Gamma delta T cell lymphomas Nature Reviews Clinical Oncology 6, 707-717 (diciembre de 2009)). El receptor de células T se asocia con el complejo proteico CD3. Las células T maduras, es decir, que expresan un TCR $\alpha\beta$ o un STCR γ , expresan el complejo receptor de células T sobre la superficie celular. Las células T $\gamma\delta$, que constituyen aproximadamente el 1-5 % de la población total de células T, pueden dividirse en subpoblaciones adicionales. Una subpoblación de células T $\gamma\delta$ constituye células T $\gamma\delta 2$, que expresan un TCR $\gamma\delta 2$. Dentro del dominio extracelular de un receptor de células T, se ubican tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2, CDR3). Estas regiones son en general los dominios más variables y contribuyen significativamente a la diversidad entre los TCR. Las regiones CDR se componen durante el desarrollo de una célula T donde los segmentos de los genes denominados variables (V), diversos (D) y de unión (J) se combinan aleatoriamente para generar diversos TCR. De las tres regiones CDR, la CDR3, tanto para las células T $\alpha\beta$ como para las células T $\gamma\delta$, es la más variable y, por lo tanto, es la pieza clave en el reconocimiento antigeno/ligando.

40 [0013] Las células T $\alpha\beta$ pueden definirse con respecto a la función como linfocitos T que expresan un TCR $\alpha\beta$, que reconocen péptidos unidos a moléculas del CPH (complejo principal de histocompatibilidad), que se expresan en la superficie de diversas células. Las moléculas del CPH presentan péptidos derivados de las proteínas de una célula. Cuando, por ejemplo, una célula se infecta con un virus, el CPH presentará péptidos virales, y la interacción entre el TCR $\alpha\beta$ de la célula T y el complejo de CPH de la célula diana (es decir, la célula infectada con el virus) activa tipos específicos de células T que inician y provocan respuestas inmunitarias para eliminar la célula infectada. Por lo tanto, las células T $\alpha\beta$ pueden definirse funcionalmente como células capaces de reconocer péptidos unidos a moléculas de CPH. Las células T $\alpha\beta$ pueden seleccionarse de la sangre periférica, por ejemplo, a través del antígeno CD3 como se describe a continuación y en los ejemplos, ya que la gran mayoría de las células T tienen TCR $\alpha\beta$. Las células T $\alpha\beta$ también pueden seleccionarse con un anticuerpo específico para TCR $\alpha\beta$, tal como se describe a continuación. De dichas células seleccionadas, la secuencia de ácido nucleico (o aminoácido) correspondiente a la cadena del receptor de células T α y la cadena del receptor de células T β puede determinarse mediante secuenciación, preferiblemente como se lleva a cabo en la parte experimental. Por lo tanto, las células T $\alpha\beta$ también se pueden definir como células que comprenden una secuencia de ácido nucleico (o de aminoácidos) correspondiente a la cadena del receptor de células T α y/o la cadena del receptor de células T β .

55 [0014] Las células T $\gamma\delta$ pueden definirse funcionalmente por el hecho de que se activan específica y rápidamente por, por ejemplo, un conjunto de precursores isoprenoides fosforilados no peptídicos, denominados colectivamente fosfoantígenos o señales de estrés mediadas por moléculas HLA no clásicas como CD1. Los fosfoantígenos son producidos por prácticamente todas las células vivas, aunque sus concentraciones suelen ser muy bajas en células sanas, y aumentan en células transformadas/malignas o células infectadas con, por ejemplo, mycobacterium tuberculosis, que suministran un derivado de fosfoantígenos. El fosfoantígeno más común encontrado en células humanas (incluyendo células cancerosas) es el pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). La activación de las células T $\gamma\delta$ comprende la expansión clonal, la actividad citotóxica y la

- expresión y liberación de citocinas. Las células T $\gamma\delta$ también se definen por la expresión del receptor de células T $\gamma\delta$. Por ejemplo, las células pueden seleccionarse usando un anticuerpo específico para el receptor de células T $\gamma\delta$ tal como se describe a continuación. De dichas células seleccionadas, la secuencia de ácido nucleico (o de aminoácidos) correspondiente a la cadena del receptor de células T γ y/o la cadena del receptor de células T δ puede determinarse mediante secuenciación, preferiblemente como se lleva a cabo en la parte experimental. Por lo tanto, las células T γ también se pueden definir como células que comprenden de forma natural una secuencia de ácido nucleico (o de aminoácidos) correspondiente a una cadena del receptor de células T γ y/o una cadena del receptor de células T δ .
- 5 [0015] El experto en la materia es capaz de seleccionar y/o identificar poblaciones celulares caracterizadas por la expresión de un antígeno o receptor en la superficie de la célula tal como se describe a lo largo de la presente memoria. Se entiende que, con respecto a la expresión en la superficie de células, tales como CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$ y STCR γ , esto se realiza típicamente en una población de células de las que una porción de células tiene un nivel mucho mayor de expresión del antígeno en comparación con células que tienen un nivel menor de expresión.
- 10 [0016] Por lo tanto, los términos positivo o negativo deben entenderse como relativos, es decir, las células positivas tienen un nivel de expresión mucho más alto en comparación con las células que son negativas. Las células que son negativas en este sentido aún pueden tener, por tanto, un nivel de expresión que puede detectarse.
- 15 [0017] La expresión en la superficie de las células puede analizarse usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), y en el mercado están disponibles muchos anticuerpos específicos, por ejemplo, tales como para CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$ y TOP $\gamma\delta$, que son adecuados para dicho análisis FACS, tal como se describe en los ejemplos y como está disponible. TOP $\gamma\delta$ puede ser TCR $\gamma 962$. Como ejemplo, las células T $\alpha\beta$ también pueden definirse y seleccionarse como positivas para TCR $\alpha\beta$ en FACS. Lo mismo sucede para las células T $\gamma\delta$. Los anticuerpos adecuados para FACS o técnicas de separación similares (tales como, por ejemplo, anticuerpos conjugados con perlas magnéticas) se pueden obtener con facilidad. Se seleccionan unas condiciones, tales como las proporcionadas por el fabricante de los anticuerpos, que permitan la selección de células negativas y/o positivas. Los ejemplos de anticuerpos que pueden ser adecuados para la selección de linfocitos T $\gamma\delta$, o linfocitos T $\gamma\delta$ modificados genéticamente o linfocitos T $\gamma 962$ o linfocitos T $\gamma 962$ modificados genéticamente, tales como los disponibles en BD Pharmingen (BD, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, NJ EE. UU.) son Vy9-PE (clon B3, #555733), V δ 2-FITC (clon B6, # 555738), TCR $\gamma\delta$ -APC (clon B1, #555718) o tales como los disponibles en Beckman Coulter es pan-TCR $\gamma\delta$ -PE (clon IMMU510, # IM 1418U). De manera similar, los anticuerpos adecuados para la selección de células T $\alpha\beta$, tales como anticuerpos anti-CD3, pueden ser los disponibles en BD Pharmingen, CD3-FITC (#345763) o anticuerpos anti-TCR $\alpha\beta$ tales como los disponibles en Beckman Coulter, pan-TCR $\alpha\beta$ -PE (#A39499) o pan-TCR $\alpha\beta$ -PCS (#A39500). Un anticuerpo alternativo que se une al receptor de células T $\alpha\beta$ endógeno humano está disponible en el mercado en Miltenyi (Miltenyi Biotec GmbH, Friedrich-Ebert-Straße 68, 51429 Bergisch Gladbach, Alemania). Este anticuerpo procede del clon celular BW242/412, que es del isotipo de ratón IgG2b. Un anticuerpo BW242/412 marcado con FITC está disponible en Miltenyi con el número de pedido 130-098-688. El clon celular BW242/412 y el anticuerpo expresado por BW242/412 se describe en detalle, entre otros, en el documento EP0403156B1.
- 20 [0018] Por consiguiente, en el método de la invención, primero se proporcionan células T $\alpha\beta$ o células NK. Las células T $\alpha\beta$ o células NK pueden ser células primarias, por ejemplo, de un sujeto, tal como se describe en los ejemplos para un sujeto humano. Las células T $\alpha\beta$ o las células NK pueden derivarse de un sujeto humano. Alternativamente, las células T $\alpha\beta$ o las células NK pueden ser células T $\alpha\beta$ o líneas celulares NK, tales como células SupT-1, Jurkat o Raji o cualquier otra línea celular disponible. Cualquier tipo de célula T $\alpha\beta$ o célula NK que sea una célula primaria o cualquier otra línea celular será suficiente, siempre que la población celular, o una parte sustancial de esta, exprese el receptor de células T, por ejemplo, que sea positiva para la célula T $\alpha\beta$ o el receptor TCR $\gamma\delta$ en una clasificación FACS o similar como se ha descrito anteriormente; tal población celular puede contemplarse.
- 25 [0019] Además, puede contemplarse cualquier célula T $\alpha\beta$ o célula NK o población celular que, cuando está provista de un TOP $\gamma\delta$ según la invención, sea capaz de formar un complejo TCR funcional y ejercer, por ejemplo, una respuesta citotóxica funcional y/o producción de citocinas. La célula que se proporciona también puede ser una célula progenitora, preferiblemente una célula progenitora sanguínea tal como un timocito o una célula madre de la sangre que, después de habersele proporcionado los estímulos correctos, puede desarrollarse en células T $\alpha\beta$ o células NK.
- 30 [0020] Preferiblemente, las células T $\alpha\beta$ o las células NK proporcionadas expresan o son capaces de expresar un TCR $\gamma\delta$. Las células T $\alpha\beta$ o las células NK pueden haber sido transducidas para expresar un TCR $\gamma\delta$ o ya expresan un TCR γ y han sido transducidas para expresar un TCR δ (o, respectivamente, ya expresan un TCR δ y han sido transducidas para expresar un TCR γ), comprendiendo las secuencias de ácido nucleico que codifican la secuencia obtenida en el paso a). Todas las combinaciones teóricas de una cadena γ con una cadena δ del TCR están incluidas. En una forma de realización, TCR $\gamma\delta$ es TCR $\gamma 962$. En otra forma de realización, TCR $\gamma\delta$ es TCR $\gamma 5\delta 1$. En

otra forma de realización, TCR $\gamma\delta$ es TCR $\gamma8\delta5$. En otra forma de realización, TOP $\gamma\delta$ es TCR $\gamma4\delta5$. En otra forma de realización, TOP $\gamma\delta$ es TCR $\gamma2\delta1$. En otra forma de realización, TOP $\gamma\delta$ es TCR $\gamma8\delta1$.

5 [0020] El paso a), que comprende "proporcionar secuencias de aminoácidos obtenidas de un donante, que comprende cadenas de receptores de células T δ o partes de estas, donde cada una de dichas cadenas de receptores o partes de estas comprenden una región CDR3" puede reemplazarse por "obtener, de una pluralidad de donantes, cadenas de receptores de células T δ , cadenas de receptores de células T γ o partes de estas, comprendiendo dichas cadenas de receptores o partes de estas una región CDR3, y determinar secuencias de aminoácidos de dichas cadenas de receptores o partes de estas o secuencias de ácido nucleico que las codifiquen".

10 10 [0021] En el paso a) se usan al menos dos donantes diferentes, de los que al menos un donante está sano. Esto es importante en el método de la invención, ya que se desea identificar cadenas de TCR δ (o TCR γ) o parte de estas que sean compartidas por diferentes donantes. Una cadena de TCR δ preferida es una cadena de TCR $\delta2$. Otra cadena de TCR δ preferida es una cadena de TCR $\delta1$. Otra cadena de TCR δ preferida es una cadena de TCR $\delta3$.

15 15 Otra cadena de TCR δ preferida es una cadena de TCR $\delta4$. Otra cadena de TCR $\delta5$ preferida es una cadena de TCR $\delta5$. Una cadena de TCR γ preferida es una cadena de TCR $\gamma2$. Otra cadena de TCR γ preferida es una cadena de TCR $\gamma4$. Otra cadena de TCR γ preferida es una cadena de TCR $\gamma5$. Otra cadena de TCR γ preferida es una cadena de TCR $\gamma8$. Otra cadena de TCR γ preferida es una cadena de TCR $\gamma9$.

20 20 [0022] En una forma de realización, un TCR $\gamma\delta$ es un TCR $\gamma9\delta2$. En otra forma de realización, el TOP $\gamma\delta$ es TCR $\gamma5\delta1$. En otra forma de realización, el TCR $\gamma\delta$ es TCR $\gamma9\delta4$. En otra forma de realización, el TCR $\gamma\delta$ es TCR $\gamma4\delta5$. En otra forma de realización, el TCR $\gamma\delta$ es TOR $\gamma8\delta5$. En otra forma de realización, el TOP $\gamma\delta$ es TCR $\gamma2\delta1$. En otra forma de realización, el TOP $\gamma\delta$ es TCR $\gamma8\delta1$. En otra forma de realización, el TOP $\gamma\delta$ es TCR $\gamma4\delta3$.

25 25 [0023] El número de donantes diferentes usados puede ser tan alto como sea posible. Se utilizan al menos 2 donantes diferentes. Sin embargo, se prefiere que se usen 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más donantes diferentes.

[0024] En el método de la invención, al menos uno de los donantes puede estar sano. Sin embargo, también se engloba que todos los donantes estén sanos.

30 30 [0025] En otra forma de realización, al menos uno de los donantes puede estar enfermo. Sin embargo, también se incluye un controlador de élite de una enfermedad. Significa que un donante puede no estar sano ni enfermo, sino haber padecido un cáncer o una infección y haber sido capaz de controlarlo. Los TCR de dicha infección "controlada" son de particular interés.

35 35 [0026] Una enfermedad en este contexto puede ser el cáncer o cualquier infección. La infección incluye infecciones inmediatas por virus, bacterias y hongos tales como el virus de la hepatitis, los virus del herpes (CMV, VEB y más) o una micobacteria.

40 40 [0027] En otra forma de realización, también se prevé que parte de los donantes estén sanos y que la parte restante de los donantes estén enfermos.

[0028] Un donante es preferiblemente un ser humano.

45 45 [0029] Por consiguiente, en una forma de realización preferida del paso a) del método de la invención:

- a. los donantes son seres humanos,
- b. todos los donantes están sanos y/o
- c. al menos un donante está enfermo.

50 50 Paso b del método del primer y segundo aspectos

[0030] El paso b) comprende la identificación de secuencias de aminoácidos que comprenden cadenas de receptores de células T δ (o células T γ) o partes de estas obtenidas en el paso a) que se comparten entre diferentes donantes.

55 55 [0031] Tales secuencias de aminoácidos se definen preferiblemente por el sistema de información InMunoGeneTics (<http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Nomenclature/IMGT-FRCDRdefinition.html>).

60 60 [0032] Debe entenderse que la expresión "cadenas de receptores de células T δ o partes de estas que se comparten entre diferentes donantes" significa que no es necesario que las "cadenas de receptores de células T" completas se comparten o sean idénticas entre diferentes donantes. Parte de dicha cadena puede compartirse o puede ser

idéntica entre diferentes donantes. En teoría, cada parte de un receptor de células T δ puede compartirse entre donantes. Lo mismo sucede para "cadenas de receptores de células T γ o partes de estas que se comparten entre diferentes donantes".

- 5 [0033] También se engloba que las partes que se comparten puedan no ser idénticas pero comprender sustituciones conservadoras de un aminoácido dado. Se proporciona una lista de aminoácidos que se consideran una sustitución conservadora de otro aminoácido en la parte general de la descripción dedicada a las definiciones bajo identidad/similitud. En el método de la invención, dicha parte compartida está comprendida dentro de una región CDR3 de una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) o comprende una región CDR3 de una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) o consiste en una cadena del receptor de células T δ (o células T γ). En otra forma de realización, dicha parte compartida es de 3 a 53 aminoácidos o de 5 y 40 o de 10 y 30. Más preferiblemente, dicha parte compartida está comprendida dentro de una región CDR3 de una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) y es de 3 a 53 aminoácidos.
- 10 [0034] Está claro que el número de donantes que comparten una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) o parte de esta depende del número de donantes usados en el paso a). En una forma de realización preferida, las secuencias identificadas se comparten entre al menos 2, 3, 4, 5 donantes diferentes.

15 Paso c del método del primer y segundo aspectos

- 20 [0035] El paso c) comprende la confirmación o validación de secuencias identificadas como compartidas en el paso b). Para validar la relevancia biológica de dicha secuencia, se determina la respuesta antitumoral o antiinfecciosa de una célula T αβ o una célula NK que expresa una molécula de ácido nucleico definida que codifica una secuencia de aminoácidos como se proporciona en el paso a). La célula T αβ o la célula NK pueden expresar ya una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) identificada como compartida en el paso b). Está claro que incluso si el paso b) ha llevado a la identificación de una parte de una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) que es compartida, para evaluar la relevancia biológica de la cadena del receptor de células T δ (o células T γ) correspondiente, una célula T αβ o célula NK se transduce con la cadena del receptor de células T δ (o células T γ) correspondiente que comprende la parte identificada en el paso b). En una forma de realización, se evalúa una respuesta antitumoral o antiinfecciosa de dicha secuencia en una célula T αβ o célula NK que no expresa endógenamente una cadena gamma o delta del TCR.

- 25 [0036] Las secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena del receptor de células T δ, preferiblemente la cadena del receptor de células T δ2, pueden introducirse en células T αβ o células NK para proporcionar una célula modificada genéticamente como se explica en la parte general de la descripción dedicada a las definiciones. Alternativamente, en el método del segundo aspecto, las secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena del receptor de células T γ, preferiblemente la cadena del receptor de células T γ9, pueden introducirse en células T αβ o células NK para proporcionar una célula modificada genéticamente como se explica en la parte general de la descripción dedicada a las definiciones.

- 30 [0037] Está claro para un experto que las células T αβ o células NK usadas también deben expresar una cadena del receptor de células T δ para evaluar la relevancia biológica de una cadena del receptor de células T δ. En otras palabras, un TOP γδ se expresa preferiblemente en dichas células T αβ o células NK, siendo el TCR δ el identificado en el método de la invención como compartido entre diferentes donantes.

- 35 [0038] En el método del segundo aspecto, también está claro para un experto en la materia que las células T αβ o células NK usadas también deben expresar una cadena del receptor de células T α para evaluar la relevancia biológica de una cadena del receptor de células T γ. En otras palabras, un TOP γδ se expresa preferiblemente en dichas células, siendo el TOP γ el identificado en el método de la invención como compartido entre diferentes donantes.

- 40 [0039] En una forma de realización preferida, la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena del receptor de células T δ (o células T γ) o parte de esta se proporciona en un vector de expresión o en un vector retroviral o lentiviral en una célula T αβ o célula NK. Esto se ha explicado ampliamente en la parte general de la descripción dedicada a las definiciones.

- 45 [0040] Las células T αβ o las células NK pueden expandirse antes o después de la transferencia de los ácidos nucleicos que codifican la cadena del receptor de células T δ y/o T γ. Preferiblemente, la expansión es después de la transferencia, de manera que la cantidad de ácidos nucleicos que es necesario transferir sea lo más baja posible. 50 Esta expansión de células T αβ o células NK se puede realizar mediante estimulación con Dynabeads anti-CD3/CD28 en presencia de IL-2. Las células expandidas que comprenden el receptor de células T γδ modificado por

- ingeniería genética pueden seleccionarse, por ejemplo, a través de un marcador seleccionable y pueden seleccionarse adicionalmente para la presencia del antígeno CD4 y el antígeno CD8, por ejemplo, usando el sistema de separación MACS como se describe en los ejemplos. Las células T $\alpha\beta$ o células NK modificadas genéticamente pueden expandirse más a posteriori usando el protocolo REP como se describe en Riddel y Greenberg, 1990 J Immunol Methods. 128(2): 189-201 o usando métodos de expansión adicionales similares a este. Brevemente, el método de expansión implica usar anticuerpos dirigidos contra moléculas de activación de células T $\alpha\beta$ o células NK, tales como TCR, CD3 y CD28 y/o células alimentadoras y/o citocinas estimuladoras.
- [0041] La respuesta antitumoral de la célula T $\alpha\beta$ o la célula NK proporcionada que expresa una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) puede evaluarse usando cualquier técnica conocida por los expertos. Una cadena del receptor de células T puede ser una cadena del receptor de células T $\delta 2$. Una cadena del receptor de células T γ puede ser una cadena del receptor de células T $\gamma 9$.
- [0042] En una forma de realización, el paso de determinar una respuesta o reactividad antitumoral comprende poner en contacto las células T $\alpha\beta$ o células NK con células tumorales. El paso de determinación de la reactividad antitumoral puede incluir cualquier ensayo en el que se pueda determinar un efecto antitumoral, tal como un efecto sobre la tasa de división celular tumoral, es decir, la velocidad con la que se dividen las células tumorales, la muerte celular, la unión a las células tumorales, la inducción de la producción de una citocina tal como IFNy, IL-2 o TNF α .
- [0043] Las células tumorales pueden ser cualquier tipo de células tumorales. Por ejemplo, células tumorales primarias de un paciente. Las células tumorales pueden ser células tumorales de líneas celulares, tales como las líneas celulares enumeradas en los ejemplos denominadas Daudi, RPMI8226/S, OPM2, LME1, K562, Saos2, MZ1851 RC, SCC9, Fadu, MDA-MB231, MCF7, BT549, SW480, que son ampliamente conocidas en la técnica. Las líneas celulares tumorales pueden obtenerse fácilmente de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia) y similares.
- [0044] En una forma de realización preferida, determinar las respuestas antitumorales incluye poner en contacto la célula T $\alpha\beta$ o la célula NK que expresa una molécula de ácido nucleico definida que codifica un aminoácido que comprende una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) identificada como compartida en el paso b) con una célula tumoral y medir su capacidad para lisar la célula tumoral y/o inducir la producción de una citocina tal como IFN- γ , IL-2 o TNF α . Este paso de puesta en contacto, cultivo o incubación puede tener una duración de 10 horas a 1, 2, 3, 4, 5 días. La capacidad para lisar las células tumorales incluye proporcionar una cantidad fija de células tumorales con las que se pone en contacto una célula T $\alpha\beta$ o una célula NK que expresa una molécula de ácido nucleico definida que codifica un aminoácido que comprende una cadena del receptor de células T α (o células T γ) identificada como compartida en el paso b) y, después de un periodo de incubación, contar el número de células tumorales viables. Una respuesta antitumoral puede haberse identificado o determinado cuando el número de células tumorales viables al final del paso de incubación es inferior al 90 %, inferior al 80 %, inferior al 70 %, inferior al 60 %, inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % del número de células tumorales iniciales al inicio del paso de incubación. Alternativamente, una respuesta antitumoral puede haberse identificado o determinado cuando el número de células tumorales viables al final del paso de incubación con las células T $\alpha\beta$ o células NK modificadas genéticamente es inferior al número de células tumorales al final de un paso de incubación similar con células de control no modificadas genéticamente con secuencias identificadas como compartidas. Inferior en este contexto puede significar al menos un 10 % inferior, al menos un 20 % inferior, al menos un 30 % inferior, al menos un 40 % inferior, al menos un 50 % inferior, al menos un 60 % inferior, al menos un 70 % inferior, al menos un 80 % inferior, al menos un 90 % inferior.
- [0045] Además, o como alternativa al recuento del número de células tumorales viables al final del paso de incubación, también se puede llevar a cabo un ensayo de liberación de cromo⁵¹, que es conocido por los expertos. La cantidad de cromo⁵¹ liberado es una medida del número de células que se han lisado.
- [0046] De manera similar, la producción de una citocina tal como IFN- γ , IL-2 o TNF α o la secreción o la expresión de marcadores de activación también puede determinarse, por ejemplo, mediante tinción de anticuerpos, ELISA y/o PCR cuantitativa para el ARNm expresado. Los ensayos para determinar la producción de una citocina tal como IFN- γ , IL-2 o TNF α están disponibles en el mercado. Cuando se detecta la producción de una citocina tal como IL-2, TNF α o IFNy al final del paso de contacto, se dice que la célula T $\alpha\beta$ o la célula NK que expresa una molécula de ácido nucleico definida que codifica un aminoácido que comprende una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) identificada como compartida en el paso b) muestra una respuesta antitumoral. Alternativa y preferiblemente, cuando la cantidad de IFNy, IL-2 o TNF α producida al final del paso de contacto con células modificadas es superior (preferiblemente al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 100 % o más) a la cantidad de IFNy, IL-2 o TNF α producida cuando las células tumorales se ponen en contacto con células de control, se dice que

la célula muestra una respuesta antitumoral. Las células T $\alpha\beta$ o las células NK de control no expresan una molécula de ácido nucleico definida que codifica un aminoácido que comprende una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) identificada como compartida en el paso b).

- 5 [0047] También se puede determinar una respuesta antitumoral evaluando la unión de las células T $\alpha\beta$ o células NK modificadas a la célula tumoral al final del paso de incubación. Cuando se detecta la unión de la célula que expresa una molécula de ácido nucleico definida que codifica un aminoácido que comprende una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) identificada como compartida en el paso b) a la célula tumoral al final del paso de contacto, se dice que la célula que expresa una molécula de ácido nucleico definida que codifica un aminoácido que comprende una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) identificada como compartida en el paso b) muestra una respuesta antitumoral. Alternativa y preferiblemente, cuando la unión de la célula que expresa una molécula de ácido nucleico definida que codifica un aminoácido que comprende una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) identificada como compartida en el paso b) al final del paso de contacto es superior (preferiblemente al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos un 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 100 % o más) a la unión de células de control (véase la definición anterior) a la misma célula tumoral, se dice que la célula muestra una respuesta antitumoral.

[0048] El paso de contacto se puede llevar a cabo en presencia de un fosfoantígeno, tal como pamidronato.

- 20 [0049] En un método preferido, el paso de confirmar la respuesta antitumoral comprende poner en contacto la célula T $\alpha\beta$ o la célula NK que expresa una molécula de ácido nucleico definida que codifica un aminoácido que comprende una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) identificada como compartida en el paso b) con una célula tumoral y medir su capacidad para lisar la célula tumoral y/o inducir una citocina tal como IFN- γ , IL-2 o TNF α .

- 25 [0050] En una forma de realización preferida, determinar las respuestas antiinfección incluye poner en contacto la célula T $\alpha\beta$ o la célula NK que expresa una molécula de ácido nucleico definida que codifica un aminoácido que comprende una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) identificada como compartida en el paso b) con el agente infeccioso o células infecciosas que comprenden el agente infeccioso y medir su capacidad para matar el agente infeccioso o células infecciosas que comprenden el agente infeccioso y/o inducir la producción de una citocina tal como IFN- γ , IL-2 o TNF α . Este paso de puesta en contacto, cultivo o incubación puede tener una duración de 10 horas a 1, 2, 3, 4, 5 días. La capacidad para matar el agente infeccioso o las células que comprenden el agente infeccioso incluye proporcionar una cantidad fija de agente infeccioso o células que comprenden el agente infeccioso o inducir indirectamente una expresión de una señal de peligro natural en la superficie celular por el agente infeccioso con el que la célula T $\alpha\beta$ o la célula NK que expresa un TOP y δ como se ha explicado anteriormente en el presente documento (o una célula T $\alpha\beta$ o una célula NK que expresa una molécula de ácido nucleico definida que codifica un aminoácido que comprende una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) identificada como compartida en el paso b)), se pone en contacto y después de un periodo de incubación se cuenta el número de agente infeccioso vivo o células que comprenden el agente infeccioso.

- 40 [0051] Una respuesta antiinfecciosa puede haberse identificado o determinado cuando el número de agentes infecciosos o células que comprenden el agente infeccioso al final del paso de incubación es inferior al 90 %, inferior al 80 %, inferior al 70 %, inferior al 60 %, inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % del número de agentes infecciosos o células que comprenden el agente infeccioso iniciales al inicio del paso de incubación.

- 45 [0052] Alternativamente, una respuesta antiinfecciosa puede haberse identificado o determinado cuando el número de agentes infecciosos o células que comprenden el agente infeccioso viables al final del paso de incubación con las células es inferior al número de agentes infecciosos o células que comprenden el agente infeccioso al final de un paso de incubación similar con células de control (definidas anteriormente en el presente documento). Inferior en este contexto puede significar al menos un 10 % inferior, al menos un 20 % inferior, al menos un 30 % inferior, al menos un 40 % inferior, al menos un 50 % inferior, al menos un 60 % inferior, al menos un 70 % inferior, al menos un 80 % inferior, al menos un 90 % inferior.

- 55 [0053] En un método preferido, el paso de confirmación de la respuesta antiinfecciosa comprende poner en contacto la célula T $\alpha\beta$ o la célula NK que expresa una molécula de ácido nucleico definida que codifica un aminoácido que comprende una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) identificada como compartida en el paso b) con un agente infeccioso o células que comprenden el agente infeccioso y medir su capacidad para matar el agente infeccioso o células que comprenden el agente infeccioso y/o inducir una citocina tal como IFN- γ , IL-2 o TNF α .

- 60 Cadena del receptor de células T δ o una parte de esta en general

[0054] En aspectos útiles para entender la divulgación, en el presente documento se describen polipéptidos que comprenden una cadena del receptor de células T δ o una variante o porción funcional de esta. En un aspecto adicional, la invención proporciona una cadena del receptor de células T δ o una parte de esta, que comprende una región CDR3, y donde dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta está representada por una secuencia de aminoácidos como se define en el paso 1c) del método de la invención y que se puede obtener mediante el método de la invención. Cada una de estas cadenas del receptor de células T δ o parte de las mismas está representada por una secuencia de aminoácidos que podría identificarse usando una SEQ ID NO. En algunos casos, una cadena del receptor de células T δ es una cadena del receptor de células T δ2. En otros casos, una cadena del receptor de células T δ es una cadena del receptor de células T δ1 o una cadena del receptor de células T δ4.

10 Cadena del receptor de células T y o una parte de esta en general

[0055] En aspectos útiles para entender la divulgación, en el presente documento se describen polipéptidos que comprenden una cadena del receptor de células T y o una variante o porción funcional de esta. En un aspecto adicional, la invención proporciona una cadena del receptor de células T y o una parte de esta, que comprende una región CDR3, y donde dicha cadena del receptor de células T y o parte de esta está representada por una secuencia de aminoácidos como se define en el paso 1c) del método de la invención y que se puede obtener por el método de la invención. Cada una de estas cadenas del receptor de células T y o parte de las mismas está representada por una secuencia de aminoácidos que podría identificarse usando una SEQ ID NO. En algunos casos, una cadena del receptor de células T y es una cadena del receptor de células T γ9 o una cadena del receptor de células T γ5.

[0056] Cada una de la cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3 identificada en el presente documento también puede representarse por su secuencia de ácido nucleico codificante en lugar de su secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, la divulgación también se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica dicha cadena del receptor o parte de esta. Lo mismo se aplica a cada una de la cadena del receptor de células T y o parte de esta que comprende una región CDR3 identificada en el presente documento. Lo mismo también se aplica al TCR identificado en el presente documento: puede identificarse por las cadenas de receptores que expresa o por las moléculas de ácido nucleico que codifican estas cadenas que comprende. Lo mismo también se aplica a la célula T que expresa dicho TCR: la célula T puede definirse por referencia a las cadenas de receptores o partes de estas que expresa o por las moléculas de ácido nucleico que codifican estas cadenas o partes de estas que comprende.

Cadena del receptor de células T δ o células T y o parte de esta preferida

35 [0057] En ciertos aspectos descritos en el presente documento se proporcionan polipéptidos que comprenden una CDR del receptor de células T δ o una variante o porción funcional de esta que se pueden obtener mediante el método de la invención.

40 [0058] En otra forma de realización preferida, se proporciona una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 y/o 17 y/o 96.

45 [0059] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 50 y/o 62 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 50 y/o 62.

50 [0060] Preferiblemente, la identidad es de al menos u 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

55 [0061] Se considera que cada una de estas cadenas de receptores de células T δ o células T y o partes de estas preferidas definidas anteriormente por identidad de secuencia y tal como se engloba en la invención pueden presentar una actividad antitumoral o antiinfecciosa tal como se evalúa en el paso c) del método de la invención.

60 [0062] En ciertos aspectos descritos en el presente documento, se proporcionan polipéptidos que comprenden una CDR del receptor de células T y o una variante o porción funcional de esta que se pueden obtener mediante el método de la invención. También se proporciona una cadena del receptor de células T y o parte de esta que comprende una región CDR3, estando dicha cadena del receptor de células T y o parte de esta representada por una

secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10, 18, 64 y/o 97.

5 [0063] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 51 y/o 63 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 51 y/o 63.

10 [0064] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

15 [0065] En otra forma de realización preferida, se proporciona una cadena del receptor de células T y o parte de esta que comprende una región CDR3, estando dicha cadena del receptor de células T y o parte de esta representada por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18 preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

20 [0066] En otra forma de realización preferida, se proporciona una cadena del receptor de células T y o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T y o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19 y/o 30.

25 [0067] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 41 y/o 53 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 41 y/o 53.

30 [0068] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

35 [0069] En otra forma de realización preferida, se proporciona una cadena del receptor de células T y o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T y o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 y/o 32.

40 [0070] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 43 y/o 55 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 43 y/o 55.

45 [0071] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

50 [0072] En otra forma de realización preferida, se proporciona una cadena del receptor de células T y o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T y o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21 y/o 34.

55 [0073] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 45 y/o 57 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 45 y/o 57.

60 [0074] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

- [0075] En otra forma de realización preferida, se proporciona una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 40 y/o 70.
- 5 [0076] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 76 y/u 82 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 76 y/u 82.
- 10 [0077] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.
- 15 [0078] En otra forma de realización preferida, se proporciona una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 65 y/o 71.
- 20 [0079] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 77 y/u 83 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 77 y/u 83.
- 25 [0080] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.
- 30 [0081] En otra forma de realización preferida, se proporciona una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 y/o 72.
- 35 [0082] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 78 y/u 84 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 78 y/u 84.
- 40 [0083] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.
- 45 [0084] En otra forma de realización preferida, se proporciona una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 67 y/o 73.
- 50 [0085] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 79 y/u 85 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 79 y/u 85.
- 55 [0086] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.
- 60 [0087] En otra forma de realización preferida, se proporciona una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 68 y/o 74.

- [0088] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 80 y/o 86 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 80 y/o 86.
- 5 [0089] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.
- 10 [0090] En otra forma de realización preferida, se proporciona una cadena del receptor de células T y o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T y o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 69 y/o 75.
- 15 [0091] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 81 y/u 87 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 81 y/u 87.
- 20 [0092] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.
- 25 [0093] En otra forma de realización preferida, se proporciona una cadena del receptor de células T y o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T y o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 89 y/o 91.
- 30 [0094] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 93 y/o 95 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 93 y/o 95.
- 35 [0095] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.
- [0096] Se considera que cada una de estas cadenas de receptores de células T preferidas o partes de estas definidas anteriormente por identidad de secuencia y tal como se engloba en la invención pueden presentar una actividad antitumoral o antiinfecciosa cuando se expresan en una célula T o célula NK que ya expresa un receptor de células T tal como se evalúa en el paso c) del método de la invención. Lo mismo se aplica a las cadenas de receptor de células T y preferidas o partes de estas definidas anteriormente por la identidad de secuencia, la célula T $\alpha\beta$ o la célula NK que ya expresa un receptor de células T δ .
- 40 [0097] En esta parte, todos los aspectos descritos a continuación se aplicaron para cualquier cadena o variante del receptor de células T δ (o células T y) o parte de esta obtenible mediante el método de la presente invención, y especialmente para la cadena o variante del receptor de células T δ (o células T y) o parte de esta identificada anteriormente.
- 45 Aspectos adicionales útiles para comprender la divulgación relacionados con el uso de una cadena del receptor de células T δ (o células T y) o una parte de esta
- [0097] En esta parte, todos los aspectos descritos a continuación se aplicaron para cualquier cadena o variante del receptor de células T δ (o células T y) o parte de esta obtenible mediante el método de la presente invención, y especialmente para la cadena o variante del receptor de células T δ (o células T y) o parte de esta identificada anteriormente.
- 50 [0098] En un aspecto útil para entender la divulgación, una variante o parte de una cadena del receptor de células T δ (o células T y) descrita en el presente documento es un polipéptido soluble. Dicho polipéptido soluble también puede denominarse unidad de unión. Dicho polipéptido soluble puede incluir diversas formas para unirse a entidades tales como un TCR, anticuerpo, scFv, BCR o cualquier combinación de estos. En algunos casos, al menos una porción de un TCR, tal como Y γ 9V δ 2 o V γ 5V61 o V γ 4V65 o V γ 8V δ 5 o V γ 2V61 o V γ 8V61, se puede generar y utilizar en una composición farmacéutica como se describe en el presente documento. Por ejemplo, las quimeras de anticuerpo de TCR pueden generarse y analizarse antes de llegar a una quimera deseada. Por ejemplo, los dominios variables y δ pueden reemplazar dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo. Además de la unión potenciada, un dominio Fc de un anticuerpo puede mediar la citotoxicidad a través de células inmunitarias positivas

para el receptor Fcγ y/o un sistema complementario. En algunos casos, las quimeras de anticuerpo de TCR pueden generarse usando células HEK293 y purificarse posteriormente usando cromatografía de afinidad con proteína A seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. Un plegamiento apropiado de quimeras puede ser sondado usando anticuerpos específicos de conformación que pueden dirigirse a dominios variables γ y δ. Las quimeras pueden usarse en ensayos de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) para determinar la eficacia funcional. Después de realizar los ensayos *in vitro*, se puede analizar la eficacia funcional de quimeras de anticuerpo de TCR *in vitro* y/o *in vivo*.

[0099] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona un conjugado que comprende (una parte de) la cadena del receptor de células T δ (o células T γ) como se ha definido anteriormente que está unida a un agente. El tipo de agente utilizado depende del tipo de aplicaciones previstas. Dichos conjugados pueden estar unidos a sustratos (por ejemplo, productos químicos, nanopartículas) y pueden usarse, por ejemplo, para administrar quimioterapia a una diana de interés. Además, en el diagnóstico, la expresión de ligandos definidos puede analizarse aprovechando los TCR solubles unidos a fluorocromos que, después, se usan como herramienta de tinción o para el aislamiento bioquímico del ligando.

[0100] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende la cadena del receptor de células T δ (y/o células T γ) o una parte de esta representada por una secuencia de aminoácidos como se identifica en el paso c) del método de la invención, preferiblemente la cadena del receptor de células T δ (y/o células T γ) o parte de esta identificada en la parte titulada "cadena del receptor de células T δ (o células T γ) preferida o una parte de esta".

[0101] En un aspecto, por lo tanto, se proporciona un TOP γδ que comprende:

- una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta y
– una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta, cada una de las cuales se ha identificado mediante un método como se describe en el presente documento.

[0102] En otra forma de realización preferida, se proporciona, por lo tanto, un TOP γδ que comprende:

- una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 y/o 17 y/o 96, y preferiblemente
– una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10, 18 64 y/o 97.

[0103] En un aspecto útil para comprender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 50 y/o 62 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 50 y/o 62, y preferiblemente
– una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 51 y/o 63 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 51 y/o 63.

[0104] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

[0105] En otra forma de realización preferida, se proporciona, por lo tanto, un TOP γδ que comprende:

- una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos,

- donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22 y/o 35, y preferiblemente
- una cadena del receptor de células T y/o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T y/o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 39 y/o 36.
- [0106] En un aspecto útil para comprender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:
- una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 46 y/o 58 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 46 y/o 58, y preferiblemente
 - una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 47 y/o 59 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 47 y/o 59.
- [0107] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.
- [0108] En otra forma de realización preferida, se proporciona, por lo tanto, un TOP γδ que comprende:
 - una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 y/o 29 y preferiblemente
 - una cadena del receptor de células T y/o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T y/o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19 y/o 30.
- [0109] En un aspecto útil para comprender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:
- una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 26 y/o 52 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 26 y/o 52, y preferiblemente
 - una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 41 y/o 53 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 41 y/o 53.
- [0110] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.
- [0111] En otra forma de realización preferida, se proporciona, por lo tanto, un TOP γδ que comprende:
- una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24 y/o 31, y preferiblemente
 - una cadena del receptor de células T y/o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T y/o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 y/o 32.

[0112] En un aspecto útil para comprender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 5 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 42 y/o 54 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 42 y/o 54, y preferiblemente
- 10 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 43 y/o 55 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 43 y/o 55.

15 [0113] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

[0114] En otra forma de realización preferida, se proporciona, por lo tanto, un TOP γδ que comprende:

- 20 – una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25 y/o 33 y preferiblemente
- 25 – una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21 y/o 34

30 [0115] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 35 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 44 y/o 56 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 44 y/o 56, y preferiblemente
- 40 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 45 y/o 57 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 45 y/o 57.

45 [0116] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

[0117] En otra forma de realización preferida, se proporciona, por lo tanto, un TOP γδ que comprende:

- 45 – una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28 y/o 37, y preferiblemente
- 50 – una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27 y/o 38.

55 [0118] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 60 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 48 y/o 60 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un

- 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 48 y/o 60, y preferiblemente
- 5 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 49 y/o 61 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 49 y/o 61.

[0119] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

10 [0120] En otra forma de realización preferida, se proporciona, por lo tanto, un TOP $\gamma\delta$ que comprende:

- 15 – una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 40 y/o 70, y preferiblemente
- 20 – una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 65 y/o 71.

[0121] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR $\gamma\delta$, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 25 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 76 y/u 82 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 76 y/u 82, y preferiblemente
- 30 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 77 y/u 83 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 77 y/u 83.

35 [0122] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

[0123] En otra forma de realización preferida, se proporciona, por lo tanto, un TOP $\gamma\delta$ que comprende:

- 40 – una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 y/o 72, y preferiblemente
- 45 – una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 67 y/o 73.

50 [0124] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR $\gamma\delta$, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 55 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 78 y/u 84 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 78 y/u 84, y preferiblemente
- 60 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 79 y/u 85 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 79 y/u 85.

[0125] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

[0126] En otra forma de realización preferida, se proporciona, por lo tanto, un TCR γδ que comprende:

- 5 – una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 68 y/o 74, y preferiblemente
- 10 – una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 69 y/o 75.

15 [0127] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 20 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 80 y/u 86 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 80 y/u 86, y preferiblemente
- 25 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 81 y/u 87 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 81 y/u 87.

[0128] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

30 [0129] En otra forma de realización preferida, se proporciona, por lo tanto, un TCR γδ que comprende:

- 35 – una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 88 y/o 90, y preferiblemente
- 40 – una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 89 y/o 91.

[0130] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 45 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 92 y/o 94 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 92 y/o 94, y preferiblemente
- 50 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 93 y/o 95 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 93 y/o 95.

55 [0131] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

[0132] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona un vector que comprende la construcción de ácido nucleico definida anteriormente. Un vector preferido es un vector retroviral o un vector lentiviral.

- [0133] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una célula que comprende la construcción de ácido nucleico o el vector como se ha definido anteriormente. Esta célula es preferiblemente una célula T.
- 5 [0134] Una célula T preferida expresa una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) o una parte de esta identificada en la parte titulada "cadena del receptor de células T δ preferidas (o células T γ) o una parte de esta.
- 10 [0135] La parte general de la descripción dedicada a las definiciones proporciona una explicación detallada en cuanto a moléculas de ácido nucleico útiles para entender la divulgación y polipéptido englobado por la invención, construcción nucleica útil para entender la divulgación, vector viral útil para entender la divulgación y células que comprenden dicha construcción o vector útil para entender la divulgación.
- 15 [0136] Se espera que cada una de la cadena del receptor de células T δ (o células T γ) o parte de esta aislada usando el método de la invención sea biológicamente relevante para diseñar un medicamento para prevenir, tratar, provocar la regresión, curar y/o retrasar el cáncer o una infección, ya que cada una de estas cadenas o parte de estas posee actividad antitumoral o antiinfecciosa (paso c de los métodos de la invención).
- 20 [0137] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una cadena del receptor de células T δ (o células T γ), o una parte de esta, un conjugado, una construcción de ácido nucleico, un vector, una célula, todos como se ha definido anteriormente en el presente documento para su uso como medicamento. En algunos casos, una cadena del receptor de células T δ es una cadena del receptor de células T δ2, de células T δ1, de células T δ5 o de células T δ4. En algunos casos, una cadena del receptor de células T γ es una cadena del receptor de células T γ9, de células T γ8, células T γ4 o una cadena del receptor de células T γ5. El medicamento es preferiblemente para la prevención, la supresión, el tratamiento del cáncer o una infección. En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una composición, preferiblemente una composición farmacéutica que comprende una cadena del receptor de células T δ (o células T γ), o una parte de esta, un conjugado, una construcción de ácido nucleico, un vector, una célula, todos como se ha definido anteriormente en el presente documento.
- 25 [0138] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona un método para prevenir, tratar, provocar la regresión, curar y/o retrasar el cáncer o una infección en un sujeto, donde una cadena del receptor de células T δ (o células T γ), o una parte de esta, un conjugado, una construcción de ácido nucleico, un vector, una célula, todos como se ha definido anteriormente en el presente documento, se administran a dicho sujeto. Un sujeto preferido es un ser humano.
- 30 [0139] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona un uso de una cadena del receptor de células T δ (o células T γ), o una parte de esta, un conjugado, una construcción de ácido nucleico, un vector, una célula, todos como se ha definido anteriormente en el presente documento, para la fabricación de un medicamento para prevenir, tratar, provocar la regresión, curar y/o retrasar el cáncer o una infección en un sujeto. Un sujeto preferido es un ser humano.
- 35 [0140] En un aspecto útil para comprender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento que expresa:
- 40
 - una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 y/o 17 y/o 96, y preferiblemente
 - una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10, 18, 64 y/o 97.
- 45 [0141] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:
- 50
 - una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 50 y/o 62 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 50 y/o 62, y preferiblemente
 - una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 51 y/o 63 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un

60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 51 y/o 63.

5 [0142] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

[0143] En un aspecto útil para comprender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento según se ha explicado, que expresa:

- 10 – una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22 y/o 35, y preferiblemente
- 15 – una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 39 y/o 36.

20 [0144] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 25 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 46 y/o 58 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 46 y/o 58, y preferiblemente
- 30 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 47 y/o 59 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 47 y/o 59.

[0145] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

35 [0146] En un aspecto útil para comprender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento según se ha explicado, que expresa:

- 40 – una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 y/o 29, y preferiblemente
- 45 – una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19 y/o 30.

50 [0147] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 55 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 26 y/o 52 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 26 y/o 52, y preferiblemente
- una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 41 y/o 53 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 41 y/o 53.

60 [0148] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

[0149] En un aspecto útil para comprender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento que expresa:

- 5 – una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24 y/o 31, y preferiblemente
- 10 – una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 y/o 32.

15 [0150] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 20 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 42 y/o 54 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 42 y/o 54, y preferiblemente
- 25 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 43 y/o 55 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 43 y/o 55.

[0151] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

30 [0152] En un aspecto útil para comprender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento tal como se explica que expresa:

- 35 – una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25 y/o 33 y preferiblemente
- 40 – una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21 y/o 34.

[0153] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 45 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 44 y/o 56 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 44 y/o 56, y preferiblemente
- 50 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 45 y/o 57 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 45 y/o 57.

55 [0154] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

[0155] En un aspecto útil para comprender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento según se ha explicado, que expresa:

60

- una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28 y/o 37 y preferiblemente
- 5 - una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28 y/o 38.
- 10 [0156] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:
- una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 48 y/o 60 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 48 y/o 60, y preferiblemente
 - una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 49 y/o 61 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 49 y/o 61.
- 15 [0157] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.
- 20 [0158] En un aspecto útil para comprender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento según se ha explicado, que expresa:
- una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 40 y/o 70 y preferiblemente
 - una cadena del receptor de células T γ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T γ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 65 y/o 71.
- 25 [0159] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:
- una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 76 y/u 82 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 76 y/u 82, y preferiblemente
 - una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 77 y/u 83 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 77 y/u 83.
- 30 [0160] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.
- 35 [0161] En un aspecto útil para comprender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento según se ha explicado, que expresa:
- una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66 y/o 72 y preferiblemente
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

- una cadena del receptor de células T y/o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T y/o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 67 y/o 73.

5 [0162] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 10 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 78 y/u 84 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 78 y/u 84, y preferiblemente
- 15 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 79 y/u 85 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 79 y/u 85.

20 [0163] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

[0164] En un aspecto útil para comprender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento según se ha explicado, que expresa:

- 25 – una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 68 y/o 74 y preferiblemente
- 30 – una cadena del receptor de células T y/o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T y/o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 69 y/o 75.

35 [0165] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 40 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 80 y/u 86 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 80 y/u 86, y preferiblemente
- 45 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 81 y/u 87 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 81 y/u 87.

[0166] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

50 [0167] En un aspecto útil para comprender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento que expresa:

- 55 – una cadena del receptor de células T δ o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T δ o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 88 y/o 90 y preferiblemente
- 60 – una cadena del receptor de células T y/o parte de esta que comprende una región CDR3, estando representada dicha cadena del receptor de células T y/o parte de esta por una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 89 y/o 91.

[0168] En un aspecto útil para entender la divulgación, se proporciona una célula T usada como medicamento que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un TCR γδ, estando representada dicha molécula de ácido nucleico por una secuencia de nucleótidos que comprende:

- 5 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 92 y/o 94 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 92 y/o 94, y preferiblemente
- 10 – una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 93 y/o 95 y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 93 y/o 95.

15 [0169] Preferiblemente, la identidad es de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

20 [0170] En la parte general dedicada a las definiciones, se proporciona información más detallada en cuanto a la formulación de una composición farmacéutica. La forma en que la cadena del receptor de células T δ (o células T γ) o parte de esta o construcción de ácido nucleico o vector o células virales se puede administrar a un sujeto en un método de tratamiento o en un uso farmacéutico de cada uno de estos compuestos ya se ha definido en el presente documento en el contexto del método del primer aspecto (véase el paso c) y en la parte general de la descripción dedicada a las definiciones.

Parte general dedicada a definiciones

25 *Polipéptido/ácido nucleico*

30 [0171] En el contexto del método de la invención, un polipéptido está representado por una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos preferidos son cadenas de receptores de células T δ (o células T γ) o partes de estas que intervienen en una respuesta antitumoral como se explica en el presente documento.

35 [0172] En el contexto del método de la invención, una molécula de ácido nucleico como una molécula de ácido nucleico que codifica tal cadena del receptor de células T δ (o células T γ) o parte de esta está representada por una secuencia de ácido nucleico o nucleótido que codifica tal polipéptido. Una molécula de ácido nucleico puede comprender una región reguladora.

40 [0173] Debe entenderse que cada molécula de ácido nucleico o polipéptido o construcción como se identifica en el presente documento por un número de identidad de secuencia dado (SEQ ID NO) no se limita a esta secuencia específica como se describe. A lo largo de esta solicitud, cada vez que se hace referencia a una secuencia de nucleótidos específica SEQ ID NO (tomando como ejemplo la SEQ ID NO: X) que codifica un polipéptido dado, se puede reemplazar por:

- 45 i. una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la SEQ ID NO: X;
- 50 ii. una secuencia de nucleótidos cuya cadena complementaria híbrida con una molécula de ácido nucleico de la secuencia de (i);
- 55 iii. una secuencia de nucleótidos cuya secuencia difiere de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (i) o (ii) debido a la degeneración del código genético; o,
- 60 iv. una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: X.

55 [0174] A lo largo de esta solicitud, cada vez que se hace referencia a una secuencia de aminoácidos específica SEQ ID NO (tomando la SEQ ID NO: Y como ejemplo), se puede reemplazar por: un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: Y.

60 [0175] Cada secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento en virtud de su porcentaje de identidad o similitud (al menos el 60 %) con una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos dada tiene respectivamente en una forma de realización preferida adicional una identidad o similitud de al menos el 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad o similitud con la

secuencia de nucleótidos o aminoácidos dada respectivamente. En una forma de realización preferida, la identidad o similitud de secuencia se determina comparando la longitud completa de las secuencias identificadas en el presente documento. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, identidad o similitud con una SEQ ID NO dada significa identidad o similitud basándose en la longitud completa de dicha secuencia (es decir, en toda su longitud o en conjunto).

5 *Identidad de secuencia*

[0176] La "identidad de secuencia" se define en el presente documento como una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (polipéptido o proteína) o dos o más secuencias de ácidos nucleicos (polinucleótidos), según se determina comparando las secuencias. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias de ácidos nucleicos se define preferiblemente evaluando su identidad dentro de una SEQ ID NO completa como se identifica en el presente documento o parte de esta. Parte de esta puede significar al menos el 50 % de la longitud de la SEQ ID NO, o al menos el 60 %, o al menos el 70 %, o al menos el 80 %, o al menos el 90 %.

[0177] En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, según sea el caso, según se determine por la coincidencia entre cadenas de tales secuencias. La similitud entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus substitutos de aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. La "identidad" y la "similitud" se pueden calcular fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo, pero sin limitarse a, los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. & Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., & Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988)).

[0178] Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud se codifican en programas informáticos disponibles para el público. Los métodos de programa informático preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, por ejemplo, el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984) BestFit, BLASTP, BLASTN y FASTA (Estados Unidos) Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El programa BLAST X está disponible para el público en NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El conocido algoritmo de Smith Waterman también puede usarse para determinar la identidad.

[0179] Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias polipeptídicas incluyen los siguientes: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: BLOSUM62 de Hentikoff y Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 89: 10915-10919 (1992); Penalización por hueco: 12; y Penalización por longitud de hueco: 4. Un programa útil con estos parámetros está disponible para el público como el programa "Ogap" de Genetics Computer Group, localizado en Madison, WI. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de aminoácidos (junto con ninguna penalización para huecos finales).

[0180] Los parámetros preferidos para la comparación de ácidos nucleicos incluyen los siguientes: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: coincidencias = +10, no coincidencia = 0; penalización por hueco: 50; penalización por longitud de hueco: 3. Disponible como el programa Gap de Genetics Computer Group, localizado en Madison, WI. Los anteriores son los parámetros por defecto para comparaciones de ácidos nucleicos.

[0181] Opcionalmente, al determinar el grado de similitud de aminoácidos, el experto en la materia también puede tener en cuenta las denominadas sustituciones de aminoácidos "conservadoras", como resultará evidente para el experto en la materia. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservadora de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Las variantes sustitucionales de la secuencia de aminoácidos divulgada en el

presente documento son aquellas en las que se ha eliminado al menos un residuo en las secuencias divulgadas y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Preferiblemente, el cambio de aminoácido es conservador. Las sustituciones conservadoras preferidas para cada uno de los aminoácidos naturales son las siguientes: Ala a Ser; Arg a Lys; Asn a Gln o His; Asp a Glu; Cys a Ser o Ala; Gln a Asn; Glu a Asp; Gly a Pro; His a Asn o Gln; Ile a Leu o Val; Leu a Ile o Val; Lys a Arg, Gln o Glu; Met a Leu o Ile; Phe a Met, Leu o Tyr; Ser a Thr; Thr a Ser; Trp a Tyr; Tyr a Trp o Phe; y Val a Ile o Leu.

Conjugado

10 [0182] Un polipéptido que comprende una cadena del receptor de células T δ (o células T γ) o parte de esta que interviene en una respuesta antitumoral como se explica en el presente documento puede acoplarse o unirse a un agente para formar un conjugado. El agente puede seleccionarse del grupo que consiste en un agente de diagnóstico, un agente terapéutico, un agente anticanceroso, un producto químico, una nanopartícula, un agente quimioterapéutico o un fluorocromo.

15 *Gen o secuencia codificante*

20 [0183] "Gen" o "secuencia codificante" o "ácido nucleico" o "nucleico" se refiere a una región de ADN o ARN (la región transcrita) que "codifica" un polipéptido particular tal como un receptor de células T δ. Una secuencia codificante se transcribe (ADN) y se traduce (ARN) en un polipéptido cuando se pone bajo el control de una región reguladora apropiada, tal como un promotor. Un gen puede comprender varios fragmentos unidos operativamente, tales como un promotor, una secuencia líder 5', un intrón, una secuencia codificante y una secuencia no traducida 3', que comprende un sitio de poliadénilación o una secuencia señal. Un gen químérico o recombinante (tal como el que codifica una cadena de TCR δ o TCR γ y que comprende el polipéptido como se identifica en el presente documento y está unido operativamente a un promotor) es un gen que no se encuentra de manera natural en la naturaleza, tal como un gen en el que, por ejemplo, el promotor no está asociado en la naturaleza con parte o toda la región de ADN transcrita. "Expresión de un gen" se refiere al proceso en el que un gen se transcribe en un ARN y/o se traduce en una proteína activa.

30 *Promotor*

35 [0184] Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más genes (o secuencia codificante), ubicado en dirección hacia el extremo 5' con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de la transcripción del gen, y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para ARN polimerasa dependiente de ADN, sitios de iniciación de la transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluyendo, pero sin limitarse a sitios de unión a factores de transcripción, sitios de unión a proteínas represoras y activadoras, y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida por un experto en la técnica para actuar directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción desde el promotor. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en la mayoría de las condiciones fisiológicas y de desarrollo. Un promotor inducible es un promotor que se regula dependiendo de las condiciones fisiológicas o del desarrollo. Un promotor "específico de tejido" es preferiblemente activo en tipos específicos de células/tejidos diferenciados, tal como, preferiblemente, una célula T.

45 *Unido operativamente*

50 [0185] "Unido operativamente" se define en el presente documento como una configuración en la que una secuencia de control, tal como una secuencia promotora o secuencia reguladora, se coloca apropiadamente en una posición con respecto a la secuencia de nucleótidos de interés, preferiblemente que codifica una cadena de TCR δ (o de TCR γ) que comprende el polipéptido tal como se identifica, de manera que el promotor o secuencia de control o regulación dirija o afecte a la transcripción y/o producción o expresión de la secuencia de nucleótidos de interés, preferiblemente que codifica una cadena de TCR δ (o TCR γ) que comprende el polipéptido tal como se identifica en una célula y/o en un sujeto. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor es capaz de iniciar o regular la transcripción o expresión de una secuencia codificante, en cuyo caso la secuencia codificante debe entenderse como "bajo el control de" el promotor.

55 *Construcción de expresión viral*

60 [0186] Una construcción de expresión lleva un genoma que es capaz de estabilizarse y mantenerse episomal en una célula. Dentro del contexto de la invención, una célula puede abarcar una célula usada para fabricar la construcción o una célula en la que se administrará la construcción. Alternativamente, una construcción es capaz de integrarse en el genoma de una célula, por ejemplo, a través de recombinación homóloga o de otra manera. Una construcción de

- expresión particularmente preferida es una en la que una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena de TCR δ (o TCR γ) o parte de esta está unida operativamente a un promotor como se define en el presente documento, donde dicho promotor es capaz de dirigir la expresión de dicha secuencia de nucleótidos (es decir, secuencia codificante) en una célula. Se dice que tal construcción de expresión preferida comprende un casete de expresión.
- 5 Un casete de expresión como se usa en el presente documento comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena de TCR δ (o TCR γ) o parte de esta. Una construcción de expresión viral es una construcción de expresión que está destinada a utilizarse en terapia génica. Se diseña de modo que comprenda parte de un genoma viral como se define más adelante en el presente documento.
- 10 [0187] Las construcciones de expresión descritas en el presente documento podrían prepararse usando técnicas recombinantes en las que las secuencias de nucleótidos que codifican dicha cadena de TCR δ (o TCR γ) o parte de esta se expresan en una célula adecuada, por ejemplo, células cultivadas o células de un organismo multicelular, tal como se describe en Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York (1987) y en Sambrook y Russell (2001, *supra*). Véase también Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:488 (que describe la mutagénesis dirigida) y Roberts et al. (1987) Nature 328:731-734 o Wells, J.A., et al. (1985) Gene 34: 315 (descripción de mutagénesis en casete).
- [0188] Típicamente, se usa una secuencia de ácido nucleico o de nucleótidos que codifica una cadena de TCR δ (o TCR γ) en una construcción de expresión o vector de expresión. La expresión "vector de expresión" se refiere generalmente a una secuencia de nucleótidos que es capaz de efectuar la expresión de un gen en un huésped compatible con tales secuencias. Estos vectores de expresión incluyen típicamente al menos secuencias promotoras adecuadas y, opcionalmente, señales de terminación de la transcripción. También se puede usar un factor adicional necesario o útil para efectuar la expresión como se describe en el presente documento. Se incorpora un ácido nucleico o ADN o secuencia de nucleótidos que codifica una cadena de TCR δ (o TCR γ) en una construcción de ADN capaz de introducirse en y expresarse en un cultivo celular *in vitro*. Específicamente, una construcción de ADN es adecuada para la replicación en un huésped procariótico, tal como bacterias, por ejemplo, *E. coli*, o se puede introducir en un mamífero, planta, insecto (por ejemplo, Sf9), levadura, hongo u otras líneas celulares eucariotas cultivadas.
- 20 30 [0189] Una construcción de ADN preparada para su introducción en un huésped particular puede incluir un sistema de replicación reconocido por el huésped, un segmento de ADN deseado que codifica un polipéptido deseado, y secuencias reguladoras de la iniciación y terminación transcripcionales y traduccionales unidas operativamente al segmento que codifica el polipéptido. El término "unido operativamente" ya se ha definido en el presente documento. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si estimula la transcripción de la secuencia. El ADN para una secuencia señal está unido operativamente al ADN que codifica un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción de un polipéptido. Por lo general, una secuencia de ADN que está unida operativamente es contigua y, en el caso de una secuencia señal, es contigua y también está dentro del marco de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos con una secuencia codificante cuya transcripción controlan. La unión se logra mediante ligación en sitios de restricción convenientes o en adaptadores o porciones conectoras que se insertan en su lugar, o mediante síntesis génica.
- 35 40 [0190] La selección de una secuencia promotora apropiada depende generalmente de la célula huésped seleccionada para la expresión de un segmento de ADN. Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas incluyen promotores procarióticos y eucarióticos ampliamente conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, 2001, *supra*). Una secuencia reguladora de la transcripción incluye típicamente un potenciador o promotor heterólogo que es reconocido por el huésped. La selección de un promotor apropiado depende del huésped, pero promotores tales como los promotores trp, lac y de fagos, promotores de ARNt y promotores de enzima glicolítica son conocidos y están disponibles (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, 2001, *supra*). Un vector de expresión incluye el sistema de replicación y se pueden emplear secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales junto con el sitio de inserción para el segmento codificante del polipéptido. En la mayoría de los casos, el sistema de replicación solo es funcional en la célula que se usa para fabricar el vector (célula bacteriana, como *E. coli*). La mayoría de los plásmidos y vectores no se replican en las células infectadas con el vector. Algunos ejemplos de combinaciones factibles de líneas celulares y vectores de expresión se describen en Sambrook y Russell (2001, *supra*) y en Metzger et al. (1988) Nature 334: 31-36. Por ejemplo, los vectores de expresión adecuados pueden expresarse en levaduras, por ejemplo, *S. cerevisiae*, por ejemplo, células de insecto, por ejemplo, células Sf9, células de mamífero, por ejemplo, células CHO y células bacterianas, por ejemplo, *E. coli*. Una célula puede ser, por tanto, una célula huésped procariota o eucariota. Una célula puede ser una célula que sea adecuada para el cultivo en medio líquido o sólido.
- 45 55 60 [0191] Alternativamente, una célula huésped es una célula que forma parte de un organismo multicelular, tal como una planta o animal transgénico.

Vector viral

- [0192] Un vector viral o un vector de terapia génica es un vector que comprende una construcción de expresión viral como se ha definido anteriormente.
- [0193] Un vector viral o un vector de terapia génica es un vector que es adecuado para terapia génica. Los vectores que son adecuados para la terapia génica se describen en Anderson 1998, Nature 392: 25-30; Walther y Stein, 2000, Drugs 60: 249-71; Kay et al., 2001, Nat. Med. 7: 33-40; Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81: 2573-604; Amado y Chen, 1999, Science 285: 674-6; Federico, 1999, Curr. Opin. 10: 448-53; Vigna y Naldini, 2000, J. Gene Med. 2: 308-16; Marin et al., 1997, Mol. Med. Today 3: 396-403; Peng y Russell, 1999, Curr. Opin. Biotechnol. 10: 454-7; Sommerfelt, 1999, J. Gen. Virol. 80: 3049-64; Reiser, 2000, Gene Ther. 7: 910-3; y referencias citadas en estos.
- [0194] Un vector de terapia génica particularmente adecuado incluye un vector adenoviral y de virus adenoasociado (AAV). Estos vectores infectan un gran número de tipos celulares en división y no en división, incluyendo células sinoviales y células hepáticas. La naturaleza episomal de los vectores adenovíricos y de AAV después de la entrada en la célula hace que estos vectores sean adecuados para aplicaciones terapéuticas. (Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81: 2573-2604; Goncalves, 2005, Virol J. 2(1):43) como se ha indicado anteriormente. Los vectores de AAV son incluso más preferidos, ya que se sabe que dan como resultado una expresión a largo plazo muy estable de la expresión transgénica (hasta 9 años en los perros (Niemeyer et al., Blood. 22 de enero de 2009; 113(4):797-806) y ~ 2 años en humanos (Nathwani et al., N Engl J Med. 22 de diciembre de 2011; 365(25):2357-65, Simonelli et al, Mol Ther. Marzo de 2010; 18(3):643-50. Epub 1 de diciembre de 2009)). Los vectores adenovirales preferidos se modifican para reducir la respuesta del huésped, tal como revisa Russell (2000, *supra*). El método para terapia génica que usa vectores de AAV se describe en Wang et al., 2005, J Gene Med. 9 de Marzo (Epub antes de la impresión), Mandel et al., 2004, Curr Opin Mol Ther. 6(5):482-90 y Martin et al., 2004, Eye 18(11):1049-55, Nathwani et al., N Engl J Med. 22 de diciembre de 2011; 365(25):2357-65, Apparailly et al., Hum Gene Ther. 2005 Apr;16(4):426-34.
- [0195] Otro vector de terapia génica adecuado incluye un vector retroviral. Un vector retroviral preferido para su aplicación en la presente invención es una construcción de expresión basada en lentivirales. Los vectores lentivirales tienen la capacidad de infectar e integrarse de manera estable en el genoma de células en división y no en división (Amado y Chen, 1999 Science 285: 674-6). Los métodos para la construcción y uso de construcciones de expresión basadas en lentivirus se describen en las patentes de EE. UU. n.º 6,165,782, 6,207,455, 6,218,181, 6,277,633 y 6,323,031 y en Federico (1999, Curr Opin Biotechnol 10: 448-53) y Vigna et al. (2000, J Gene Med 2000; 2: 308-16).
- [0196] Otros vectores de terapia génica adecuados incluyen un vector del virus del herpes, un vector de poliomavirus o un vector del virus vaccinia.
- [0197] Un vector de terapia génica comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena de TCR δ (o TCR γ), por lo que cada una de dichas secuencias de nucleótidos está unida operativamente a las secuencias reguladoras apropiadas. Tal secuencia reguladora comprenderá al menos una secuencia promotora. Los promotores adecuados para la expresión de dicha secuencia de nucleótidos a partir de vectores de terapia génica incluyen, por ejemplo, promotor temprano intermedio de citomegalovirus (CMV), promotores repetidos terminales largos virales (LTR), tales como los del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV), el virus del sarcoma de Rous, o HTLV-1, el promotor temprano del virus de simio 40 (SV 40) y el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple. También se pueden usar en este contexto transposones u otros sistemas de administración no virales. Todos los sistemas pueden usarse *in vitro* o *in vivo*.
- [0198] Un vector de terapia génica puede comprender opcionalmente una secuencia de nucleótidos adicional que codifica un polipéptido adicional. Un polipéptido adicional puede ser un polipéptido marcador (seleccionable) que permite la identificación, selección y/o cribado de células que contienen la construcción de expresión. Las proteínas marcadoras adecuadas para este propósito son, por ejemplo, la proteína fluorescente GFP, y los genes marcadores seleccionables timidina quinasa del VHS (para selección en medio HAT), higromicina B fosfotransferasa bacteriana (para selección en higromicina B), aminoglucósido fosfotransferasa Tn5 (para selección en G418) y dihidrofolato reductasa (DHFR) (para selección en metotrexato), CD20, el gen del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad. Se proporcionan fuentes para obtener estos genes marcadores y métodos para su uso en Sambrook y Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3^a edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- [0199] Un vector de terapia génica se formula preferiblemente en una composición farmacéutica como se define en el presente documento. En este contexto, una composición farmacéutica puede comprender un vehículo farmacéutico adecuado como se ha definido anteriormente en el presente documento.

Transgén

[0200] Un "transgén" se define en el presente documento como un gen o una molécula de ácido nucleico (es decir, una molécula que codifica una cadena de TCR δ (o una cadena de TCR γ) que se ha introducido de nuevo en una célula, es decir, un gen que puede estar presente pero que normalmente no se puede expresar o que se expresa a un nivel insuficiente en una célula. El transgén puede comprender secuencias que son nativas a la célula, secuencias que no se producen de manera natural en la célula y puede comprender combinaciones de ambas. Un transgén puede contener secuencias que codifican una cadena de δ (o una TCR γ) y que comprenden el polipéptido tal como se ha identificado y/o proteínas adicionales tal como se han identificado anteriormente en el presente documento que pueden estar unidas operativamente a secuencias reguladoras apropiadas para la expresión de las secuencias que codifican una cadena de TCR δ (o de TCR γ). Preferiblemente, el transgén no está integrado en el genoma de la célula huésped.

Transducción

[0201] "Transducción" se refiere a la administración de una cadena de TCR δ (o de TCR γ) o partes de esta en una célula huésped receptora mediante un vector viral. Por ejemplo, la transducción de una célula diana por un vector retroviral o lentiviral de la invención conduce a la transferencia del genoma contenido en ese vector a la célula transducida.

Célula huésped/célula diana

[0202] "Célula huésped" o "célula diana" se refiere a la célula en la que tiene lugar la administración de ADN, tal como las células T de un donante.

Células modificadas genéticamente

[0203] "Células modificadas" se refiere en el presente documento a células que se han modificado, por ejemplo, mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico exógena como se define en el presente documento. Una célula de este tipo se ha modificado genéticamente, por ejemplo, mediante la introducción de, por ejemplo, una o más mutaciones, inserciones y/o delecciones en el gen endógeno y/o inserción de una construcción genética en el genoma. Una célula modificada genéticamente puede referirse a una célula aislada o en cultivo. Las células modificadas pueden ser "células transducidas", donde las células se han infectado con, por ejemplo, un virus modificado, por ejemplo, puede usarse un retrovirus, tal como se describe en los ejemplos, pero también pueden contemplarse otros virus adecuados tales como lentivirus. También se pueden usar métodos no virales, tales como transfecciones. Las células modificadas genéticamente también pueden ser "células transfectadas de manera estable" o "células transfectadas de manera transitoria". La transfección se refiere a métodos no virales para transferir ADN (o ARN) a células de manera que se exprese un gen. Los métodos de transfección son ampliamente conocidos en la técnica, tales como transfección con fosfato de calcio, transfección con PEG, y transfección liposomal o con lipoplex de ácidos nucleicos. Tal transfección puede ser transitoria, pero también puede ser una transfección estable en la que se pueden seleccionar células que tienen la construcción génica integrada en su genoma. En algunos casos, se pueden utilizar sistemas de ingeniería genética tales como CRISPR o Argonaute para modificar genéticamente células que expresen un polipéptido descrito en el presente documento.

Composición farmacéutica/método de tratamiento

[0204] En aplicaciones terapéuticas, se administra a un sujeto una cantidad eficaz de una cadena de TCR δ (o TCR γ) o partes de esta o una construcción de ácido nucleico o vector viral o célula que expresa estas moléculas como se define en el presente documento.

[0205] El término "cantidad eficaz" como se usa en el presente documento se define como la cantidad de las moléculas de la presente invención que son necesarias para dar como resultado el cambio fisiológico deseado en la célula o tejido al que se administra. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento se define como la cantidad de las moléculas de la presente invención que logra un efecto deseado con respecto al cáncer. En este contexto, un "efecto deseado" es sinónimo de "una actividad antitumoral" como se ha definido anteriormente en el presente documento. Un experto en la materia reconoce fácilmente que, en muchos casos, las moléculas pueden no proporcionar una cura, pero pueden proporcionar un beneficio parcial, tal como alivio o mejora de al menos un síntoma o parámetro. En algunos casos, un cambio fisiológico que tiene algún beneficio también se considera terapéuticamente beneficioso. Por lo tanto, en algunos casos, una cantidad de moléculas que proporciona un cambio fisiológico se considera una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz".

- [0206] Las composiciones farmacéuticas útiles para entender la divulgación comprenden una cantidad eficaz de una o más moléculas (es decir, un polipéptido que comprende una cadena de TCR δ o TCR γ o variantes o partes de estas o construcción de ácido nucleico o vector viral o célula que expresa estas moléculas como se define en el presente documento) opcionalmente disuelta o dispersa en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen ninguna reacción adversa, alérgica u otra reacción no esperada, o lo hacen a un nivel aceptable, cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. Que ciertos efectos adversos sean o no aceptables se determina en función de la gravedad de la enfermedad. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un principio activo será conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para la administración a animales (por ejemplo, seres humanos), se entenderá que las preparaciones deberían cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según lo requiera la Office of Biological Standards de la FDA.
- [0207] Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualesquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como conocerá un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a Ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329). Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas. En algunas formas de realización, una composición farmacéutica descrita en el presente documento que comprende una población de células descritas en el presente documento comprende además una cantidad adecuada de un agente antifúngico. En algunos casos, una composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende un agente antifúngico en una cantidad suficiente para que la composición farmacéutica conserve al menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de su actividad deseada durante un período de al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años.
- [0208] La cantidad de la dosis real de una composición útil para entender la divulgación administrada a un animal o un paciente puede determinarse por factores físicos y fisiológicos, tales como el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, intervenciones terapéuticas previas o simultáneas, idiopatía del paciente y vía de administración. El profesional responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración de ingrediente(s) activo(s) en una composición y la(s) dosis(s) apropiada(s) para el sujeto individual.

Célula T como composición farmacéutica

- [0209] Antes de la expansión y modificación genética de las células T útiles para entender la divulgación, se obtiene una fuente de células T de un sujeto. Las células T pueden obtenerse de varias fuentes, incluyendo PBMC, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. En algunos casos, las células T se pueden obtener a partir de una unidad de sangre obtenida de un sujeto utilizando cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la materia, tal como separación Ficoll™. En algunos casos, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de aféresis contiene típicamente linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En algunos casos, las células recolectadas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en una solución tampón o medio apropiado para pasos de procesamiento posteriores. En algunos casos, la célula modificada genéticamente puede ser una célula T. La célula modificada genéticamente puede ser una célula T efectora (T_{EFF}), de memoria efectora (T_{EM}), de memoria central (T_{CM}), una célula madre T de memoria (T_{SCM}), naïve (T_N), o CD4+ o CD8+. Las células T también se pueden seleccionar de una población masiva, por ejemplo, seleccionando células T de sangre completa. Las células T también pueden expandirse a partir de una población masiva. Las células T también se pueden seleccionar según poblaciones y fenotipos particulares. La célula modificada genéticamente también puede expandirse ex vivo. La célula modificada genéticamente se puede formular en una composición farmacéutica. La célula modificada genéticamente se puede formular en una composición farmacéutica y usar para tratar a un sujeto que lo necesite como se ha explicado anteriormente en el presente documento. La célula modificada genéticamente puede ser autóloga para un sujeto que lo necesite. La célula modificada genéticamente puede ser alogénica para un sujeto que lo necesite. La célula modificada genéticamente también puede ser un reactivo compatible con buenas prácticas de fabricación (BPF). La célula modificada genéticamente puede formar parte de una terapia de combinación para tratar a un sujeto que lo necesite. La célula modificada genéticamente puede ser una célula humana. El sujeto al que se trata puede ser un ser humano.

- [0210] Un método para lograr células adecuadas puede comprender clasificar células. En algunos casos, una célula puede comprender un marcador que puede seleccionarse para la célula. Por ejemplo, dicho marcador puede comprender GFP, un gen de resistencia, un marcador de superficie celular, una etiqueta endógena. Las células pueden seleccionarse usando cualquier marcador endógeno. Las células adecuadas pueden seleccionarse o clasificarse usando cualquier tecnología. Dicha tecnología puede comprender citometría de flujo y/o columnas magnéticas. Las células seleccionadas pueden entonces infundirse en un sujeto. Las células seleccionadas también pueden expandirse hasta obtener grandes números. Las células seleccionadas pueden expandirse antes de la infusión.
- [0211] Los vectores pueden administrarse a las células *ex vivo*, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, células T, aspirados de médula ósea, biopsia de tejido), seguido de la reimplantación de las células en un paciente, normalmente después de la selección de células que han incorporado el vector. Antes o después de la selección, las células pueden expandirse.
- [0212] La transfección celular *ex vivo* también puede usarse para diagnóstico, investigación o terapia génica (por ejemplo, mediante reinfección de las células transfectadas en el organismo huésped). En algunos casos, las células se aislan del organismo sujeto, se transfecan con un ácido nucleico (por ejemplo, gen o ADN) y se reinfunden de nuevo en el organismo sujeto (por ejemplo, en el paciente). Además, también puede usarse la transfección celular *in vivo* para terapia génica, con el fin de reducir las reacciones inmunitarias del paciente.
- [0213] En algunos casos, las poblaciones de células T modificadas genéticamente pueden formularse para la administración a un sujeto usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Las formulaciones que comprenden poblaciones de células T modificadas pueden incluir excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s). Los excipientes incluidos en las formulaciones tendrán diferentes propósitos dependiendo, por ejemplo, de la subpoblación de células T usadas y del modo de administración. Los ejemplos de excipientes usados generalmente incluyen, sin limitación: solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua para inyección, glicerol, etanol y combinaciones de estos, agentes estabilizantes, agentes solubilizantes y tensioactivos, tampones y conservantes, agentes de tonicidad, agentes de carga y agentes lubricantes. Las formulaciones que comprenden poblaciones de células T modificadas genéticamente se habrán preparado y cultivado típicamente en ausencia de cualquier componente no humano, tal como suero animal.
- [0214] Una formulación puede incluir una población de células T modificadas genéticamente, o más de una, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más poblaciones de células T modificadas genéticamente. Las formulaciones que comprenden población(es) de células T modificadas genéticamente pueden administrarse a un sujeto usando modos y técnicas conocidos por el experto en la materia. Los modos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, inyección intravenosa. Otros modos incluyen, sin limitación, intratumoral, intradérmica, subcutánea (s.c., s.q., sub-Q, hipo), intramuscular (i.m.), intraperitoneal (i.p.), intraarterial, intramedular, intracardiaca, intraarticular (articulación), intrasinovial (área de fluido articular), intracraneal, intraespinal e intratecal (fluidos espinales). Para efectuar tal administración, puede usarse cualquier dispositivo conocido útil para infusión o inyección parenteral de las formulaciones. Las formulaciones que comprenden población(es) de células T modificadas que se administran a un sujeto comprenden un número de células T modificadas que es eficaz para el tratamiento y/o profilaxis de la indicación o enfermedad específica. Por lo tanto, las poblaciones terapéuticamente eficaces de células T modificadas se administran a sujetos cuando se practican los métodos de la presente invención. En general, se administran formulaciones que comprenden entre aproximadamente 1×10^4 y aproximadamente 1×10^{10} células T modificadas genéticamente. En la mayoría de los casos, la formulación comprenderá entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^9 células T modificadas genéticamente, entre aproximadamente 5×10^5 y aproximadamente 5×10^8 células T modificadas genéticamente, o entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^7 células T modificadas genéticamente. Sin embargo, el número de células T modificadas genéticamente administradas a un sujeto variará entre amplios límites, dependiendo de la localización, fuente, identidad, extensión y gravedad del cáncer, la edad y estado del individuo al que se va a tratar, etc. Un médico determinará en última instancia las dosis apropiadas que se han de usar.
- General*
- [0215] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos no mencionados específicamente. Además, el verbo "consistir" puede ser sustituido por "consistir esencialmente en", lo que significa que un método como se define en el presente documento puede comprender otro(s) paso(s) adicional(es) o, respectivamente, componente(s), además de los identificados específicamente, sin que dicho(s) paso(s) adicional(es) o, respectivamente, componente(s), altere(n) la característica única de la

invención. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" significa por lo tanto normalmente "al menos un/a".

- 5 [0216] La palabra "aproximadamente", cuando se usa en asociación con un número entero (aproximadamente 10), significa preferiblemente que el valor puede ser el valor dado de 10 más o menos 1 del valor: aproximadamente 10 significa preferiblemente de 9 a 11. La palabra "aproximadamente", cuando se usa en asociación con un valor numérico (aproximadamente 10,6), significa preferiblemente que el valor puede ser el valor dado de 10,6 más o menos un 1 % del valor 10,6.
- 10 [0217] Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Tabla 1: Resumen de las secuencias del listado de secuencias

SEQ ID NO	Nombre	Aminoácido (aa) o ADN
1	<u>Tabla de cebadores 1</u>	ADN
2	<u>Tabla de cebadores 1</u>	ADN
3	<u>Tabla de cebadores 1</u>	ADN
4	<u>Tabla de cebadores 1</u>	ADN
5	<u>Tabla de cebadores 1</u>	ADN
6	<u>Tabla de cebadores 1</u>	ADN
7	<u>CDR3 VD1 Fe11</u>	aa
8	<u>CDR3 VD2 cl3</u>	aa
9	<u>CD3 VD2 cl5</u>	aa
10	<u>CDR3 VG5 Fe11</u>	aa
11	<u>CDR3 VG cl3</u>	aa
12	<u>CDR3 VG9 cl5</u>	aa
13	<u>TRD cl3</u>	aa
14	<u>TRG cl3</u>	aa
15	<u>TRD cl5</u>	aa
16	<u>TRG cl5</u>	aa
17	<u>TRD Fe11</u>	aa
18	<u>TRG Fe11</u>	aa
19	<u>CDR3 VG4 E113</u>	aa
20	<u>CDR3 VG2 F4</u>	aa
21	<u>CDR3 VG8 Zi11</u>	aa
22	<u>CDR3 VD5 D37</u>	aa
23	<u>CDR3 VD5 E113</u>	aa
24	<u>CDR3 VD1 F4</u>	aa
25	<u>CDR3 VD1 Zi11</u>	aa
26	<u>TRD E113</u>	ADN de tipo salvaje
27	<u>CDR3 VG4 C132</u>	aa
28	<u>CDR3 VD5 C132</u>	aa
29	<u>TRD E113</u>	aa
30	<u>TRG E113</u>	aa
31	<u>TRD F4</u>	aa

32	<u>TRG F4</u>	<u>aa</u>
33	<u>TRD Zi11</u>	<u>aa</u>
34	<u>TRG Zi11</u>	<u>aa</u>
35	<u>TRD D37</u>	<u>aa</u>
36	<u>TRG D37</u>	<u>aa</u>
37	<u>TRD C132</u>	<u>aa</u>
38	<u>TRG C132</u>	<u>aa</u>
39	<u>CDR3 VG8 D37</u>	<u>aa</u>
40	<u>CDR3 VD3 F2</u>	<u>aa</u>
41	<u>TRG E113</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
42	<u>TRD F4</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
43	<u>TRG F4</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
44	<u>TRD Zi11</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
45	<u>TRG Zi11</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
46	<u>TRDD37</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
47	<u>TRG D37</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
48	<u>TRD C132</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
49	<u>TRG C132</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
50	<u>TRD Fe11</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
51	<u>TRG Fe11</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
52	<u>TRD E113</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
53	<u>TRG E113</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
54	<u>TRD F4</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
55	<u>TRG F4</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
56	<u>TRD Zi11</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
57	<u>TRG Zi11</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
58	<u>TRD D37</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
59	<u>TRG D37</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
60	<u>TRD C132</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
61	<u>TRG C132</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
62	<u>TRD Fe11</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
63	<u>TRG Fe11</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
64	<u>CDR3 VG5 Fe11 de mayor longitud</u>	<u>aa</u>
65	<u>CDR3 VG4 F2</u>	<u>Aa</u>
66	<u>CDR3 VD1 Ze11</u>	<u>aa</u>
67	<u>CDR3 VG8 Ze11</u>	<u>aa</u>
68	<u>CDR3 VD5 B23</u>	<u>aa</u>
69	<u>CDR3 VG8 B23</u>	<u>aa</u>
70	<u>TRD F2</u>	<u>aa</u>
71	<u>TRG F2</u>	<u>aa</u>
72	<u>TRD Ze11</u>	<u>aa</u>

73	<u>TRG Ze11</u>	<u>aa</u>
74	<u>TRD B23</u>	<u>aa</u>
75	<u>TRG B23</u>	<u>aa</u>
76	<u>TRD F2</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
77	<u>TRG F2</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
78	<u>TRD Ze11</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
79	<u>TRG Ze11</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
80	<u>TRD B23</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
81	<u>TRG B23</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
82	<u>TRD F2</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
83	<u>TRG F2</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
84	<u>TRD Ze11</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
85	<u>TRG Ze11</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
86	<u>TRD B23</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
87	<u>TRG B23</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
88	<u>CDR3 VD1 B9</u>	<u>aa</u>
89	<u>CDR3 VG5 B9</u>	<u>aa</u>
90	<u>TRD B9</u>	<u>aa</u>
91	<u>TRG B9</u>	<u>aa</u>
92	<u>TRD B9</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
93	<u>TRG B9</u>	<u>ADN de tipo salvaje</u>
94	<u>TRD B9</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
95	<u>TRG B9</u>	<u>Codón de ADN opt.</u>
96	<u>TRD FE11 sin péptido señal.</u>	<u>aa</u>
97	<u>TRG FE11 sin péptido señal.</u>	<u>aa</u>
98	<u>TRD Clon 3 sin péptido señal.</u>	<u>aa</u>
99	<u>TRG Clon 3 sin péptido señal.</u>	<u>aa</u>
100	<u>TRD Clon 5 sin péptido señal.</u>	<u>aa</u>
101	<u>TRG Clon 5 sin péptido señal.</u>	<u>aa</u>

Ejemplos

- 5 [0218] Se entiende que los ejemplos y las formas de realización descritos en el presente documento son solo para fines ilustrativos y que se sugerirán diversas modificaciones o diversos cambios en luz de los mismos a las personas expertas en la técnica y se incluirán dentro del espíritu y el alcance de esta solicitud y el alcance de las reivindicaciones adjuntas.
- 10 [0219] A menos que se especifique lo contrario, los reactivos empleados en los ejemplos están disponibles comercialmente o pueden prepararse utilizando instrumentación, métodos o reactivos disponibles comercialmente conocidos en la técnica. Los ejemplos ilustran diversos aspectos de la invención y la práctica de los métodos de la invención. Los ejemplos no pretenden proporcionar una descripción exhaustiva de los diferentes ejemplos de realización de la invención.

15 **Ejemplo 1**

Material y métodos

[0220] Las PBMC congeladas de donantes sanos se descongelaron y se tiñeron con los siguientes anticuerpos: CD3 (eFluor450 clon okt 3 1:40 eBioscience), TCR αβ (APC clon IP26 1:10, eBioscience) y pan TCR γδ (PE clon IMMU510 1:10 Beckman Coulter), o con CD3 (PE clon UCHT1 1:20 BD), CD4 (APC clon RPA-T4 1:100 Biolegend), CD8 (PerCP-Cy5.5 clon RPA-T8 1:1000 Biolegend), CD27 (APC eFluor780 clon 0323 1:20 eBioscience) y CD45RA (PB clon HI100 1:50 Biolegend). Las muestras se clasificaron con citometría de flujo en el medidor ARIAI (BD) en una fracción αβ (CD3+, αβ+) y una fracción γδ (CD3+, γδ+), o en diferentes subconjuntos de células T CD4+ y CD4-. El ARN se aisló utilizando Qiagen Rneasy Minikit para muestras $\geq 0,5 \times 10^6$ células o Qiagen Rneasy Microkit para muestras $< 0,5 \times 10^6$ células siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc específico para TRB y TRD se sintetizó con la transcriptasa inversa Superscript® II (Thermofisher) utilizando un cebador específico en la región constante 3' de TRB o TRD. Se incorporó un adaptador de cambio de modelo universal, que contiene un identificador molecular único (UMI), en el extremo 5' de la región V para poder tener en cuenta el sesgo de PCR durante el análisis. En la tabla 1 se puede encontrar una descripción general de los cebadores utilizados. Después de la síntesis del ADNc, el ADNc se purificó utilizando NucleoSpin® Gel y PCR Clean-UP (Machery-Nagel). El ADNc se amplificó con PCR usando la ADN polimerasa Q5® High Fidelity (New England Biolabs). Se usó un cebador anidado específico en la región constante de TRB o TRD, y un cebador de transición que se hidrata con el adaptador de comutación (tabla 1). La amplificación por PCR se realizó en un termociclador T100 (Biorad) siguiendo los siguientes pasos: 90 s a 98 °C, 35 ciclos de 7 s a 98 °C, 20 s a 62 °C, 50 s a 72 °C, seguido de 10 m a 72 °C. Los productos de PCR se purificaron usando NucleoSpin® Gel y PCR Clean-UP (Machery-Nagel). Los productos de PCR se analizaron con el sistema avanzado QIAxcel (Qiagen).

[0221] Los adaptadores de código de barras TruSeq (Illumina) se ligaron a los productos de PCR utilizando ClaSeek Ligation Mix (Thermo Scientific) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La limpieza de las muestras se realizó con el sistema Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). La secuenciación de nueva generación se realizó en un sistema Illumina MiSeq 500 (2x250 pb) (Illumina).

[0222] Los datos de secuenciación se analizaron con el programa MiXCR (Bolotin, et al. (7)). Para corregir el sesgo de PCR, se extrajeron los UMI de los datos de secuenciación utilizando el flujo de trabajo MIGEC (Shugay, et al. (8)). Solo se utilizaron secuencias con un UMI válido para análisis posteriores. Para buscar regiones de secuencias compartidas de CDR3 entre los diferentes donantes, se utilizó una herramienta web interactiva (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Sebestyen et al. (Cell Rep. 2016, 15: 1973-1985) y Schepers et al. (Leukemia, 2013, 27: 1328-1338) han descrito otros métodos para análisis funcionales.

Tabla 2 Descripción general de los cebadores

35 ADNc

síntesis

[0223]

Región constante de TRB	CAGTATCTGGAGTCATTGA (SEQ ID NO: 1)
Región constante de TRD	CTTGGATGACACGAGAT (SEQ ID NO: 2)
Adaptador de cambio de modelo con UMI	AAGCAGUGGTAUCAACGCAGAGUNNNNNNNNNNUCTT(rG) ₄ (SEQ ID NO: 3)
Amplificación por PCR	
Región constante del cebador anidado de TRB	TGCTTCTGATGGCTAACAC (SEQ ID NO: 4)
Región constante del cebador anidado de TRD	AACGGATGGTTGGTATGAG (SEQ ID NO: 5)
Cebador de transición (se hidrata con el adaptador de cambio)	CACTCTATCCGACAAGCAGTGGTATCACGCCAG (SEQ ID NO: 6)

rG = riboguanosina, necesaria para que el adaptador de cambio de modelo se hibride. La estructura principal de este adaptador es el ADNc, pero en esta parte hay cuatro ARN-G. Este adaptador de cambio de modelo se describe en el documento US5962272 y en Zhu Y et al. (Zhu Y et al. 2001, BioTechniques, 30: 892-897).

Resultados

[0224] Planteamos la hipótesis de que la secuenciación rápida de cadenas de TCR δ mediante secuenciación de nueva generación, seguida de una comparación de clones (dominantes) entre diferentes individuos se puede utilizar para identificar rápidamente clones funcionalmente relevantes, que se comparten entre diferentes individuos. Para probar esta hipótesis, aislamos células T y de 6 donantes diferentes y analizamos el repertorio de TCR δ mediante NGS, como se indica en el punto "Material y métodos". Para los análisis posteriores se utilizaron dos estrategias: el análisis individual de tres donantes indicados como HD 18, 19 y 20, así como un grupo de tres donantes, representados como "combinados" (HD11, 12 y 15). Además, utilizamos como hipotético séptimo donante la base de datos recopilada aleatoriamente de cadenas de TCR δ obtenidas por clonación y secuenciación de células individuales de muchos donantes diferentes, que están disponibles en la base de datos pública y privada. Después de la corrección del porcentaje de clones únicos superpuestos para UMI superpuestos, se ha observado una cantidad 7 veces mayor de TCR δ compartido en comparación con el repertorio de βTCR (figura 1). Al ajustar aún más las proporciones corregidas para el tamaño promedio del repertorio encontrado, la diferencia entre la frecuencia de clones superpuestos observados fue incluso más pronunciada con 1-2 diferencias logarítmicas más clones superpuestos observados para cadenas compartidas de TCR δ (figura 2). Por lo tanto, aunque el repertorio teórico de TCR δ es sustancialmente mayor que el repertorio teórico de TCR β, demostramos que la probabilidad de encontrar un clon superpuesto en el repertorio de TCR δ es 1-2 log más alta que cuando se analiza un repertorio de TCR β. Planteamos la hipótesis de que estas cadenas compartidas de TCR δ deben proporcionar una ventaja de supervivencia específica y, por lo tanto, podrían ser esenciales en funciones como la vigilancia diaria de tumores.

[0225] La comparación de secuencias de TCR δ entre diferentes donantes de NGS da como resultado la identificación de un número limitado de clones, que han sido compartidos al menos entre dos donantes diferentes (figura 3 y tabla 2 y no se muestran). Además, comparamos nuestras secuencias de TCR δ de HD con las del séptimo donante hipotético. De este modo, identificamos una cadena de TCR negativa para δ2, que es la segunda secuencia más frecuente en el donante HD19 (tablas 3 y 4) y cadenas de TCR positivas para δ2, que son compartidas al menos entre HD15 y el séptimo donante hipotético (tabla 3). Algunos de estos clones relevantes se encuentran entre los 30 clones principales de al menos uno de los donantes sanos, lo que indica la posible relevancia biológica de estos clones. Como prueba de concepto de la relevancia terapéutica funcional y potencial de las secuencias compartidas de TCR δ identificadas, buscamos, además, secuencias de TCR δ completas descritas que albergan secuencias dominantes y compartidas de TCR δ identificadas hasta el momento. Identificamos el clon FE11 (tabla 3), que ha sido descrito recientemente por nuestro grupo (TCR δ negativo para δ2 (9), tabla 2). El clon Fe11 fue el segundo clon más predominante en HD19 (tabla 4). El cribado de las líneas celulares tumorales clasificó a este clon como reactivo contra tumores frente a líneas celulares de células B malignas y de cáncer sólido ((10) y figura 4). Además, pudimos identificar una secuencia de TCR δ positiva para δ2 superpuesta como parte del clon 5, y una secuencia correspondiente al llamado clon 3, que también han sido ampliamente descritas por nuestro grupo (tabla 3 y (11)). El clon 5 se encontró entre los 20 primeros clones de HD15 (tabla 4). Se ha constatado que esta secuencia es muy activa contra muchos tipos de células cancerosas hematológicas y sólidas ((11, 12) y Tabla 4).

[0226] En resumen, proporcionamos una prueba de concepto de que podemos reducir la escala de un repertorio inmunológico muy diverso a un número muy limitado de secuencias, que son reactivas a tumores y, por lo tanto, terapéuticamente relevantes. Además de la reactividad antitumoral, las secuencias identificadas también pueden ser muy activas contra las infecciones, como lo demuestra la identificación de secuencias compartidas de cadenas de TCR positivas para Vδ2. Por lo tanto, la secuenciación de alto rendimiento de cadenas de TCR δ seguida de la comparación de secuencias entre diferentes donantes puede ser una herramienta muy poderosa y dar como resultado la identificación rápida de cadenas de TCR δ que pueden ser interesantes para aplicaciones terapéuticas.

45

Tabla 3. Clonotipos compartidos	Vdelta	Previamente descrito
Negativo para Vδ2		
CALGDSYGGGPLYTDKLIF (SEQ ID NO: 7)	Vd1	Fe11
Positivo para Vδ2		
CACDLLGYTDKLIF (SEQ ID NO: 8)	Vd2	Cl3
CACDALKRTDTDKLIF (SEQ ID NO: 9)	Vd2	Cl5

Tabla 4. Características de los clones conocidos		
Clon	Cadena de CDR3 δ	Cadena de CDR3 γ
Fe11	CALGDSYGGGPLYTDKLIF SEQ ID NO: 7	ATWDRPEIYYKKL SEQ ID NO: 10
Cl3	CACDLLGYTDKLIF	CALWEEELGKKIKVF

	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 11
CI5	CACDALKRTDKLIF SEQ ID NO: 9	ALWEIQELGKKIKVF SEQ ID NO: 12

Explicación

[0227] El principal hallazgo de este estudio es que al comparar los datos de NGS de las cadenas β y de TCR δ de diferentes donantes sanos, observamos una frecuencia sustancial de cadenas compartidas de TCR δ entre diferentes individuos, aunque el repertorio de TCR β , como se esperaba, rara vez se comparte. La minería de datos de las regiones CDR3 dentro de las secuencias de TCR δ identificadas y las bases de datos públicas dilucidaron, además, que las cadenas de receptores de gran interés terapéutico, como la cadena del clon 5 de cadenas de TCR δ positivas para $\delta 2$ (11), descrita recientemente por nosotros, se encontró entre los 20 clones dominantes principales de HD15. Además, la cadena de TCR δ negativa para $\delta 2$ del clon Fe11(9) fue el segundo clon más predominante en HD19. La principal ventaja es que esta estrategia reduce muy rápidamente la altísima diversidad potencial de cadenas de TCR δ de 10^1 a, literalmente, menos de 10^2 secuencias de interés terapéutico. Esto tiene consecuencias prácticas y terapéuticas, ya que el cribado de alto rendimiento de las secuencias de la cadena de TCR δ , seguido de la identificación de secuencias compartidas en pacientes sanos y enfermos puede servir como un centro rápido para la identificación de nuevas herramientas terapéuticas que se pueden utilizar, por ejemplo, para las células T modificadas genéticamente con TCR $\gamma\delta$ definidos, las llamadas TEG (13). Además, los análisis de repertorio de pacientes enfermos tienen el poder de identificar rápidamente a los pacientes que podrían beneficiarse de la adición de un repertorio inmunológico con secuencias de TCR δ definidas.

Secuencia de aminoácidos de CI3 de TRD: SEQ ID NO: 13

```

merisslihls1f wag vmsaielvpehqtvpvsi gvp
atrcsmkgeaignyyinwyrk t qgn t mtf iyrekdiyg
pgfkdnfqgdidia knlavlkilaps erdegsyycacd
llgytdkli f gk gtrvtveprs qph tkps vfv mkn gtnv
aclvkefy pk diri n l vsskkitefdpaivispsgky na
vk l gkyedsn svtcsvq hdnktvhstdfevktdstdhv
kp kete nt kq psk schkpk aivh tek vnm mslt vlg l r
m1fak tva vnf llta k1f f1

```

Secuencia de aminoácidos de CI3 de TRG: SEQ ID NO: 14

```

m vs llh astlavlgal cvy gag h leq p q i s st k t l s k t a
r lecvvs g it i s at s vy w y r e r p g e v i q f l v s i s y d g t v r
k e s g i p s g k f e v d r i p e t s t s t l t i h n v e k q d i a t y y c a l
w e e l g k k i k v f g p g t k l i i t d k q l d a d v s p k p t i f l p s
i a c t k l q k a g t y l c l l c k f f p d v i k i h w c c k k s n t i l g s
q e g n t m k t n d t y m k f s w l t v p e k s l d k e h r c i v r h e n n
k n g v d q e i i f p p i k t d v i t m d p k d n c s k d a n d t l l q l t
n t s a y y m y l l l l k s v v y f a i i t c e l l r r t a f c c n g e k s

```

Secuencia de aminoácidos de CI5 de TRD: SEQ ID NO: 15

```

merisslihls1f wag vmsaielvpehqtvpvsi gvp
atrcsmkgeaignyyinwyrk t qgn t mtf iyrekdiyg
pgfkdnfqgdidia knlavlkilaps erdegsyycacd
lkrt dt dkli f gk gtrvtveprs qph tkps vfv mkn gtnv
vaclvkefy pk diri n l vsskkitefdpaivispsgky na
avk l gkyedsn svtcsvq hdnktvhstdfevktdstdhv
vk p kete nt kq psk schkpk aivh tek vnm mms1tvlg1
rm1fak tva vnf llta k1f f1

```

Secuencia de aminoácidos de CI5 de TRG: SEQ ID NO: 16

m v s l l h a s t l a v l g a l c v y g a g h l e q p q i s s t k t l s k t a
 r l e c v v s g i t i s a t s v y w y r e r p g e v i q f l v s i s y d g t v r
 5 k e s g i p s g k f e v d r i p e t s t s t l t i h n v e k q d i a t y y c a l
 w e i q e l g k k i k v f g p g t k l i i t d k q l d a d v s p k p t i f l p
 s i a e t k l q k a g t y l c l l e k f f p d v i k i h w e e k k s n t i l g
 s q e g n t m k t n d t y m k f s w l
 10 t v p e k s l d k e h r c i v r h e n n k n g v d q e i i f p p i k t d v i t
 m d p k d n c s k d a n d t l l l q l t n t s a y y m y l l l l l k s v v y f
 a i i t c c l l r r t a f c c n g e k s

Secuencia de aminoácidos de Fe11 de TRD: SEQ ID NO: 17

15 m v f s s l l c v f v a f s y s g s s v a q k v t q a q s s v s m p v r k a
 v t l n c l y e t s w w s y y i f w y k q l p s k e m i f l i r q g s d e q
 n a k s g r y s v n f k k a a k s v a l t i s a l q l e d s a k y f c a l g d
 20 s y g g g p l y t d k l i f g k g t r v t v e p r s q p h t k p s v f v m k
 n g t n v a c l v k e f y p k d i r i n l v s s k k i t e f d p a i v i s p s
 g k y n a v k l g k y e d s n s v t c s v q h d n k t v h s t d f e v k t d
 s t d h v k p k e t e n t k q p s k s c h k p k a i v h t e k v n m m s l t
 v l g l r m l f a k t v a v n f l l t a k l f f l

Secuencia de aminoácidos de Fe11 de TRG: SEQ ID NO: 18

25 m g w a l l v l l a f l s p a s q k s s n l e g g t k s v t r p t r s s a e i t
 c d l t v i n a f y i h w y l h q e g k a p q r l l y y d v s n s k d v l e
 30 s g l s p g k y y t h t p r r w s w i l i l r n l i e n d s g v y y c a t w d
 r p e i y y k k l f g s g t t l v v t d k q l d a d v s p k p t i f l p s i a e
 t k l q k a g t y l c l l e k f f p d v i k i h w e e k k s n t i l g s q e g
 n t m k t n d t y m k f s w l t v p e k s l d k e h r c i v r h e n n k n g
 35 v d q c i i f p p i k t d v i t m d p k d n c s k d a n d t l l l q l t n t s
 a y y m y l l l l l k s v v y f a i i t c c l l r r t a f c c n g e k s

Ejemplo 2

Material y métodos

40 Paciente, toma de muestra y líneas celulares

[0228] Todo el material de donantes y pacientes se recolectó de acuerdo con las normas de BPC y Helsinki. Las muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos y pacientes con leucemia 45 mieloide aguda (LMA) procedían del Biobanco del Centro Médico Universitario de Utrecht. El uso de las muestras de pacientes con TNBC fue aprobado por el comité de ética del Centro Médico de la Universidad de Friburgo. Del archivo del Instituto de Patología Clínica de Friburgo, seleccionamos 16 muestras de tejido fijadas con formalina e incluidas en parafina con el diagnóstico de "TNBC". El diagnóstico histopatológico se realizó según los criterios de Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC). Todos los tumores fueron de grado III en la clasificación modificada de 50 Bloom-Richardson (Elston). De acuerdo con las recomendaciones para la evaluación de TIL (14 15), las muestras teñidas con HyE contenían al menos un 50 % de infiltración tumoral. La cohorte de 11 tumores (5 carcinomas medulares de mama y 6 carcinomas ductales invasivos) que estudiámos más a fondo se seleccionó sobre la base de que las muestras de tejido congelado correspondientes estaban disponibles en el banco de tumores del Centro Integral del Cáncer de Friburgo (Comprehensive Cancer Center Freiburg) (CCCF). Todas estas muestras se 55 clasificaron como subtipo basal según la expresión de CK 5/6 o 14 y EGFR (16). La edad media de los pacientes fue de 59 años en un rango entre 43 y 82 años.

[0229] Se analizaron líneas celulares de cáncer de mama y material tumoral congelado para detectar CMVH mediante PCR anidada con IHC según el protocolo publicado previamente por Bender et al. (17), y PCR en tiempo real con el kit artus® CMV TM PCR (Qiagen, Hilden, Alemania) en un ciclador de PCR en tiempo real 7900HT Fast (Applied Biosystems, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante.

Secuenciación de nueva generación del repertorio de TCR δ y TCR β

[0230] El protocolo es una adaptación de Mamedov et al. con modificaciones (18). Las PBMC congeladas de donantes sanos se descongelaron y se tiñeron con los siguientes anticuerpos: anticuerpos monoclonales (mAb) CD3 eFluor 450, TCR αβ APC y TCR γδ PE. (Tabla 6. Las muestras se clasificaron en el ARIAI (BD) en una fracción αβ (CD3+, αβ+) y una fracción γδ (CD3+, γδ+). El ARN se aisló utilizando el Qiagen Rneasy Minikit para muestras $\geq 0,5 \times 10^6$ células o el Qiagen Rneasy Microkit para muestras $< 0,5 \times 10^6$ células siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc específico para TCR δ y TCR β se sintetizó con la transcriptasa inversa Superscript® II (Thermofisher) utilizando un cebador específico en la región constante 3' y se incorporó un adaptador de cambio de molde universal en el extremo 5' de la región V. El ADNc se purificó utilizando NucleoSpin® Gel y PCR Clean-UP (Machery-Nagel) y luego se amplificó con una primera amplificación por PCR utilizando la ADN polimerasa Q5® High Fidelity (New England Biolabs), en un termociclador T100 (Biorad) siguiendo los siguientes pasos: 90 s a 98 °C, 15 ciclos de 7 s a 98 °C, 20 s a 62 °C, 50 s a 72 °C, seguido de 10 m a 72 °C. Se utilizó un cebador anidado específico en la región constante y un cebador de transición que se hibrida con el adaptador de cambio (tabla 5). Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1,5 % para la selección de tamaño de productos entre 400-600 pares de bases. Después de la purificación del gel con NucleoSpin® Gel y PCR Clean-UP (Machery-Nagel), el producto de PCR se utilizó para una segunda PCR con un cebador anidado inverso en la región constante y un cebador directo que se hibridó sobre el adaptador de cambio (tabla 5), utilizando los siguientes pasos: 90 s a 98 °C, 20 ciclos de 7 s a 98 °C, 20 s a 62 °C, 50 s a 72 °C, seguido de 10 m a 72 °C. Después de la purificación con NucleoSpin® Gel y PCR Clean-UP (Machery-Nagel), los productos finales de PCR se analizaron con QIAxcel Advanced System (Qiagen). La preparación de la biblioteca para NGS se realizó con el kit NGSGo-LibrX con índices NGSGo-IndX de Gendx según las recomendaciones del fabricante. La limpieza de las muestras se realizó con perlas de PCR HighPrep de GC Biotech. La secuenciación de nueva generación se realizó en un sistema Illumina MiSeq 500 (2x250 pb) (Illumina). Los datos de secuenciación se analizaron con el programa MiXCR (Bolotin, et al. (18)) y con las herramientas VDJ para realizar análisis posteriores.

Inmunohistoquímica (IHC) y análisis de imágenes de muestras de TNBC

[0231] Las secciones seriadas de FFPE de 2 μm montadas en portaobjetos de vidrio Superfrost plus (R Langenbrink, Alemania) se desparafinaron y se rehidrataron. Después de la recuperación adecuada del antígeno en una olla a presión con tampón citrato (pH 6) y tampón citrato (pH 6,1) (Dako, Hamburgo, Alemania), se realizó el bloqueo de la unión no específica utilizando suero de cabra (5 % en PBS). MAb monoclonal de ratón anti-cadena de TCRy y antisuero policlonal de conejo anti-caspasa 3 escindida humana (cC3) (tabla 6) como mencionamos previamente (19). La detección de CMVH se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CMV. Se utilizaron sistemas de detección conjugados con fosfatasa alcalina y conjugados con peroxidasa de rábano picante para visualizar los anticuerpos primarios en protocolos separados o secuenciales para pruebas de tinción simple o doble con cromógeno rojo y marrón (DakoREAL™ Alkaline Phosphatase/RED r/m y EnVision™ FLEX Systems, Dako, EE. UU.). Se utilizó hematoxilina ácida como contratinación.

[0232] Las muestras de IHC se analizaron y escanearon en mosaico utilizando un sistema AxioObserver Z1 con Apotome2 y una cámara digital ERc5s. El análisis inicial se realizó con el software de imágenes AxioVision 4.8 y ZEN BLUE (todos de Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Alemania). La colocalización y el análisis cuantitativo se realizaron con el software ImageJ (NIH images, EE. UU.) y QuPath (GitHub, San Francisco, CA, EE. UU.) con los complementos Bio-Formats, Stack Slicer y Cell counter (20).

Formación de imágenes de inmunofluorescencia de muestras de TNBC

[0233] Se montaron secciones de 5 μm en portaobjetos de vidrio Superfrost plus Adhesion, se secaron al aire durante 3 horas y se fijaron con acetona preenfriada (-20 °C) durante 10 minutos. Las muestras se enjuagaron con TBST durante 5 minutos (3X) y se bloquearon para la unión no específica utilizando suero humano normal al 5 % en PBS durante 30 minutos. Las muestras se incubaron con los mAb primarios humanos anti-ratón correspondientes: mAb anti-TCRy y anti-CD69 o antisueros policlonales humanos anti-cabra anti-IFN-γ y anti-IL-17. Los anticuerpos secundarios conjugados con fluorescencia usados para visualizar los anticuerpos primarios fueron AlexaFluor 488 de conejo anti-ratón, AlexaFluor 568 de burro anti-conejo, AlexaFluor 594 de burro anti-cabra y AlexaFluor 647 de burro anti-cabra (tabla 6). Las muestras se montaron usando el medio Prolong® Diamond Antifade con DAPI (Thermo Fischer).

Inmunotinción tisular y microdissección por captura láser de muestras de TNBC

60

- [0234] Las secciones congeladas (8 µm de grosor) se secaron al aire durante toda la noche en portaobjetos cubiertos con membrana MembraneSlide 1.0 PEN™ (Carl Zeiss, Munich, Alemania), se fijaron en acetona preenfriada (-20 °C) durante 10 min, se lavaron dos veces con TBST y se incubaron durante 30 min con suero humano al 5 % en PBS. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con el mAb humano anti-ratón TCR γ (tabla 6).
- 5 Para detectar el anticuerpo primario, se utilizó un anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado con sistema de detección de fosfatasa alcalina (Dako REAL™ Detection System Alkaline P/RED, rabbit-mouse). Se utilizó hematoxilina de Mayer como colorante de contraste. Las muestras se secaron a temperatura ambiente durante 2 horas, se examinaron bajo microscopio y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento.
- 10 [0235] La microdisección láser se realizó usando un microscopio Axiovert equipado con un sistema PALM MicroBeam (ZEISS Microscopy, Oberkochen, Alemania). Los parámetros energéticos de corte y catapultado se establecieron individualmente para cada muestra. Solo se seleccionaron linfocitos individuales infiltrados en estrecho contacto con células cancerosas con un aumento de 40x y se microdiseccionaron con un aumento de 63X. Las células individuales fueron llevadas a la tapa de un tubo Adhesive Cap 500 opaque™ de 500 µl (Carl Zeiss, 15 Göttingen, Alemania). Para mejorar el aislamiento, la tapa contenía 5 µl de tampón de PCR 1X Expand High Fidelity sin MgCh (Roche, Mannheim, Alemania). A continuación, se añadieron 15 µl de una mezcla 1:10 que contenía tampón de PCR y proteinasa K (20 mg/ml, grado PCR, Roche, Mannheim, Alemania) para la digestión. Los tubos se incubaron con la tapa bajada durante 4 h a 56 °C, se centrifugaron durante 2 min a 500 r.p.m. y se inactivaron por calor a 95 °C durante 10 min. Se diseccionaron tubos adicionales que contenían solo membrana de cada muestra y 20 se utilizaron como controles negativos. Todos los tubos de PCR se cubrieron con aceite mineral bajo una campana de flujo laminar antes de agregar la mezcla maestra de PCR.

PCR de células individuales de TIL γδ de TNBC

- 25 [0236] El aislamiento de ADN, la primera y la segunda ronda de PCR se realizaron en diferentes "salas de células individuales" bajo una cabina de flujo laminar previamente descontaminada con lámpara UV, etanol y DNA Zap (Invitrogen, Bleiswijk, Países Bajos). Se utilizaron conjuntos separados de pipetas, consumibles y reactivos para cada paso y cada dos semanas se probaron todos los reactivos para evitar la contaminación. En correspondencia con la técnica de PCR de una célula individual descrita previamente para el análisis de genes de inmunoglobulina 30 reordenados (21), se preparó una PCR de inicio en caliente, semianidada y multiplexada con 15 cebadores de nuevo diseño (tabla 7). Para la primera ronda, se preparó una mezcla maestra con 5 µl de dNTP (2 mM), 5 µl de tampón de PCR 10X (High Fidelity System), 5 µl de mezcla de cebadores (2,5 µM, cebadores directos e inversos), 3,2 µl de MgCl₂ 25 µM, 6,5 µl de H₂O y 15 µl de la digestión del ADN. Se añadió un volumen de 0,3 µl de mezcla enzimática Expand High Fidelity (3,5 unidades/µl) después del primer paso de desnaturización hasta un volumen final de 40 µl. 35 El programa del ciclador fue 95 °C 2 min, 80 °C de pausa (enzima añadida), 72 °C 1 min, 39x (95 °C 50 s, 56 °C 30 s, 72 °C 60 s), 72 °C 5 min y 10 °C de pausa. Para la segunda ronda, se prepararon ocho mezclas maestras para detectar las cadenas de TCR γ y δ: dos mezclas para TCR γ (Vγ1-8 y Vγ9) y seis para TCR δ (Vδ1, Vδ2, Vδ3, Vδ4, Vδ5 y Vδ6) (tabla complementaria 4) con 2,5 µl de dNTP (2 mM), 2,5 µl de tampón de PCR 10X, 1,25 µl de los respectivos cebadores directos Vγ y Vδ, 1,25 µl de los respectivos cebadores de mezcla conjunta, 2 µl de MgCh 25 mM, 12,2 µl de H₂O, 3 µl del producto de PCR de la primera ronda y 0,3 µl de mezcla enzimática Expand High Fidelity (3,5 unidades/µl). El programa del ciclador fue 95 °C 5 min, 72 °C 1 min, 35x (95 °C 50 s, 55,5 °C 30 s, 72 °C 1 min), 72 °C 5 min, 15 °C 5 min y 4 °C de pausa. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % y las bandas positivas se cortaron bajo luz UV y se purificaron del gel con el kit de extracción de gel Qiaex II (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN limpio se secuenció utilizando el sistema BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, CA, EE. UU.), las reacciones de secuenciación consistieron en 1 µl de BigDye, 3,75 µl de tampón de secuenciación 5X, 0,75 µl de cebador directo, 3-10 µl de molde y agua hasta un volumen final de 20 µl. Las condiciones del ciclador fueron 96 °C 5 min, 24x (95 °C 15 s, 50 °C 10 s, 60 °C 4 min), 10 °C de pausa. La muestra de secuencia se limpió usando el kit de centrifugación DyeEx 2.0 (Qiagen) y se analizó en el secuenciador capilar ABI 3130XI (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Comparamos y evaluamos las secuencias con la base de datos IMGT (<http://www.imgt.org/>) y la herramienta IgBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)
- 40
- 45
- 50

Expresión retroviral de plásmidos de TIL γδ de TNBC

- 55 [0237] Se solicitó a Baseclear Inc. la codificación de ADN optimizada por codones para las cadenas de TCR γ y δ de longitud completa de los linfocitos infiltrantes de tumores y para el EPCR de longitud completa. Los genes sintéticos se flanquearon con un sitio Ncol 5' y un sitio BamHI 3' para la clonación posterior en un vector de expresión retroviral pBullet. Los genes de TCR γ se subclonaron en pBullet-IRES-neo y los genes de TCR δ y EPCR se subclonaron en pBullet-IRES-puromicina.

- 60 **Transducción de células T αβ.**

[0238] Para la generación de TEG, las PBMC se transdujeron con cadenas de TCR γ y δ definidas como se describió (22-24). En resumen, el sobrenadante retroviral se produjo mediante células empaquetadoras Phoenix-Ampho, que se transfecaron con gag-pol (pHIT60), env (pCOLT-GALV) y construcciones retrovirales pBullet que contenían TCR γ o δ, utilizando Fugene HD (Promega). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) preactivadas con CD3a (30 ng/ml) (clon OKT3, Janssen-Cilag) e IL-2 (50 U/ml) se transdijeron dos veces con sobrenadante viral en 48 horas en presencia de 50 U/ml de IL-2 y 4 µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich). Las células T transducidas se expandieron mediante estimulación con Dynabeads CD3/CD28a ($0,5 \times 10^6$ perlas/ 10^6 células) (Invitrogen) e IL-2 (50 U/ml) y se seleccionaron con 800 µg/ml de genetina (Gibco) y 5 µg/ml de puromicina (Sigma-Aldrich) durante una semana. Después de la transducción, las células T transducidas se estimularon quincenalmente con 1 µg/ml de PHA-L (Sigma-Aldrich), 50 U/ml de IL-2 (Novartis Pharma), 5 ng/ml de IL-15 (R&D Systems) y PBMC alógénicas irradiadas, células Daudi y LCL-TM. Se añadió IL-2 fresca dos veces por semana. La expresión de TCR transgénico se evaluó de forma rutinaria mediante citometría de flujo.

Ensayos funcionales de clones primarios y TEG

[0239] ELISPOT de IFNy se realizó como se describió previamente (25, 26). Brevemente, se cocultivaron 15000 células T transducidas con TCR o transducidas de forma simulada y 50000 células diana (proporción 0,3:1) durante 24 horas en placas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa (Millipore) recubiertas previamente con anticuerpo anti-IFNy (clon 1-D1K) (Mabtech). Las placas se lavaron e incubaron con un segundo anticuerpo anti-IFNy biotinilado (clon 7-B6-1) (Mabtech) seguido de estreptavidina-HRP (Mabtech). Las manchas de IFNy se visualizaron con sustrato TMB (Sanquin) y la cantidad de manchas se cuantificó utilizando el software de análisis ELISPOT (Aelvis). ELISA de IFNy se realizó utilizando el kit ELISA-ready-go! (eBioscience, San Diego, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células efectoras y diana (E:T 1: 1) se incubaron durante 24 h en presencia de pamidronato cuando estaba indicado.

Tinción del tetrámero CD1

[0240] Los tetrámeros CD1c y CD1d se produjeron como se describió anteriormente (27). Las TEG se tiñeron con el anticuerpo TCR-APC anti-γδ (tabla 5) y tetrámeros de estreptavidina-PE CD1 a una concentración de 50 nM en PBS + BSA al 0,5 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados, las células se analizaron mediante citometría de flujo en un sistema BD FACSCanto II.

Modelo de ratón para TEG001

[0241] Los ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rgtm1Wjl/SzJ (NSG), obtenidos originalmente de JAX (Bar Harbor, ME, EE. UU.), fueron criados y alojados en la unidad de cría libre de patógenos específicos (SPF) de la instalación central para animales (Central Animal Facility) de la Universidad de Utrecht. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las pautas institucionales después de obtener el permiso del comité ético local y de acuerdo con las leyes holandesas actuales sobre experimentación animal. Para los experimentos se utilizaron ratones de 8 a 12 semanas de edad. El día 0, los ratones recibieron una irradiación corporal total subletal (175 cGy) seguida de una inyección intravenosa de 5×10^6 células tumorales OPM2-Luc el día 1. Los ratones fueron tratados con 10^7 células TEG001 o células T transducidas con TCR de manera simulada por vía intravenosa los días 7 y 14. Los ratones recibieron $0,6 \times 10^6$ UI de IL-2 en IFA por vía subcutánea el día 7 y cada 21 días hasta el final del experimento. Se aplicó pamidronato (10 mg/kg de peso corporal) el día 7 por vía intravenosa y cada 21 días hasta el final del experimento. Los tumores se visualizaron *in vivo* mediante imágenes bioluminiscentes. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano antes de recibir una inyección intraperitoneal (100 µl) de 25 mg/ml de luciferina de escarabajo (Promega, Madison WI). Se adquirieron imágenes de bioluminiscencia utilizando una cámara intensificada por GaAs refrigerada de tercera generación, controlada por el software Photo Vision y analizada con el software M3Vision (todo de Photon Imager; Biospace Laboratory, París, Francia).

Resultados

Identificación de secuencias compartidas de TCR δ con secuenciación de nueva generación.

[0242] Para comprender la implicación funcional de los receptores inmunes compartidos dentro del repertorio de TCR δ, analizamos las cadenas de TCR δ de 14 donantes sanos diferentes (conjunto de datos 1). Después de clasificar las células T γδ por citometría de flujo, seguida de análisis del repertorio de TCR δ por NGS, encontramos 9011 secuencias de aminoácidos de la región CDR3 (CDR3δ) de TCR δ. Un análisis posterior de las secuencias más abundantes por donante, definidas como secuencias con una frecuencia clonal de >0,1 % (n=1478), mostró que el 1,8 % de las secuencias eran compartidas entre al menos dos donantes. De estas secuencias compartidas, una se compartió entre tres donantes diferentes (tabla 8). El solapamiento de secuencias de TCR δ entre 2 donantes

5 diferentes difirió entre el 0 y el 3,9 % de las secuencias de los 2 donantes (figura 5A). En cambio, en el repertorio de TCR β , solo se compartieron el 0,7 % de las secuencias. Identificamos 6 secuencias compartidas y el solapamiento entre 2 donantes diferentes varió de 0 a 1,9 % (figura 5B). Como era de esperar para los repertorios de sangre periférica, la mayoría de las secuencias identificadas fueron V δ 2+ (figura 6A). En consonancia con esto, la mayoría de las secuencias compartidas también eran V δ 2. Además, identificamos cuatro secuencias de V δ 1 compartidas.

Análisis de los repertorios de TCR δ en los tejidos infiltrantes de tumores

10 [0243] Los repertorios inmunes de las células T $\gamma\delta$ en individuos sanos entre la sangre periférica y los tejidos difieren sustancialmente (28), aunque se ha constatado que las secuencias de TCR δ identificadas en el tejido podrían rastrearse hasta la sangre periférica (28). Para analizar si esto mismo es válido para los linfocitos infiltrantes de tumores $\gamma\delta$ (TIL $\gamma\delta$), comparamos las secuencias del repertorio periférico de TCR δ (conjunto de datos 1-4) con un quinto conjunto de datos que consta de secuencias de TCR δ de TIL $\gamma\delta$ publicadas y un conjunto de datos de acceso público de Li et al. El conjunto de datos de Li et al. consistió en secuencias de CDR3 de TIL de varios tumores con 15 1060 secuencias de CDR3 δ completas. De acuerdo con la suposición de que las células T $\gamma\delta$ V δ 2 neg son la fracción dominante en los tejidos, solo el 19 % de las secuencias de TCR δ se clasificaron como TCR δ de V δ 2. La mayoría de las secuencias eran de origen V δ 1, pero en comparación con los repertorios sanos, también aumentaron las fracciones V δ 3, V δ 5, V δ 7 y V δ 8. Aunque el porcentaje de secuencias de TCR δ de V δ 2 en el tejido tumoral es relativamente bajo, aún así se pudieron identificar 24 secuencias de V δ 2 compartidas (figura 5C). Curiosamente, una vez que las células T periféricas se han Enriquecido en gran medida con células T $\gamma\delta$ 2V61 antes de los análisis de NGS (conjunto de datos 3), se pudieron caracterizar 10 secuencias de V δ 1 como compartidas entre la sangre periférica y los TIL $\gamma\delta$ (figura 5D). Aunque estos datos demuestran que es posible identificar secuencias compartidas entre los TIL $\gamma\delta$ y la sangre periférica, también ilustran la limitación de este método debido a la diferente composición 20 del repertorio de TCR δ entre la sangre periférica y los tejidos cancerosos.

25 Análisis de células individuales de TIL $\gamma\delta$ en pacientes con cáncer de mama triple negativo

30 [0244] Para analizar en profundidad las secuencias del receptor de TIL $\gamma\delta$ entre pacientes con cáncer individuales en el sitio del tumor, se utilizó una cohorte de TNBC caracterizada previamente. Los TIL $\gamma\delta$ en el TNBC se han asociado con niveles elevados del marcador apoptótico caspasa 3 escindida en el sitio del tumor (29). Para identificar TIL $\gamma\delta$ con proximidad cercana a células tumorales apoptóticas, los tejidos embebidos en parafina se tiñeron conjuntamente 35 para TCR $\gamma\delta$ y caspasa-3 escindida usando IHC. Se observaron TIL $\gamma\delta$ con alta frecuencia en todas las biopsias examinadas y las células tumorales apoptóticas estaban en contacto con las células T $\gamma\delta$ (figura 7A). La expresión de CD69, como se evidencia por IHC (figura 7B), sugirió una activación mediada por el receptor de células T de los TIL $\gamma\delta$. Se han descrito funciones conflictivas de los TIL $\gamma\delta$, como la vigilancia inmunológica del cáncer (30) o las propiedades promotoras de tumores a través de IL-17 (31). Por lo tanto, se evaluó más a fondo la expresión de IFN γ e IL-17 mediante IHC. La mayoría de los TIL $\gamma\delta$ eran IFN γ positivos y no se tiñeron sustancialmente para IL-17, lo que sugiere que, de hecho, los TIL $\gamma\delta$ investigados se activan con un tipo Th1 y que las células T $\gamma\delta$ son un participante activo de la vigilancia inmunológica diaria del cáncer.

40 Diversidad y compartición de cadenas de TCR γ y δ derivadas de TIL $\gamma\delta$

45 [0245] Primero se analizó la diversidad y la expansión clonal de los TIL $\gamma\delta$ en pacientes individuales con TNBC mediante la espectrotipificación de los genes V γ y V δ . Estos datos confirmaron que el uso de los genes V γ y V δ por parte de las células T $\gamma\delta$ que se infiltran en el tumor es policonal en la mayoría de los pacientes. Estos datos también se confirmaron para cinco de las muestras de cáncer de mama mediante NGS de las secuencias delta (conjunto de datos 7, figura 6B). Sin embargo, con una media del 68,9 %, la proporción de células T V δ 2 parecía ser mayor en los datos de cáncer de mama de NGS que la observada en otros tejidos tumorales (figura 6B). Lo más probable es que esto se deba a la fuerte vascularización de los tejidos investigados. Los genes V δ 3 y V δ 5 se enriquecieron 50 nuevamente en el tejido tumoral, lo que sugiere que estos subconjuntos podrían ser funcionalmente importantes en la vigilancia inmunológica del cáncer. A continuación, buscamos secuencias públicas de TCR δ en los datos de cáncer de mama de NGS. Se compartieron 52 secuencias V δ 2 con los conjuntos de datos de donantes sanos y se compartieron 3 secuencias con el conjunto de datos de TIL $\gamma\delta$ (figura 5C). Curiosamente, una secuencia de V δ 3 que también estaba presente en las secuencias de TIL $\gamma\delta$ también se encontró dentro de este conjunto de datos de TIL 55 de cáncer de mama (figura 5E). No se observaron más secuencias compartidas de V δ 1 (figura 5D). En resumen, el análisis de esta cohorte bastante única y homogénea indica que el repertorio de células T $\gamma\delta$ en el tejido tumoral es bastante diverso y que, a pesar de cierta frecuencia aumentada de V δ 3 y V δ 5 en nuestra cohorte de TNBC, pero también en un conjunto de datos de TIL $\gamma\delta$ (32) de Li et al., no se puede observar una expansión clonal sustancial entre los TIL $\gamma\delta$.

60

[0246] A continuación, nos propusimos evaluar si las cadenas de TCR γ o δ individuales compartidas estaban implicadas en una interacción tumoral de células T $\gamma\delta$ cognada. Por lo tanto, se aislaron células individuales de secciones de TNBC congeladas mediante microdissección láser y se transfirieron a un tubo de PCR para determinar la secuencia de TCR mediante secuenciación de células individuales. En total, se aislaron 530 células T $\gamma\delta$ individuales de 11 tumores diferentes y se pudieron identificar 27 secuencias de TCR γ y δ pareadas de 9 pacientes diferentes (conjunto de datos 6, tabla 9). Las otras reacciones de secuenciación de células individuales no dieron como resultado datos de secuenciación confiables para las cadenas de TCR γ y/o δ ; sin embargo, pudimos determinar 63 secuencias de CDR3 y no pareadas adicionales y 28 secuencias de CDR3 δ no pareadas adicionales. Las otras reacciones de secuenciación de células individuales no dieron como resultado datos de secuenciación confiables para las cadenas de TCR γ y δ ; sin embargo, pudimos determinar 63 secuencias de CDR3 y no apareadas adicionales y 28 secuencias de CDR3 δ no apareadas adicionales. Como se esperaba de nuestros análisis de TIL en muchos pacientes con cáncer, así como de nuestro análisis de células T $\gamma\delta$ infiltradas en tumores en pacientes que padecen TNBC. Los genes que no eran Vy9 ni V δ 2 fueron los más prominentes en las secuencias obtenidas. El gen V δ 2 se utilizó en 7 de las 55 secuencias de TCR δ y el gen Vy9 en 21 de las 90 secuencias de TCR γ . Curiosamente, 4 de los 27 clones utilizaron una secuencia de V δ 5 idéntica pareada con una secuencia de TCR γ diferente (tabla 9). Además, esta secuencia de V δ 5 también se identificó en 6 secuencias de CDR3 δ no pareadas (figura 8A). Esta secuencia se encontró en 6 de 11 pacientes, lo que la clasifica como una secuencia de CDR3 pública. También se ha constatado que esta secuencia particular se asocia con la reactividad del CMV y tumoral (33). Sin embargo, sorprendentemente, ninguno de los pacientes que compartían esta secuencia de TCRV δ 5 particular era CMV positivo. Se compartieron dos secuencias de V δ 1 entre dos pacientes diferentes. Como control de calidad adicional, pudimos recuperar cuatro de las secuencias de TRD de células individuales dentro del conjunto de datos de NGS de TNBC: tres secuencias del paciente E y una secuencia del paciente F, lo que indica que muchos receptores detectados por la secuenciación de células individuales podrían ser de muy baja frecuencia y, por lo tanto, no visibles a través de NGS de los repertorios de TCR δ .

[0247] La cadena de TCR γ se compartió con mayor frecuencia entre las células T aisladas de las 90 secuencias obtenidas en total, 10 secuencias diferentes se compartieron entre los pacientes. Se compartió una secuencia entre 5 pacientes y se identificó en 10 células aisladas diferentes. Esta secuencia se encontró en 4 de los 27 clones de $\gamma\delta$ pareados. Otra secuencia de CDR3 γ fue compartida entre 3 pacientes y algunas otras fueron compartidas entre dos pacientes (figura 8B). Además, se constató una célula T que compartía la cadena de TCR γ con un clon de célula T restringida a CD1d identificado previamente (34). En resumen, se pueden encontrar muchas cadenas de TCR γ compartidas y cadenas de TCR V δ 2^{neg} dentro del microambiente tumoral local; sin embargo, a diferencia de los repertorios de células T $\gamma\delta$ en la sangre periférica, los repertorios están dominados por células T $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} y carecen de una expansión clonal sustancial.

Evaluación funcional de TCR $\gamma\delta$ seleccionados del repertorio de células T $\gamma\delta$ periféricas e infiltrantes de tumorales

[0248] Para probar nuestra hipótesis de que las cadenas de TCR γ o δ compartidas del repertorio inmunológico periférico y residente en el tejido contribuyen funcionalmente a la vigilancia inmunológica diaria del cáncer, completamos primero el TCR γ correspondiente para TCR δ compartidos seleccionados del repertorio periférico. Esto se realizó mediante clonación de células individuales para células T $\gamma\delta$ V δ 2⁺ (23) o V δ 2^{neg}(25) y secuenciamos ambas cadenas de TCR γ y δ . Identificamos una cadena y correspondiente a la cadena compartida de TCRV δ 2, Clon 5, como se mencionó recientemente (23). La cadena de TCR δ del clon 5 que expresa TCRV $\gamma\delta$ 2 se encontró en el donante sano 11 del conjunto de datos 1. Se ha constatado que esta combinación particular es muy activa contra muchos tipos de células hematológicas y cancerosas sólidas (22, 23). Para ampliar aún más los análisis sobre la actividad de las cadenas de TCR γ y δ aisladas del clon 5 en comparación con las células T $\gamma\delta$ en masa, se modificaron genéticamente células T $\text{c}\beta$ para expresar este TCR $\gamma\delta$ definido (TEG001) (23, 25, 26). TEG001 no solo mostró una actividad superior a diferentes líneas celulares tumorales en comparación con las células T $\gamma\delta$ en masa (figura 9A), sino también a una variedad de blastos primarios de leucemia mieloide aguda (figura 9B). Estos datos sugieren que el subtipo Vy $\gamma\delta$ 2 de TCR que utiliza cadenas compartidas de TCR δ puede mediar una alta actividad funcional y superar funcionalmente a la mayoría de las células T $\gamma\delta$.

[0249] Para caracterizar funcionalmente aún más las cadenas compartidas de TCR δ de las células T V δ 2^{neg} de los donantes sanos del repertorio periférico, se aislaron y clonaron células T V δ 2^{neg} $\gamma\delta$, como se constató (25) a partir de donantes sanos adicionales, se evaluó su reactividad mediante un ensayo ELISPOT de IFN γ contra un panel de células tumorales definido y se secuenciaron para la cadena de TCR γ y δ correspondiente. De los 10 clones de células T V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ aislados, 3 clones mostraron reactividad contra diferentes líneas celulares cancerosas (figura 10A). La secuenciación de todos los clones investigados funcionalmente identificó al clon FE11 como un clon que comparte su cadena de TCR δ 1 también con los donantes 13 y 19 del conjunto de datos 1. Para investigar si la

reactividad tumoral de FE11 está mediada únicamente por la cadena de TCR $\gamma\delta$, introdujimos las cadenas de TCR γ y δ del clon FE11 en células T $\alpha\beta$ (TEG-011), y probamos la actividad de FE11 contra un panel de líneas celulares tumorales mediante un ensayo ELISA de IFNy, y confirmamos los resultados como se vio con el ensayo ELISPOT (figura 10A). En resumen, se pueden identificar diversos clones de células T $V\delta2^{neg}$ $\gamma\delta$ a partir de la sangre periférica, que reconocen de manera complementaria diferentes líneas celulares tumorales. Además, el clon FE11 con un TCR δ compartido muestra reactividad tumoral.

[0250] Para confirmar funcionalmente que también los TCR $\gamma\delta$ de los TIL $\gamma\delta$ tienen el potencial de mediar la reactividad tumoral y que esta reactividad está mediada al menos parcialmente por sus cadenas de TCR γ o δ individuales compartidas, generamos una serie de 15 TEG expresando cadenas de TCR γ y δ pareadas derivadas de nuestros TIL $\gamma\delta$ de cáncer de mama (tabla 9). En consonancia con la reactividad observada de los clones de células T $V\delta2^{neg}$ $\gamma\delta$ de la sangre periférica, 5 de cada 10 TEG con cadenas de TCR γ o δ compartidas mostraron una reactividad complementaria contra diferentes tipos de líneas celulares cancerosas. Uno de los 15 TCR $\gamma\delta$ con una secuencia de receptor compartida mostró una reactividad muy amplia, concretamente TEG-Zi11, mientras que los otros 5 clones tuvieron una reactividad más restringida contra distintas líneas celulares cancerosas dentro del panel analizado (figura 10B). Cabe destacar que el complejo TCR $\gamma\delta$ ampliamente reactivo de TEG-Zi11 utiliza una cadena γ compartida con TEG-B23 y TEG-Ze11, que no responden a las líneas celulares cancerosas analizadas, lo que indica en este caso que la cadena δ única de TEG-Zi11 es necesaria para la reactividad tumoral. En consonancia con esta observación, el complejo TCR $\gamma\delta$ de TEG-F4, que tiene una reactividad restringida con algunas líneas celulares tumorales, compartió su cadena γ con el TCR no reactivo de TEG-E20, y el complejo TCR $\gamma\delta$ de TEG-B9, que comparte su cadena γ con un TCR $\gamma\delta$ reactivo a CD1d mencionado previamente (34), no se unió al tetrámero CD1d cuando la cadena de TCR δ única mencionada no estaba presente (figura 12). Por lo tanto, una cadena de TCR γ compartida puede formar parte de un TCR $\gamma\delta$ reactivo al tumor, pero eso en sí mismo no es suficiente para la reactividad. Por el contrario, TEG-C132, TEG-D37, TEG-E113 y TEG-B23, que comparten la misma cadena de $\delta 5$, fueron activos contra diferentes líneas celulares cancerosas, a saber, K562 para TEG-B23, TEG-D37 y TEG-C132, U937 para TEG-B23, TEG-D37 y TEG-E113 (figura 10B). Por lo tanto, los complejos TCR $\gamma\delta$ compuestos por cadenas de $V\delta2$ y $V\delta2^{neg}$ compartidas tienen una capacidad integral y complementaria para atacar a diferentes tipos de células cancerosas y las cadenas compuestas por $V\delta5$ podrían ser participantes particularmente importantes en la vigilancia inmunológica del cáncer.

Actividad *in vivo* de las cadenas públicas de TCR δ dentro del concepto terapéutico de las TEG

[0251] La ingeniería de células inmunes para la terapia inmunológica del cáncer ha sido reconocida como un avance científico (35) y se necesita urgentemente la nueva generación de receptores de antígenos químéricos (CAR) para superar las limitaciones actuales, como la disponibilidad restringida de antígenos tumorales (36). Las TEG se han considerado recientemente como un nuevo e interesante giro en esta estrategia (36) y, por lo tanto, probamos si no solo los complejos TCR $\gamma\delta$ artificiales (22, 23) sino también los complejos TCR $\gamma\delta$ naturales con secuencias parcialmente públicas de TCR δ pueden formar parte de la nueva generación de TEG. Por lo tanto, la actividad de TEG001 se probó *in vivo* en un modelo murino de mieloma múltiple utilizando OPM2 como diana (22). Como control negativo se utilizaron TEG que expresaban una cadena de TCR $\gamma\delta$ no funcional LM1 (23). Las TEG se infundieron 7 y 14 días después de la inoculación de OPM2. El tratamiento con TEG001, en comparación con TEG-LM1, produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral y, en este modelo de tratamiento, también se asoció con una supervivencia general significativamente prolongada (figura 11), lo que indica que los complejos TCR $\gamma\delta$ compuestos de parcialmente públicas cadenas de TCR son una herramienta valiosa para la terapia inmunológica contra el cáncer con TEG.

Explicación

[0252] Tres tipos de células inmunes experimentan recombinación de ADN somático durante su ontogenia. Se han dilucidado en gran medida numerosas funciones de dos de ellas, las células T $\alpha\beta$ y las células B, durante las respuestas inmunitarias. Por el contrario, se dispone de información relativamente muy limitada sobre el repertorio y la función inmunológica del tercer tipo de células que experimentan recombinación de ADN somático durante su ontogenia, las células T $\gamma\delta$. En el presente documento intentamos iluminar este territorio desconocido mediante el análisis de los repertorios de TCR $\gamma\delta$ utilizando técnicas combinadas de secuenciación de células individuales y de nueva generación de alto rendimiento y encontramos evidencia de la participación de las cadenas públicas de TCR $V\delta2^+$ y $V\delta2^{neg}$ en la vigilancia inmunológica del cáncer.

[0253] Aunque se ha mencionado que las cadenas públicas de β TCR están principalmente involucradas en la infección y la alorreactividad, nuestros datos sugieren que los pares públicos de TCR γ y δ son un pilar importante de la vigilancia inmunológica diaria del cáncer. Los TCR de $V\delta2$ compartidos de la sangre periférica tienen la capacidad de mediar la actividad funcional más alta contra varios tipos de tumores e incluso pueden superar la reactividad

- tumoral de las células T γδ policlonales, como se muestra en los experimentos *in vitro* con TEG001. Además, los TCR V δ 2^{neg} también pueden mediar una fuerte reactividad antitumoral contra un conjunto de diferentes células tumorales, por lo que parecen cubrir la vigilancia contra una variedad de neoplasias malignas sólidas y hematológicas. Sin embargo, los análisis en profundidad de los TIL γδ indican que los TIL γδ con TCR γδ potencialmente reactivos a los tumores carecen de una proliferación clonal sustancial dentro de los tejidos tumorales. Además de esta observación biológica básica que indica que las cadenas públicas de TCR γ y δ son una parte importante, pero también vulnerable, de la vigilancia inmunológica temprana del cáncer, los receptores identificados son una herramienta valiosa para nuevos compuestos terapéuticos, como TEG.
- [0254] Aunque se han descrito expansiones clonales de TIL qβ (38), no se observó un predominio clonal sustancial dentro de las poblaciones de TIL γδ de TNBC cuando se analizaron mediante espectrotipificación, NGS o PCR de células individuales durante nuestro estudio actual. Esta ausencia observada de expansiones clonales significativas en los TIL γδ del TNBC contrasta marcadamente con los repertorios muy sesgados de TCR δ1 en la sangre periférica de adultos (39, 40, 25) o en infecciones fetales por CMV en el útero que contienen varios clonotipos de alta frecuencia (31). Curiosamente, la capacidad de proliferación de las células V δ 2⁺ observada en desafíos infecciosos (41) está frecuentemente ausente en pacientes con cáncer (39). Además, estudios elegantes con modelos de ratón indican que las células T γδ pueden prevenir el desarrollo del cáncer en las primeras etapas de la enfermedad (42, 43), pero una vez que la enfermedad se vuelve más avanzada, los TIL γδ se vuelven rápidamente deficientes en proliferación, mientras mantienen otras actividades funcionales, como la regulación positiva de IFNy o CD69. Dado que no pudimos detectar ningún TIL γδ con el fenotipo Th17, es posible que el microambiente tumoral pueda ser particularmente inhibidor para este subconjunto. La suposición de una deficiencia temprana de proliferación de TIL γδ también favorecería la PCR de células individuales en lugar de NGS para la identificación de receptores relevantes dentro del contexto de los TIL γδ. Sin embargo, un estudio como el nuestro es técnicamente desafiante y actualmente es difícil realizar un análisis de secuenciación de células individuales de tejido tumoral de manera eficiente.
- [0255] Nuestros datos son compatibles con los hallazgos anteriores de baja incidencia de recaída de leucemia después de trasplantes de sangre del cordón umbilical (25). En este escenario, la alta frecuencia de cadenas públicas de TCR δ V δ 2^{neg} en las células de la sangre del cordón umbilical podría contribuir sustancialmente a una abundancia potencial de receptores reactivos a tumores en el repertorio posterior al trasplante (39, 40). Además, la reactivación del CMV en pacientes que recibieron células madre de sangre periférica sin depleción de células T después de regímenes de acondicionamiento mieloablutivo se asoció con un riesgo reducido de recaída de la leucemia (44). Nosotros y otros hemos sugerido que este efecto está parcialmente mediado por las células T γδ (25, 45).
- [0256] Willcox et al. han identificado el receptor de proteína C endotelial (EPCR) como un ligando de estrés inducido por CMV para las células T Vγ4Vδ5 (22). Ahora clasificamos las cadenas de receptores de clones reactivos al CMV parcialmente como públicas. En un paciente, detectamos cadenas públicas de TCR γ y δ TCR δ con reactividad de EPCR en el lado del tumor, lo que sugiere que estas cadenas, en particular la Vδ5, podrían formar receptores con reactividad tumoral. De hecho, los TIL γδ en muchos pacientes con TNBC expresaron una cadena de Vδ5 de TCR compartida asociada con respuestas anti-CMV. Sin embargo, todos los pacientes con TNBC con esta particular cadena compartida de V65 de TCR eran negativos para CMV. Es posible que las reactivaciones del CMV no sólo sean beneficiosas desde el punto de vista clínico en las leucemias (46), sino que también puedan conferir cierta protección contra ciertos tumores sólidos. Sin embargo, también demostramos con múltiples complejos TCR compuestos de cadenas de TCR γ o δ públicas que la cadena correspondiente es con frecuencia privada y clave para la actividad antitumoral. Por lo tanto, en estos pacientes, la contraparte correspondiente podría no mediar la reactividad del CMV o del tumor cuando se combina con una cadena opuesta diferente, como también lo sugieren nuestros datos y otros (33).
- [0257] Muchos ensayos clínicos con células T γδ expandidas *ex vivo* e *in vitro* no tuvieron mucho éxito (47) y la diversidad funcional dentro del repertorio de células T γδ puede ser un factor importante que contribuye a estos numerosos fracasos de las traducciones clínicas de las terapias basadas en células T γδ (48). La observación de que las cadenas públicas de TCR δ están frecuentemente involucradas en la reactividad antitumoral observada apunta hacia posibles estrategias para crear células T potencialmente importantes desde el punto de vista clínico con TCR γδ definidos (TEG) utilizando cadenas de TCR γ y/o δ compartidas. De hecho, los análisis de alto rendimiento de las regiones CDR3 combinados con la secuenciación de células individuales de los TIL γδ pueden reducir de manera muy rápida el extremadamente diverso repertorio de TCR δ de 10¹⁸ a quizás menos de 10² secuencias de interés terapéutico para generar nuevas TEG terapéuticas (49). Estos receptores podrían analizarse de manera rápidamente funcional y fabricarse a medida para cada paciente. Sin embargo, la ausencia de restricción de HLA durante las actividades antitumorales medidas sugiere el uso potencial de estas nuevas TEG recién creadas en numerosos pacientes genéticamente no relacionados.

- [0258] Para generar productos listos para usar, el análisis de donantes de sangre del cordón umbilical con una alta frecuencia natural de cadenas de TCR y y δ públicas en comparación con el repertorio adulto podría ser un punto de partida natural. También se han descrito cadenas de TCR y y δ compartidas en pacientes con leucemia aguda (50) y cáncer de ovario (51), y dichas muestras también podrían ser una fuente interesante para análisis funcionales posteriores. Sin embargo, aunque la frecuencia y potencia de los receptores reactivos tumorales fue siempre mayor en nuestros análisis en los complejos que albergaban cadenas de receptores compartidas en comparación con los que no lo hacían, la identificación de receptores interesantes siempre requerirá una confirmación funcional de receptores definidos frente a un panel tumoral completo. Muchos complejos de receptores analizados que albergan cadenas de TCR y o δ compartidas fueron complementarios en reactividad contra tipos de cáncer completamente diferentes o no fueron reactivos en absoluto, lo que sugiere que estos receptores se dirigen a ligandos complementarios y hasta ahora desconocidos.
- [0259] El cribado de TEG frente a un panel limitado de líneas celulares tumorales y la posible ausencia de señales coestimulantes que podrían ser necesarias para la respuesta de las células T y δ restringen un poco la interpretación de nuestros datos. Claramente, los distintos pares de TCR y δ mediaron diferentes patrones de reactividad tumoral, lo que indica que cada par individual de cadenas públicas de TCR y δ puede ser reactivo solo contra subconjuntos definidos de dianas. Una limitación de nuestros estudios surge claramente del cribado de TEG frente a un panel bastante limitado de líneas celulares tumorales, ya que observamos diferentes patrones de reactividad tumoral para diferentes pares de TCR y δ. Además, los pares de TCR y δ podrían depender de una coestimulación adicional que no está presente dentro del formato TEG. Sin embargo, todos los receptores evaluados estaban activos dentro del formato TEG y la expresión dentro de NEG o GEG no mostró actividad adicional. Esto sugiere que también para muchas células T Vδ2^{neg} y δ la cadena de TCR y δ por sí sola es suficiente para la activación completa de las células T, pero también que cada par individual con cadenas de TCR públicas es aparentemente reactivo solo contra subconjuntos definidos de dianas. Si bien ahora se ha establecido un mecanismo de adentro a afuera que involucra a CD277 (52, 53) y RhoB (24) para el reconocimiento mediado por TCR de Vy9Vδ2, la mayoría de los ligandos aún deben definirse para muchas combinaciones de TCR y δ Vδ2^{neg} y, por lo tanto, las pruebas de cadenas potencialmente interesantes siempre deben incluir paneles tumorales grandes y completos.
- [0260] En resumen, describimos frecuencias de cadenas compartidas de TCR δ dentro de los TCR y δ de sangre periférica y los TIL y δ. También demostramos que las cadenas de TCR y y δ públicas son participantes activos y complementarios en la vigilancia inmunológica diaria del cáncer. Sin embargo, a pesar de las pruebas funcionales de reactividad tumoral directa de los receptores involucrados, no observamos una expansión clonal sustancial de repertorios compartidos de TCR δ dentro del microambiente local, lo que sugiere una deficiencia de proliferación de TIL y δ en pacientes con cáncer avanzado. Por el contrario, detectamos TCR δ reactivos a tumores compartidos dentro del repertorio de sangre periférica de individuos sanos, lo que fue compatible con el papel propuesto de los TCR δ reactivos a tumores públicos en la vigilancia inmunológica del cáncer. Por lo tanto, la identificación de TCR terapéuticamente relevantes podría facilitarse mediante el análisis de repertorios compartidos de TCR y δ en diferentes compartimentos en pacientes sanos y con cáncer. Esta participación de los clonotipos públicos de TCR Vδ2⁺ y Vδ2^{neg} en la vigilancia inmunológica de los tumores podría aprovecharse para aumentar la inmunidad específica de los tumores. En particular, aclarar la naturaleza precisa de los ligandos reconocidos, el modo exacto de su reconocimiento y su distribución tisular y regulación de la expresión puede conducir al desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos y, por lo tanto, a mejorar futuras terapias contra el cáncer basadas en células T y δ.

45

Tabla 5

Descripción general de los cebadores utilizados para la preparación de la biblioteca de NGS	
síntesis de ADNc	
Constante del cebador inverso de TRB	CAGTATCTGGAGTCATTGA
Constante del cebador inverso de TRD	CTTGGATGCACACGAGAT
Adaptador de cambio de modelo	AAGCAGUGGTAUCAACGCAGAGUNNNUNNNNUUUUUCCT(rG) ₄
1^a PCR	
Región constante del cebador inverso anidado de TRB	TGCTTCTGATGGCTAAACAC
Región constante del cebador inverso anidado de TRD	AACGGATGGTTGGTATGAG

Cebador directo (se anida con el adaptador de cambio)	CACTCTATCCGACAAGCAGTGGTATCACGCAG
2ª PCR	
Región constante del cebador inverso anidado de TRB	ACACSTTKTTCAGGTCTC
Región constante del cebador inverso anidado de TRD	TTGGTATGAGGCTGACTTC
Cebador directo (se anida con el adaptador de cambio)	CACTCTATCCGACAAGCAGT

Anticuerpo	Color fluorocromo	Especie	Dilución	Isotipo	Clon	N.º de cat.	Fuente
TCR γ		Monoclonal de ratón	1:40	IgG	γ3,20	TCR11 53	Thermo Fisher
TCR γ	FITC	Monoclonal de ratón	1:20	IgG1	IMMU5 10	IM 1349	Beckman Coulter
CD69		Monoclonal de ratón	1:30	IgG	CH11	NCLC D69	Leica Biosystems
CMV		Monoclonal de ratón	Flex System	IgG1, K+L	CCH2 + DDG9	IS752	Dako
Caspasa 3 escindida		Monoclonal de conejo	1:700	IgG	5A1E	mAb96 64	Cell Signalling
IFNy		Policlonal de cabra	1:200	IgG	policlonal	AF285 NA	R&D Systems
IL-17		Policlonal de cabra	1:200	IgG	policlonal	AF317 NA	R&D Systems
sec. Ab anti-conejo / Alexa Fluor 568		Burro	1:500	IgG	policlonal	Ab175 470	Abeam
sec. Ab anti-igG de ratón / Alexa Fluor 488		Conejo	1:700	IgG H+L	policlonal	A1105 9	Thermo Fisher
sec. Ab de cabra anti-igG / Alexa Fluor 647		Burro	1:500	IgG	policlonal	ab1501 31	Abeam
sec. Ab de cabra anti-igG / Alexa Fluor 594		Burro	1:500	IgG	policlonal	Ab150 132	Abeam
CD3	EFluor450	Monoclonal de ratón	1:40	IgG2 a	OKT3	16-0037-81	eBioscience
TCRap	APC	Monoclonal de ratón	1:10	IgG1	IP26	14-9986-42	eBioscience
TCR γδ	PE	Monoclonal de ratón	1:10	IgG1	IMMU5 10	B4971 6	Beckman Coulter
TCR γδ	APC	Monoclonal de ratón	1:5	IgG1	B1 (RUO)	555718	BD biosciences

Tabla 6: Descripción general de anticuerpos usados en diferentes experimentos.

Cebadores para PCR de células individuales	
Cebadores directos	
Vg18-F1	AGGGGAAGGCCACAGCGTCTTC
Vg 18-F2:	CAGCGTCTCWGTACTATGAC
Vg9-F1	TGACGGCACTGTCAGAAAGGAATC
Vg9-F2	TGAGGTGGATAGGATACCTGAAAC
Vd1-F1(Biomed)	ATGAAAAAGTGGTCGCTATTCTG
Vd1-F2	CAACTTCAAGAAAGCAGCGAAATC
Vd2-F1 (Biomed)	ATACCGAGAAAAGGACATCTATG
Vd2-F2	CAAGGTGACATTGATATTGCAAAG
Vd3-F1	GGTTTCTGTGAAACACATTCTGAC
Vd3-F2	CTTCACTTGGTGATCTCTCCAG
Vd4-F1 (Biomed)	ATGACCAGCAAAATGCAACAGAAG
Vd4-F2	CGCTACTCATTGAATTCCAGAAG
Vd5-F1 (Biomed)	TACCCTGCTGAAGGT CCTACATTC
Vd5-F2	CTGCTTCTTAAACAAAAGTGCCAAG
Vd6-F1 (Biomed)	CCCTGCATTATTGATAGCCATACG
Vd6-F2	TGCCAAGCAGTTCTCATTGCATATC
Cebadores inversos	
TRg-JP1/2-R1	TTACCAGGYGAAGTTACTATGAGC
TRg-J1/2-R1	AAGTGTGTTCCACTGCCAAAGAG
TRg-JP-R1	AAGCTTGTTCCGGGACCAAATAC
Jd1-R1	TTGGTTCCACAGTCACACGGGTTTC
Jd2-R1	CTGGTTCCACGATGAGTTGTGTTTC
Jd3-R1	CAACTCACGGGGCTCCACGAAGAG
Jd4-R1	TTGTACCTCCAGATAAGGTTCCCTTG

Tabla 7

Descripción general de los cebadores utilizados para PCR de células individuales	
Frecuencia clonal de secuencias compartidas de TCR δ (conjunto de datos 1) >0,1 %	
Secuencia de CDR3δ	Identificada en el donante
Vδ1	
CALGDSYGGPLYTDKLIF*	13, 19
Vδ2	
CACDVLDTDKLIF**	18, 19, 20
CACDLLGDTDKLIF**	25, 29
CACDTAGGSWDTRQMFF**	13, 19
CACDTLGAYTDKLIF**	20,25
CACDTLGDTDKLIF**	19, 23
CACDTLLGDSSWDTRQMFF**	13, 19
CACDTPSSWDTRQMFF**	13, 19
CACDTTGGPSSWDTRQMFF**	12,23

CACDTVGDTDKLIF**	11, 29
CACDTVGGTDKLIF**	15, 19
CACDTVGTYTDKLIF**	13, 25
CACDTVLGDTRSWDTRQMFF**	20, 70
CACDTWGTDKLIF**	29, 31
CACDTWGYTDKLIF**	29, 31

[0261] **Tabla 8. Se identificaron ejemplos de secuencias compartidas entre 14 donantes sanos.** Se compararon las secuencias de CDR3δ obtenidas con NGS del conjunto de datos 1 con una frecuencia clonal >0,1 % para identificar secuencias compartidas entre donantes. *Indica la secuencia del clon FE11 que se ha aislado de un donante sano adicional. **Indica que la secuencia también se identificó en otro conjunto de datos.

P n t	Cln	Redisposición de TRG	CDR3 de TRG	Redisposición de TRD	CDR3 de TRD
10	B 9*	TRGV5*GJ1**	CATWDRLYYKKLF&	TRDV1*DD3*DJ1 TRAV29/DV5DD3*D J1*	CALGNGNHIGYWRYTDKLIF
	B 23#	TRGV8*GJ1	CATWDNYKKLF	TRAV29/DV5DJ1DD 2DD3*	CAASSPIRGYTGSDKLIF
	C 132#§	TRGV4*GJ1*	CATWDGFYYKKLF	TRAV29/DV5 *DD2*DD3*DJ1	CAASSPIRGYTGSDKLIF*
15	D 37#	TRGV8*GJ1	CATWDNYMKLF	TRAV29/DV5 *DD2*DD3*DJ1	CAASSPIRGYTGSDKLIF*
	E 113#	TRGV4*GJ1	CATWDGPYYYKKLF	TRDV3 *DD2*DD3*DJ1	CAASSPIRGYTGSDKLIF*
	F 2#	TRGV4*GJ1	CATWDGPYYYKKLF	TRDV1*DD3*DJ1	CASSYTLKLDTPGRVRDWK LIF
20	F 4#	TRGV2GJ1	CATWDGQKKLF		CALGELRYWGIVDKLIF
	Z e11#	TRGV8*GJ1	CATWDNYKKLF	TRDV1*DD3*01DJ1 TRDV1*DD1*DD2*D D3*DJ1	CALGDYLGDKYPSYDLLGDT TDKLIF
	Z i11#	TRGV8*GJ1	CATWDNYKKLF		CALGELRGQISFLYLLGDTTD KLIF

25

Tabla 9

[0262] **Descripción general de ejemplos de secuencias pareadas de TIL y δ encontradas en pacientes con cáncer de mama triple negativo.** Los colores de la escala de grises indican secuencias idénticas. # Indica que estos clones se utilizaron para generar TEG para ensayos funcionales. § Indica clon publicado por Lafarge et al.; doi: 10.1002/eji.200425837. % Indica cadena delta publicada por Lafarge et al; doi: 10.1002/eji.200425837. & Indica cadena gamma publicada por Uldrich et al.; doi:10.1038/nj.2713

Ejemplo 3: Prueba de estabilidad:

[0263] Una composición farmacéutica descrita en este documento que contiene al menos un polipéptido descrito en este documento o una célula modificada genéticamente que expresa un polipéptido descrito en este documento se almacena en un recipiente sellado a 25 °C o 4 °C y el recipiente se coloca en una atmósfera que tiene una humedad relativa del 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 % o 95 %. Después de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años, al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la composición farmacéutica deberá permanecer según lo determinado por los protocolos estándar.

[0264] Si bien se han mostrado y descrito en el presente documento formas de realización específicas de la presente invención, será obvio para los expertos en la técnica que dichas formas de realización se proporcionan únicamente a modo de ejemplo. A los expertos en la técnica se les ocurrirán numerosas variaciones, sustituciones y numerosos cambios sin apartarse de la invención. Se debe entender que se pueden emplear varias alternativas a las formas de realización de la invención descritas en este documento para poner en práctica la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones queden cubiertos por ellas.

50

Lista de referencias

[0265]

1. Chien YH, Meyer C, Bonneville M. 2014. gammadelta T Cells: First Line of Defense and Beyond. *Annu.Rev.Immunol.*
- 5 2. Kim SK, Comberg M, Wang XZ, Chen HD, Selin LK, Welsh RM. 2005. Private specificities of CD8 T cell responses control patterns of heterologous immunity. *J Exp Med* 201: 523-33
3. Miles JJ, Elhassen D, Borg NA, Silins SL, Tynan FE, Burrows JM, Purcell AW, Kjer-Nielsen L, Rossjohn J, Burrows SR, McCluskey J. 2005. CTL recognition of a bulged viral peptide involves biased TCR selection. *J Immunol* 175: 3826-34
- 10 4. Venturi V, Price DA, Douek DC, Davenport MP. 2008. The molecular basis for public T-cell responses? *Nat Rev Immunol* 8: 231-8
5. Wang C, Liu Y, Cavanagh MM, Le Saux S, Qi Q, Roskin KM, Looney TJ, Lee JY, Dixit V, Dekker CL, Swan GE, Goronzy JJ, Boyd SD. 2015. B-cell repertoire responses to varicella-zoster vaccination in human identical twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 500-5
- 15 6. Kuball J, Dossett ML, Wolf M, Ho WY, Voss RH, Fowler C, Greenberg PD. 2007. Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells. *Blood* 109: 2331-8
7. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, Chudakov DM. 2015. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods* 12: 380-1
- 20 8. Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tugarbaev TR, Bolotin DA, Staroverov DB, Putintseva EV, Plevova K, Linnemann C, Shagin D, Pospisilova S, Lukyanov S, Schumacher TN, Chudakov DM. 2014. Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods* 11: 653-5
9. Scheper W, van Dorp S, Kersting S, Pietersma F, Lindemans C, Hol S, Heijhuurs S, Sebestyen Z, Grunder C, Marcu-Malina V, Marchant A, Donner C, Plachter B, Vermijlen D, van Baarle D, Kuball J. 2013. gammadeltaT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. *Leukemia* 27: 1328-38
- 25 10. Scheper w. 2014. Cancer immunotherapy using $\gamma\delta$ T cells: dealing with diversity. Thesis
11. Grunder C, van DS, Hol S, Drent E, Straetemans T, Heijhuurs S, Scholten K, Scheper W, Sebestyen Z, Martens A, Strong R, Kuball J. 2012. gamma9 and delta2CDR3 domains regulate functional avidity of T cells harboring gamma9delta2TCRs. *Blood* 120: 5153-62
- 30 12. Straetemans T, Grunder C, Heijhuurs S, Hol S, Slaper-Cortenbach I, Bonig H, Sebestyen Z, Kuball J. 2015. Untouched GMP-ready purified engineered immune cells to treat cancer. *Clin Cancer Res*
13. de Witte MA, Kierkels GJ, Straetemans T, Britten CM, Kuball J. 2015. Orchestrating an immune response against cancer with engineered immune cells expressing alphabetaTCRs, CARs, and innate immune receptors: an immunological and regulatory challenge. *Cancer Immunol Immunother* 64: 893-902
- 35 14. Salgado R, Denkert C, Campbell C, Savas P, Nuciforo P, Aura C, de Azambuja E, Eidtmann H, Ellis CE, Baselga J, Piccart-Gebhart MJ, Michiels S, Bradbury I, Sotiriou C, Loi S. 2015. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and Trastuzumab: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial. *JAMA Oncol* 1: 448-54
15. Loi S, Dushyanthen S, Beavis PA, Salgado R, Denkert C, Savas P, Combs S, Rimm DL, Giltnane JM, Estrada MV, Sanchez V, Sanders ME, Cook RS, Pilkinton MA, Mallal SA, Wang K, Miller VA, Stephens PJ, Yelensky R, Doimi FD, Gomez H, Ryzhov SV, Darcy PK, Arteaga CL, Balko JM. 2016. RAS/MAPK Activation Is Associated with Reduced Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer: Therapeutic Cooperation Between MEK and PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Cancer Res* 22: 1499-509
- 40 16. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressier L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. 2004. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 5367-74
17. Bender C, Zipeto D, Bidoia C, Costantini S, Zamo A, Menestrina F, Bertazzoni U. 2009. Analysis of colorectal cancers for human cytomegalovirus presence. *Infect Agent Cancer* 4: 6
- 45 18. Mamedov IZ, Britanova OV, Zvyagin IV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Putintseva EV, Lebedev YB, Chudakov DM. 2013. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front Immunol* 4: 456.
19. Hidalgo JV, Bronsert P, Orlowska-Volk M, Diaz LB, Stickeler E, Werner M, Schmitt-Graeff A, Kayser G, Malkovsky M, Fisch P. 2014. Histological Analysis of gammadelta T Lymphocytes Infiltrating Human Triple-Negative Breast Carcinomas. *Front Immunol* 5: 632
- 50 20. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671-5
21. Brauning A, Hansmann ML, Strickler JG, Dummer R, Burg G, Rajewsky K, Kuppers R. 1999. Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 340: 1239-47
- 55 22. Straetemans T, Grunder C, Heijhuurs S, Hol S, Slaper-Cortenbach I, Bonig H, Sebestyen Z, Kuball J. 2015. Untouched GMP-Ready Purified Engineered Immune Cells to Treat Cancer. *Clin Cancer Res* 21: 3957-68

23. Grunder C, van DS, Hol S, Drent E, Straetemans T, Heijhuurs S, Scholten K, Scheper W, Sebestyen Z, Martens A, Strong R, Kuball J. 2012. gamma9 and delta2CDR3 domains regulate functional avidity of T cells harboring gamma9delta2TCRs. *Blood* 120: 5153-62
- 5 24. Sebestyen Z, Scheper W, Vyborova A, Gu S, Rychnavska Z, Schiffler M, Cleven A, Cheneau C, van Noorden M, Peigne CM, Olive D, Lebbink RJ, Oostvogels R, Mutis T, Schuurhuis GJ, Adams EJ, Scotet E, Kuball J. 2016. RhoB Mediates Phosphoantigen Recognition by Vgamma9Vdelta2 T Cell Receptor. *Cell Rep* 15: 1973-85
- 10 25. Scheper W, van Dorp S, Kersting S, Pietersma F, Lindemans C, Hol S, Heijhuurs S, Sebestyen Z, Grunder C, Marcu-Malina V, Marchant A, Donner C, Plachter B, Vermijlen D, van Baarle D, Kuball J. 2013. gammadeltaT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. *Leukemia* 27: 1328-38
- 15 26. Marcu-Malina V, Heijhuurs S, van BM, Hartkamp L, Strand S, Sebestyen Z, Scholten K, Martens A, Kuball J. 2011. Redirecting alphabeta T cells against cancer cells by transfer of a broadly tumor-reactive gammadeltaT-cell receptor. *Blood* 118: 50-9
- 20 27. Holtmeier W, Chowers Y, Lumeng A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. 1995. The delta T cell receptor repertoire in human colon and peripheral blood is oligoclonal irrespective of V region usage. *J Clin Invest* 96: 1108-17
- 25 28. Chien YH, Meyer C, Bonneville M. 2014. gammadelta T Cells: First Line of Defense and Beyond. *Annu.Rev.Immunol.*
- 30 29. Hidalgo JV, Bronsert P, Orlowska-Volk M, Diaz LB, Stickeler E, Werner M, Schmitt-Graeff A, Kayser G, Malkovsky M, Fisch P. 2014. Histological Analysis of gammadelta T Lymphocytes Infiltrating Human Triple-Negative Breast Carcinomas. *Front Immunol* 5: 632
- 35 30. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, Nair VS, Xu Y, Khuong A, Hoang CD, Diehn M, West RB, Plevritis SK, Alizadeh AA. 2015. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* 21: 938-45
- 40 31. Coffelt SB, Kersten K, Doornbehal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, Verstegen NJ, Ciampicotti M, Hawinkels LJ, Jonkers J, de Visser KE. 2015. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 522: 345-8
- 45 32. Li B, Li T, Pignon JC, Wang B, Wang J, Shukla SA, Dou R, Chen Q, Hodis FS, Choueiri TK, Wu C, Hacohen N, Signoretti S, Liu JS, Liu XS. 2016. Landscape of tumor-infiltrating T cell repertoire of human cancers. *Nat Genet*
- 50 33. Willcox CR, Pitard V, Netzer S, Couzi L, Salim M, Silberzahn T, Moreau JF, Hayday AC, Willcox BE, Chanet-Merville J. 2012. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat.Immunol.* 13: 872-9
- 55 34. Ulrich AP, Le Nours J, Pellicci DG, Gherardin NA, McPherson KG, Lim RT, Patel O, Beddoe T, Gras S, Rossjohn J, Godfrey DI. 2013. CD1d-lipid antigen recognition by the gammadelta TCR. *Nat Immunol* 14: 1137-45
- 60 35. Couzin-Frankel J. 2013. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 342: 1432-3
36. Lim WA, June CH. 2017. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell* 168: 724-40
37. Bouchie A, DeFrancesco L, Sheridan C, Webb S. 2017. Nature Biotechnology's academic spinouts of 2016. *Nat Biotechnol* 35: 322-33
38. Sittig SP, Kollgaard T, Gronbaek K, Idorn M, Hennenlotter J, Stenl A, Gouttefangeas C, Thor Straten P. 2013. Clonal expansion of renal cell carcinoma-infiltrating T lymphocytes. *Oncoimmunology* 2: e26014
39. Davey MS, Willcox CR, Joyce SP, Ladell K, Kasatskaya SA, McLaren JE, Hunter S, Salim M, Mohammed F, Price DA, Chudakov DM, Willcox BE. 2017. Clonal selection in the human Vdelta1 T cell repertoire indicates gammadelta TCR-dependent adaptive immune surveillance. *Nat Commun* 8: 14760
40. Ravens S, Schultz-Florey C, Raha S, Sandrock I, Drenker M, Oberdorfer L, Reinhardt A, Ravens I, Beck M, Geffers R, von Kaisenberg C, Heuser M, Thol F, Ganser A, Forster R, Koenecke C, Prinz I. 2017. Human gammadelta T cells are quickly reconstituted after stem-cell transplantation and show adaptive clonal expansion in response to viral infection. *Nat Immunol*
41. Ding Y, Ma F, Wang Z, Li B. 2015. Characteristics of the Vdelta2 CDR3 Sequence of Peripheral gammadelta T Cells in Patients with Pulmonary Tuberculosis and Identification of a New Tuberculosis-Related Antigen Peptide. *Clin Vaccine Immunol* 22: 761-8
42. Dadi S, Chhangawala S, Whitlock BM, Franklin RA, Luo CT, Oh SA, Toure A, Pritykin Y, Huse M, Leslie CS, Li MO. 2016. Cancer Immunosurveillance by Tissue-Resident Innate Lymphoid Cells and Innate-like T Cells. *Cell* 164: 365-77
43. Xiang Z, Liu Y, Zheng J, Liu M, Lv A, Gao Y, Hu H, Lam KT, Chan GC, Yang Y, Chen H, Tsao GS, Bonneville M, Lau YL, Tu W. 2014. Targeted activation of human Vgamma9Vdelta2-T cells controls epstein-barr virus-induced B cell lymphoproliferative disease. *Cancer Cell* 26: 565-76
44. Elmaagacli AH, Koldehoff M. 2016. Cytomegalovirus replication reduces the relapse incidence in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 128: 456-9

45. Airoldi I, Bertaina A, Prigione I, Zorzoli A, Pagliara D, Cocco C, Meazza R, Loiacono F, Lucarelli B, Bernardo ME, Barbarito G, Pende D, Moretta A, Pistoia V, Moretta L, Locatelli F. 2015. gammadelta T-cell reconstitution after HLA-haploididentical hematopoietic transplantation depleted of TCR-alphabeta+/CD19+ lymphocytes. *Blood* 125: 2349-58
- 5 46. Scheper W, Grunder C, Straetemans T, Sebestyen Z, Kuball J. 2013. Hunting for clinical translation with innate-like immune cells and their receptors. *Leukemia*
- 10 47. Deniger DC, Moyes JS, Cooper LJ. 2014. Clinical applications of gamma delta T cells with multivalent immunity. *Front Immunol* 5: 636
- 15 48. Scheper W, Sebestyen Z, Kuball J. 2014. Cancer Immunotherapy Using gammadeltaT Cells: Dealing with Diversity. *Front Immunol* 5: 601
49. de Witte MA, Kierkels GJ, Straetemans T, Britten CM, Kuball J. 2015. Orchestrating an immune response against cancer with engineered immune cells expressing alphabetaTCRs, CARs, and innate immune receptors: an immunological and regulatory challenge. *Cancer Immunol Immunother* 64: 893-902
- 15 50. Meeh PF, King M, O'Brien RL, Muga S, Buckhalts P, Neuberg R, Lamb LS, Jr. 2006. Characterization of the gammadelta T cell response to acute leukemia. *Cancer Immunol Immunother*. 55: 1072-80
- 20 51. Xu C, Zhang H, Hu H, He H, Wang Z, Xu Y, Chen H, Cao W, Zhang S, Cui L, Ba D, He W. 2007. Gammadelta T cells recognize tumor cells via CDR3delta region. *Mol Immunol* 44: 302-10
52. Sandstrom A, Peigne CM, Leger A, Crooks JE, Konczak F, Gesnel MC, Breathnach R, Bonneville M, Scotet E, Adams EJ. 2014. The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Immunity* 40: 490-500
- 25 53. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigne CM, Monkkonen H, Monkkonen J, Li J, Kuball J, Adams EJ, Netzer S, chanet-Merville J, Leger A, Herrmann T, Breathnach R, Olive D, Bonneville M, Scotet E. 2012. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset. *Blood* 120: 2269-79

25

REIVINDICACIONES

1. Método para identificar cadenas de receptores de células T δ o T γ o partes de estas que median una respuesta antitumoral o antiinfecciosa que comprende los pasos de:

- 5 a) proporcionar secuencias de aminoácidos obtenidas de al menos 2 donantes diferentes, donde al menos un donante es sano, que comprende cadenas de receptores de células T δ o células T γ o partes de estas, donde cada una de dichas cadenas de receptores o partes de estas comprende una región CDR3;
- 10 b) identificar secuencias de aminoácidos que comprenden cadenas de receptores de células T δ o T γ o partes de estas obtenidas en el paso a) que se comparten entre diferentes donantes, donde dichas secuencias compartidas están comprendidas dentro de dicha región CDR3 o comprenden dicha región CDR3 o consisten en dicha cadena de receptores;
- 15 c) confirmar la respuesta antitumoral o antiinfecciosa de las cadenas de receptores de células T δ o células T γ o partes de estas identificadas en el paso b) mediante la evaluación de la respuesta antitumoral o antiinfecciosa de una célula T αβ o una célula NK que expresa una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos proporcionada en el paso a).

2. Método según la reivindicación 1, donde en el paso a):

- 20 a. los donantes son seres humanos,
 b. todos los donantes son sanos y/o
 c. al menos un donante está enfermo.

25 3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde en el paso b) las secuencias identificadas se comparten entre al menos 2 donantes diferentes.

30 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena del receptor de células T δ o de células T γ o parte de la misma identificada en el paso c) de la reivindicación 1 se proporciona en un vector de expresión o en un vector retroviral o lentiviral.

30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el paso de confirmar la respuesta antitumoral comprende poner en contacto la célula T αβ o la célula NK del paso c) de la reivindicación 1 con una célula tumoral y medir su capacidad para lisar la célula tumoral y/o inducir IFN-γ, IL-2 o TNFα.

Fig. 1

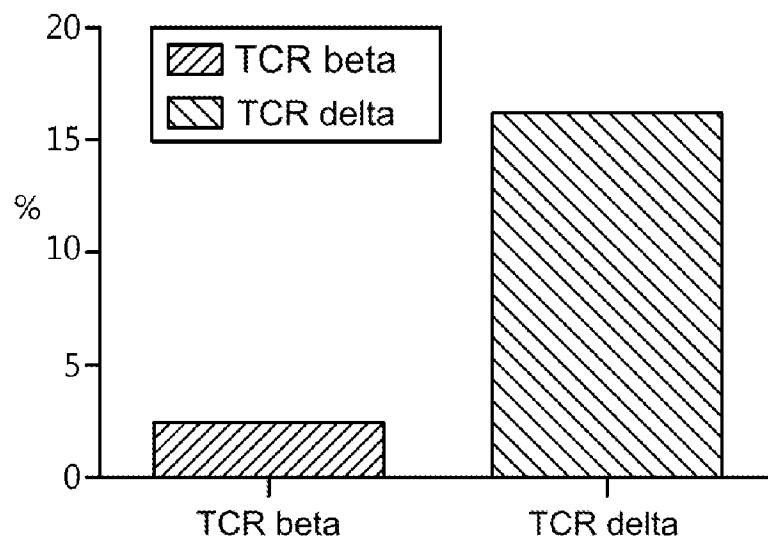


Fig. 2

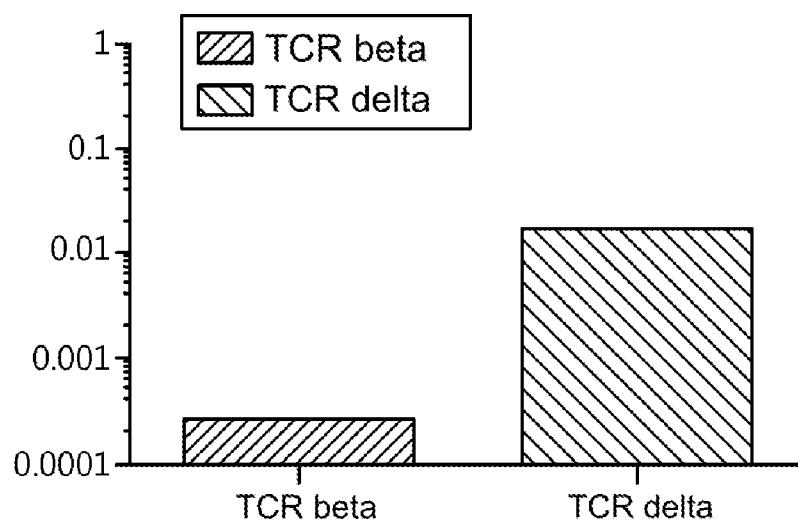


Fig. 3

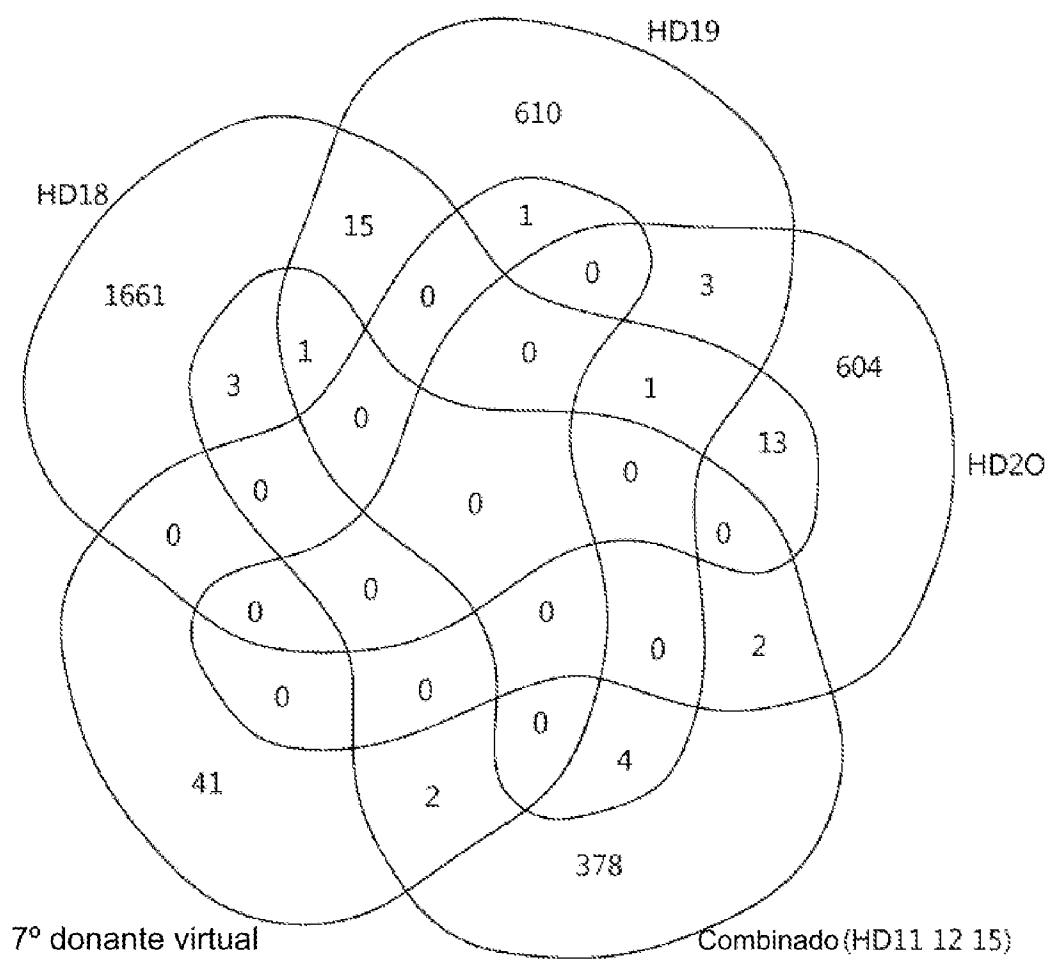


Fig. 4A

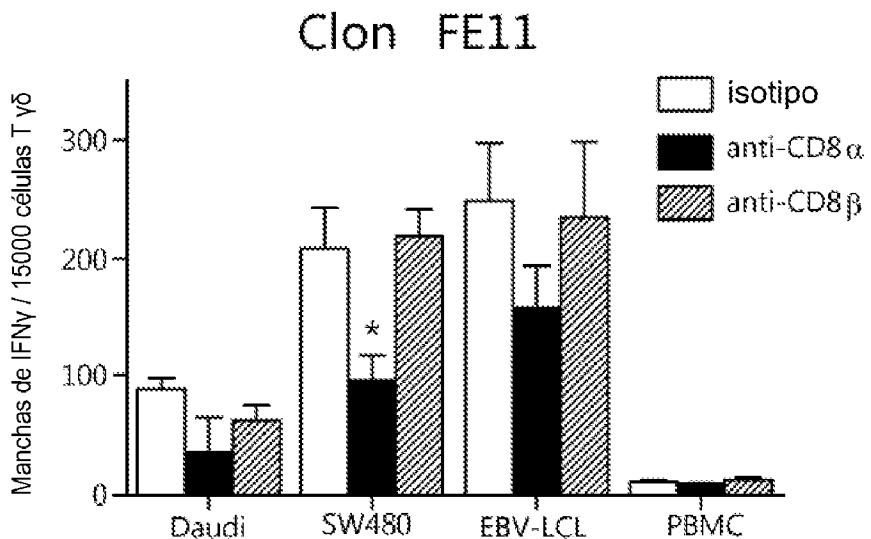


Fig. 4B

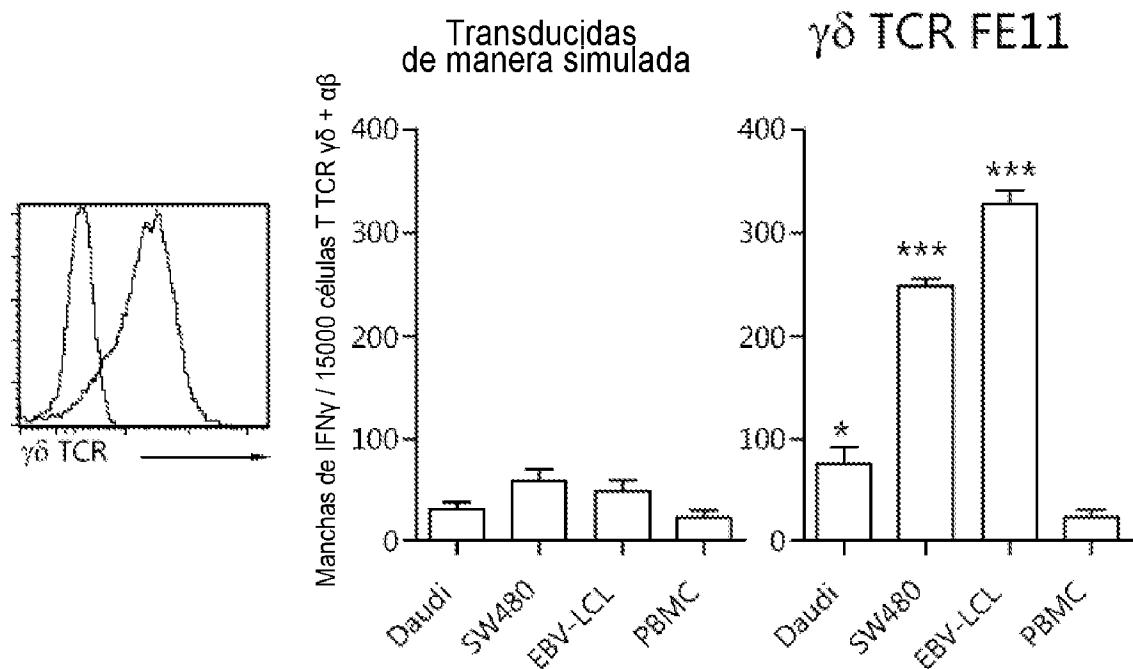


Fig. 4C

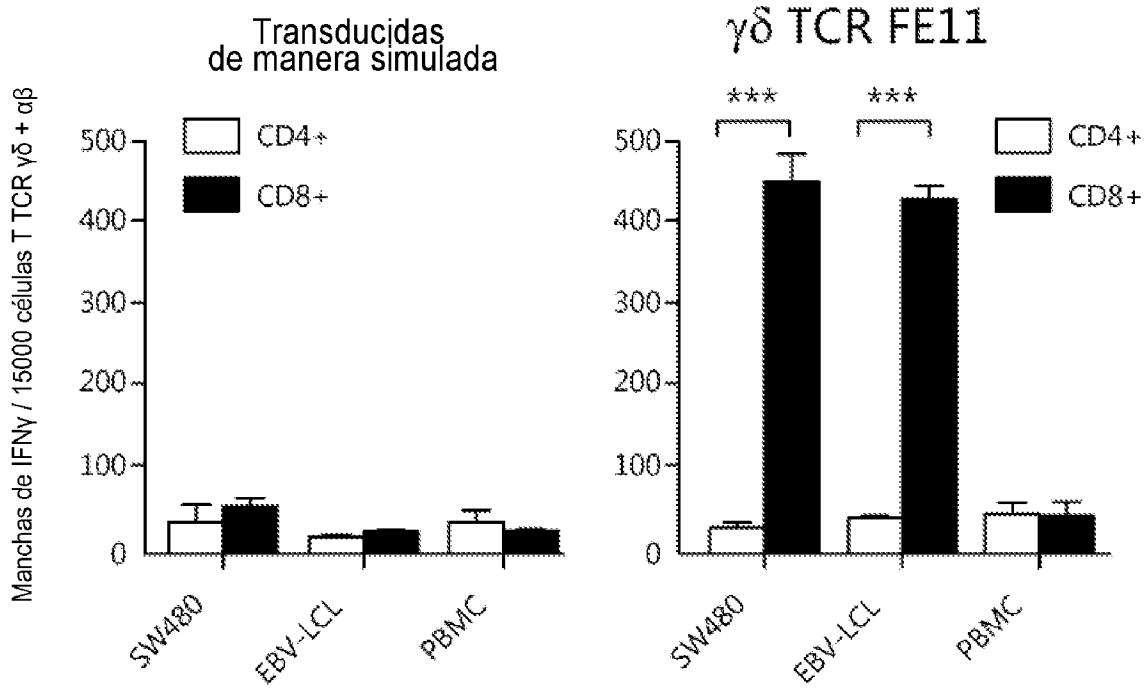
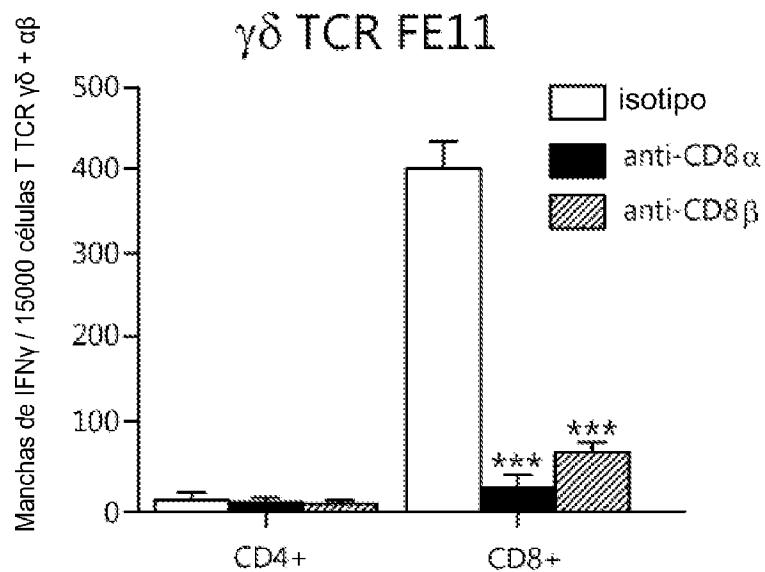


Fig. 4D



		Secuencias compartidas de TCR δ entre donantes sanos (conjunto de datos 1)																		
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	23	25	29	31					
Donante	Donante	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0.3	0.3	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0
11	12	0	0.6	0	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	13	0	0.1	0.7	0	0	0	0	0	0.38	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
13	14	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	15	0	0	0	0	0.27	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	16	0	0	0	0	0	0.27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	17	0	0	0	0	0	0.13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	18	0	0	0	0	0	0.13	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0
18	19	0	0	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0.9	0	0	0	0	0
19	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.3	0.4	0	0	0
20	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0
23	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fig. 5A

		Secuencias compartidas de TCR β entre donantes sanos																		
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	23	24	25	26	27					
Donante	Donante	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	13	0	0.64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	14	0	0	0.31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	15	0	0	0	0.31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	16	0	0	0	0	0.31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	17	0	0	0	0	0	0.32	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	18	0	0	0	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fig. 5B

Fig. 5C

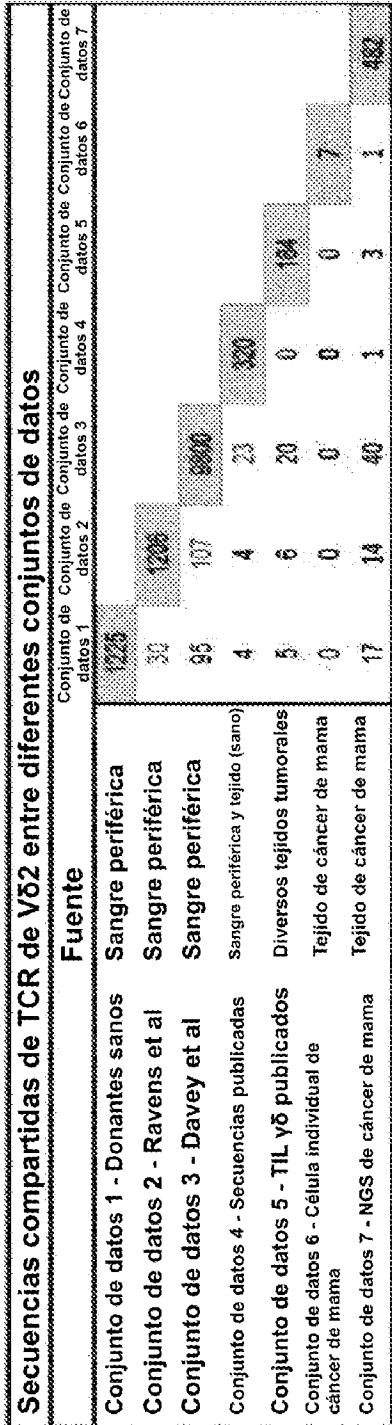


Fig. 5D

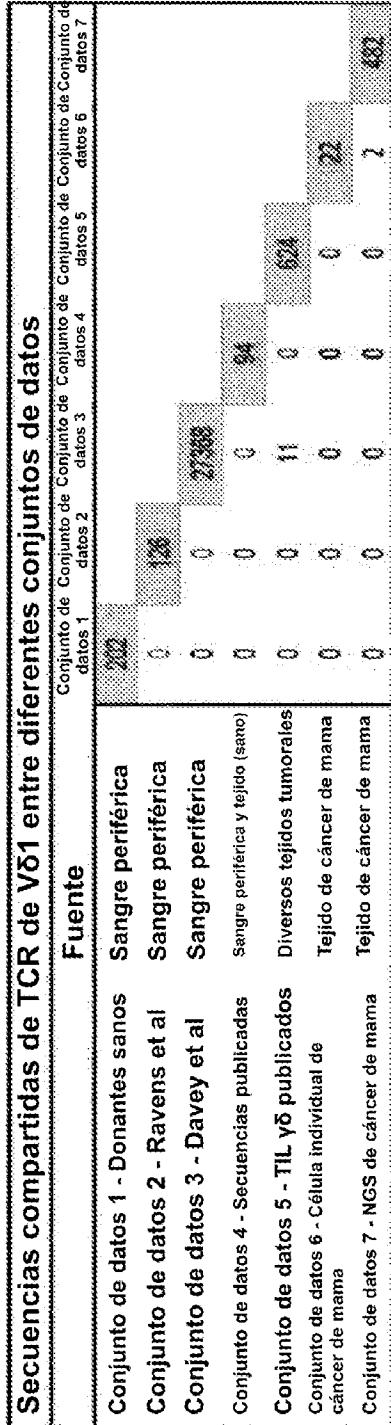


Fig. 5E

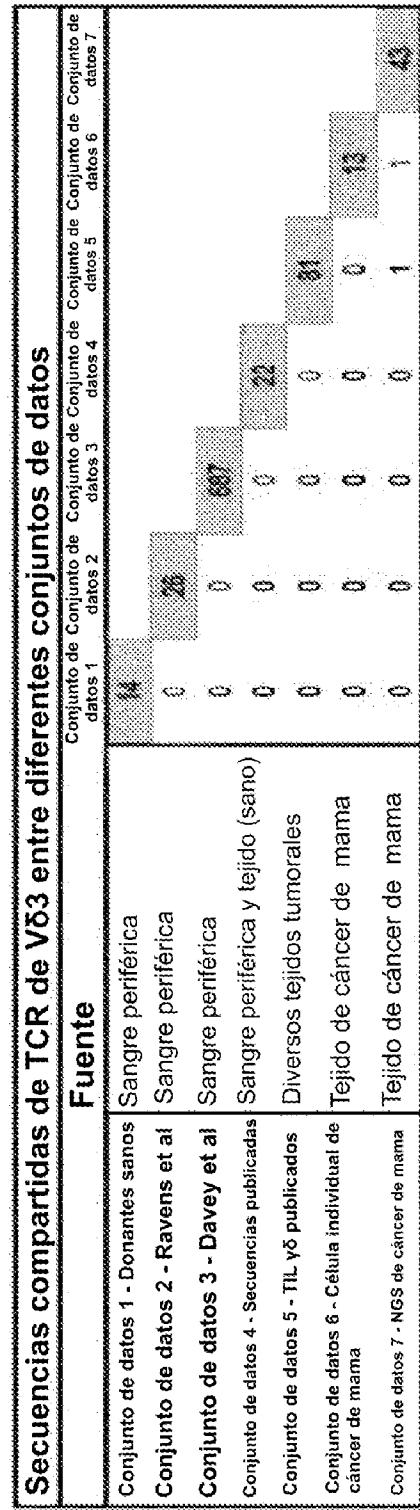


Fig. 6

Distribución del gen Vdelta

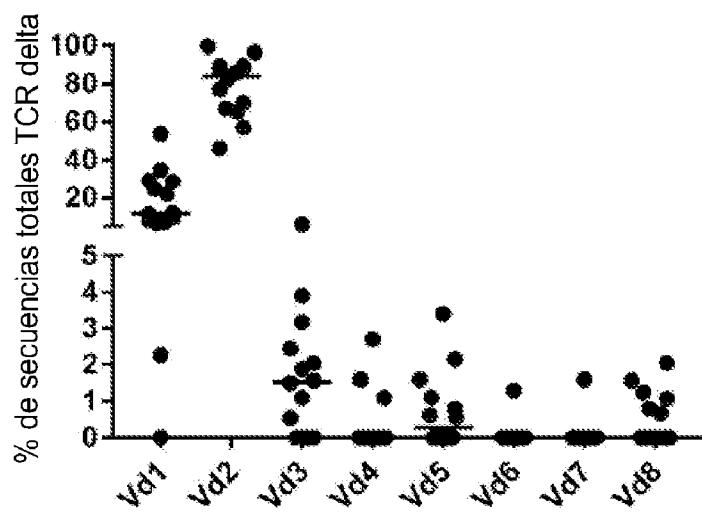


Fig. 7A

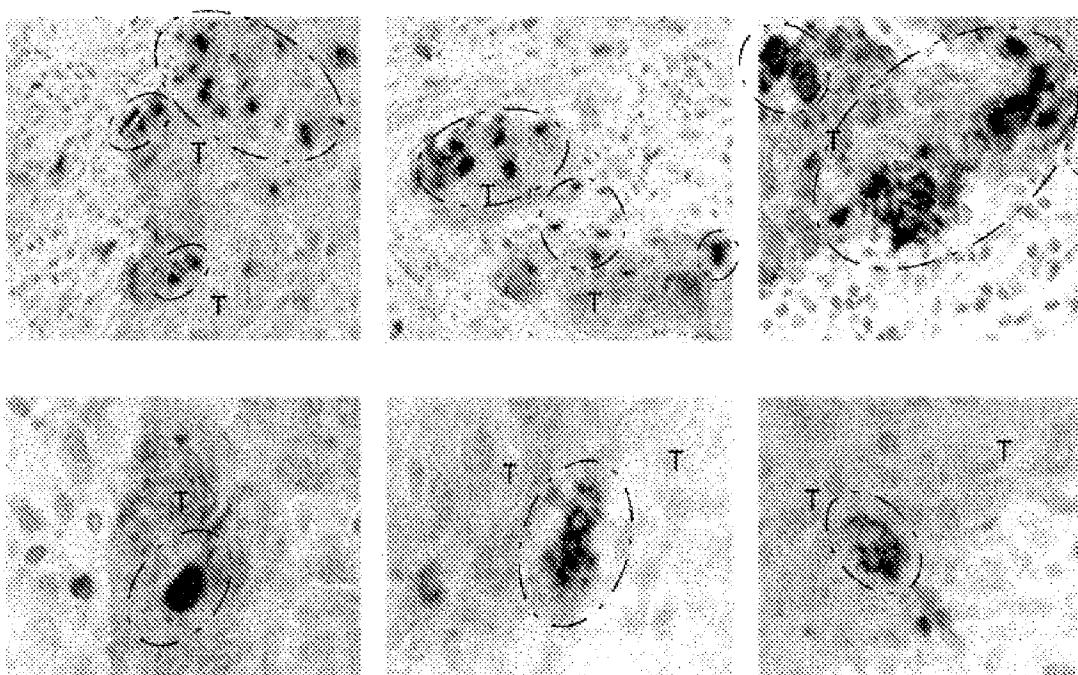


Fig. 7B

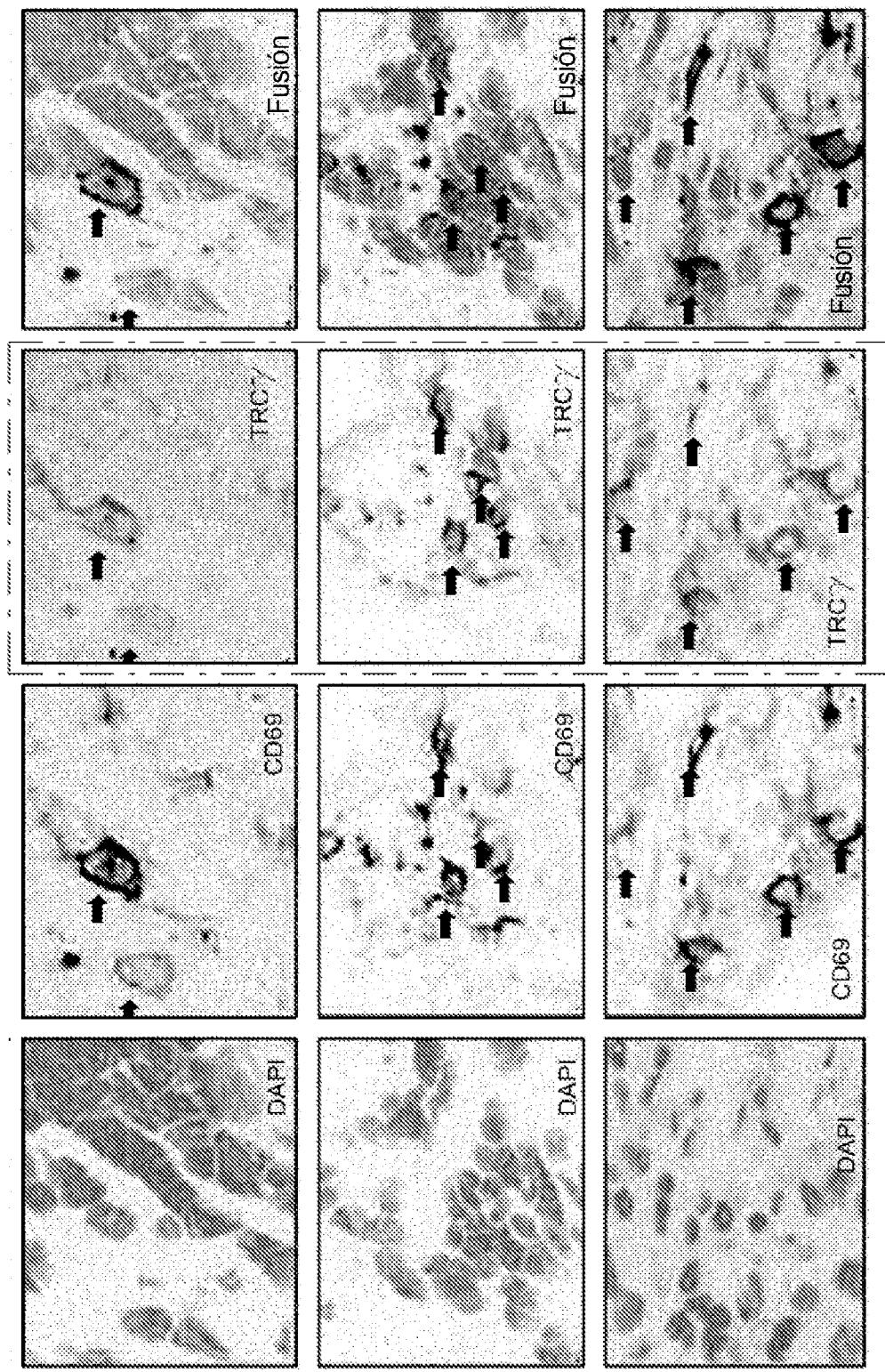


Fig. 8A

Paciente	Seq. identificada	Seq. única	Secuencias compartidas de TCR δ en cáncer de mama triple negativo										
			HD	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K
A	2	1	A	1									
B	8	6	B	0	6								
C	9	8	C	0	4	8							
D	5	3	D	0	1	1	3						
E	10	6	E	0	1	1	1	1	1	8			
F	8	8	F	0	1	1	1	1	1	1	1		
G	5	5	G	0	1	1	1	1	1	1	1		
H	2	2	H	0	1	0	0	0	0	0	0	2	
I	0	0	I	ND	0								
K	2	2	K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Z	4	4	Z	0	0	0	0	1	0	0	0	0	4
Total	55	41											

Secuencias compartidas Vdelta **Clon #** Compartido por n.º de pacientes
 CAASSPPRGYTGSDKLF C132 6
 CALGONLGDRKPSYDILGCDTDL Vdelta1 ZeII 2

Fig. 8B

Paciente	Seq. identificada	Seq. única	Secuencias compartidas de TCR γ en cáncer de mama triple negativo											
			HD	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K	Z
A	18	16	A	1										
B	13	11	B	2	11									
C	16	18	C	2	0	6								
D	8	7	D	0	1	0								
E	12	10	E	1	1	0								
F	8	7	F	0	0	0	1	3	7					
G	9	9	G	0	0	0	0	0	0	0	0			
H	0	0	H	ND	0									
I	2	2	I	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
K	1	1	K	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Z	3	2	Z	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	2
Total	90	68												

Secuencias compartidas Vgamma **Clon #** Compartido por n.º de pacientes
 CATWDFYYKKLF Vgamma4 2
 CATWDGQKRLF Vgamma2 F4 3
 CATWDGPPYYKKLF Vgamma4 E113, F2 2
 CATWDNYKKLF Vgamma8 B23, Z11, ZeI 5

Fig. 9A

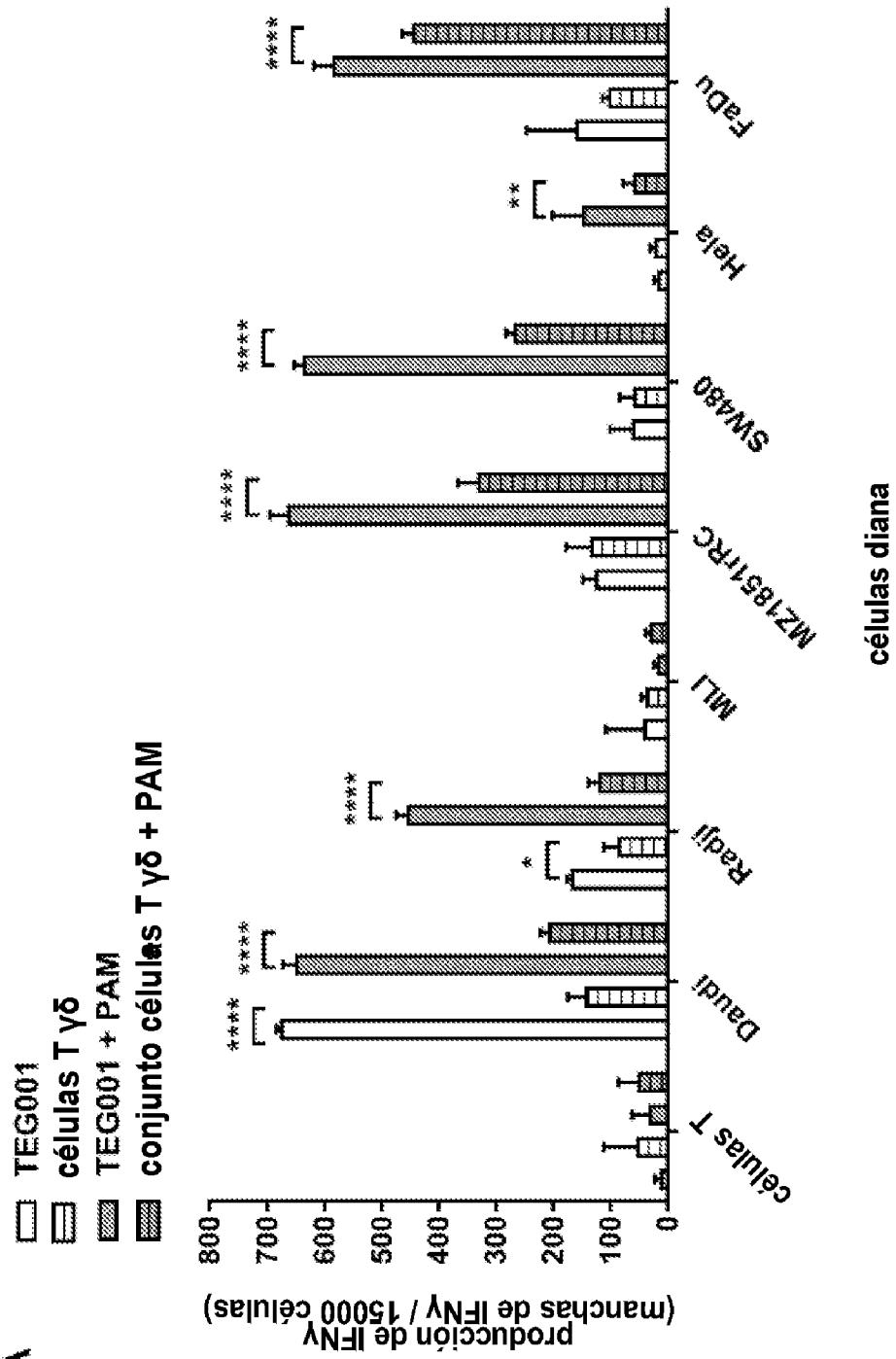


Fig. 9B

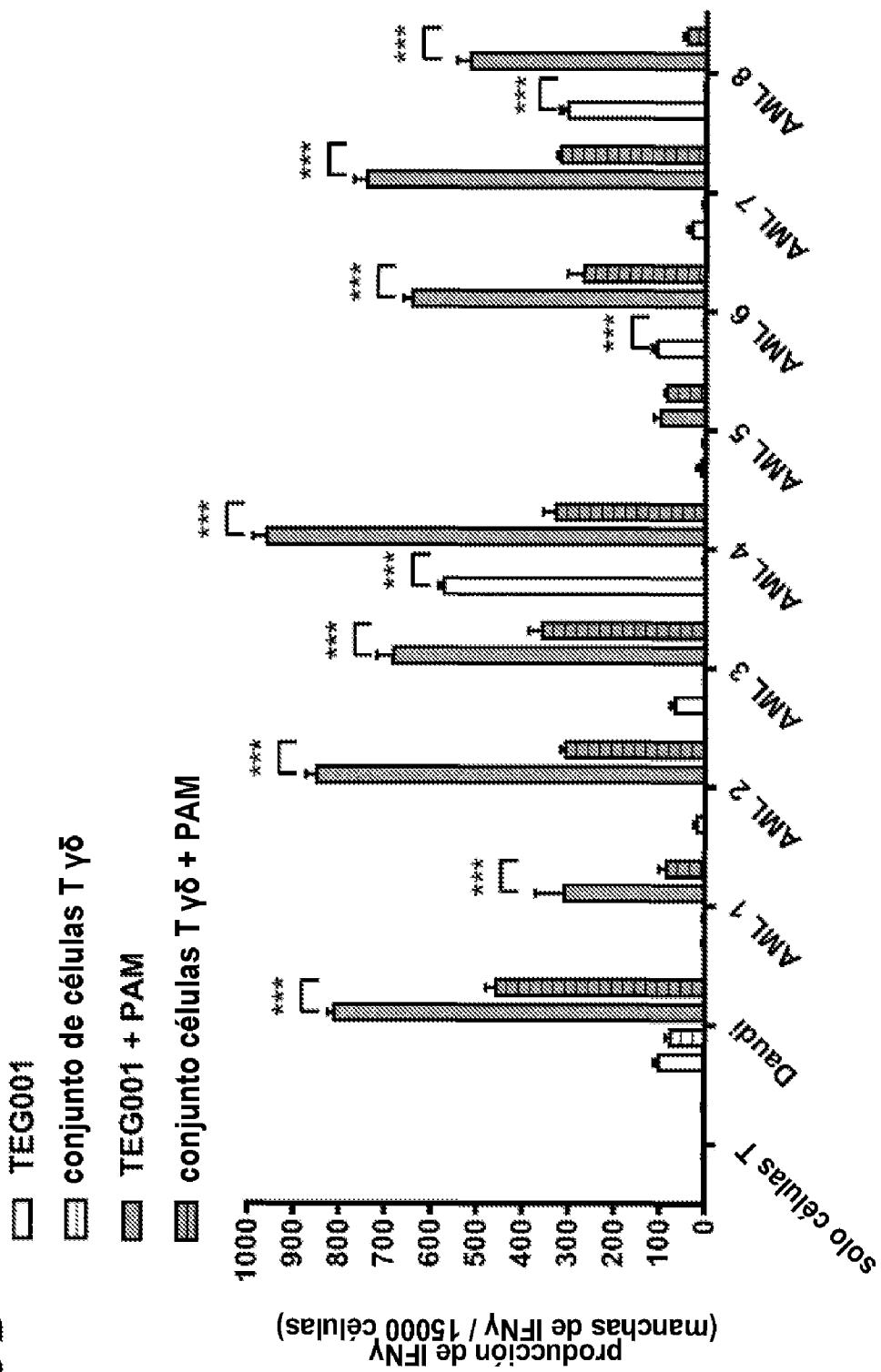


Fig. 10A

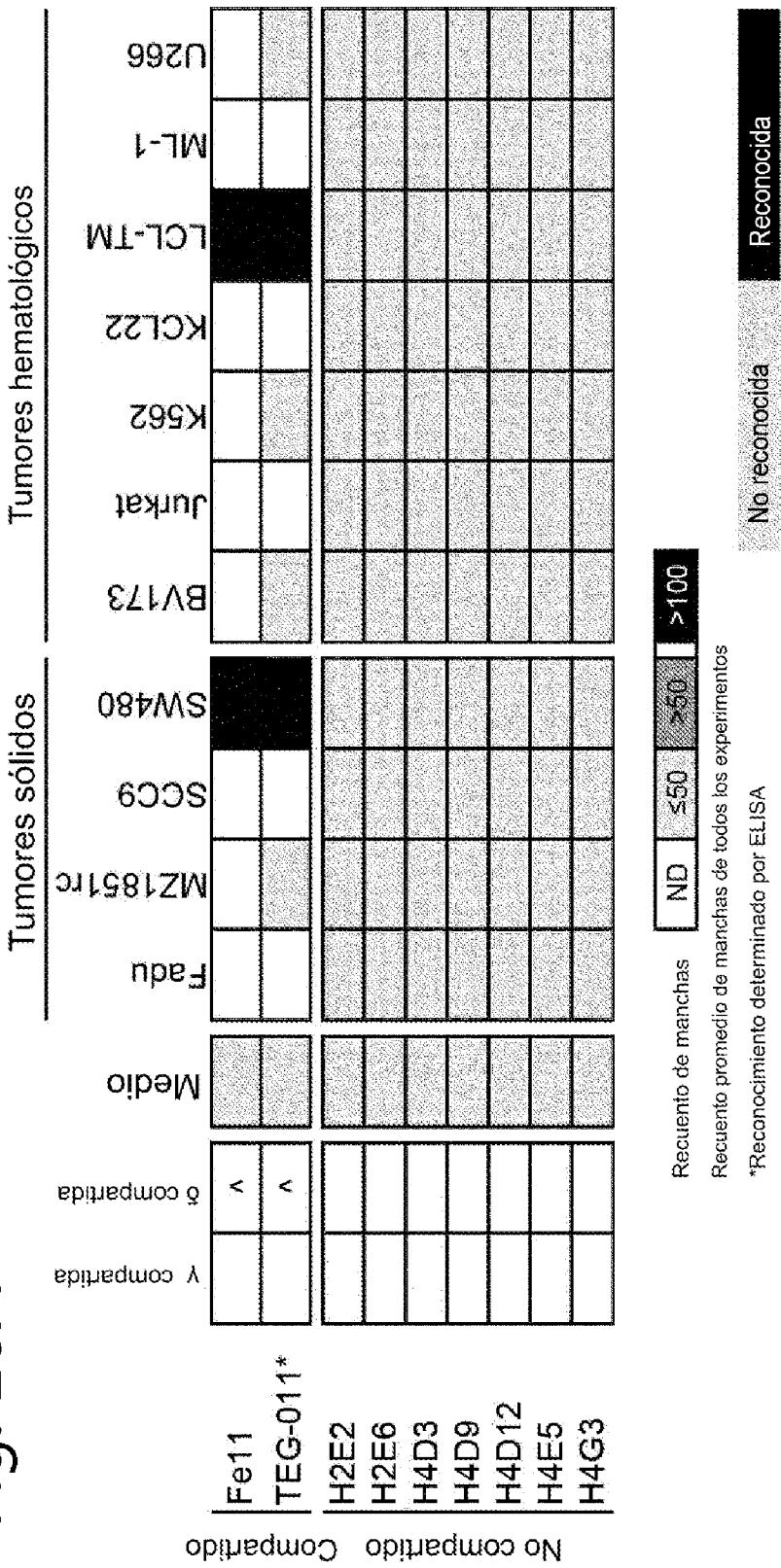


Fig. 10B

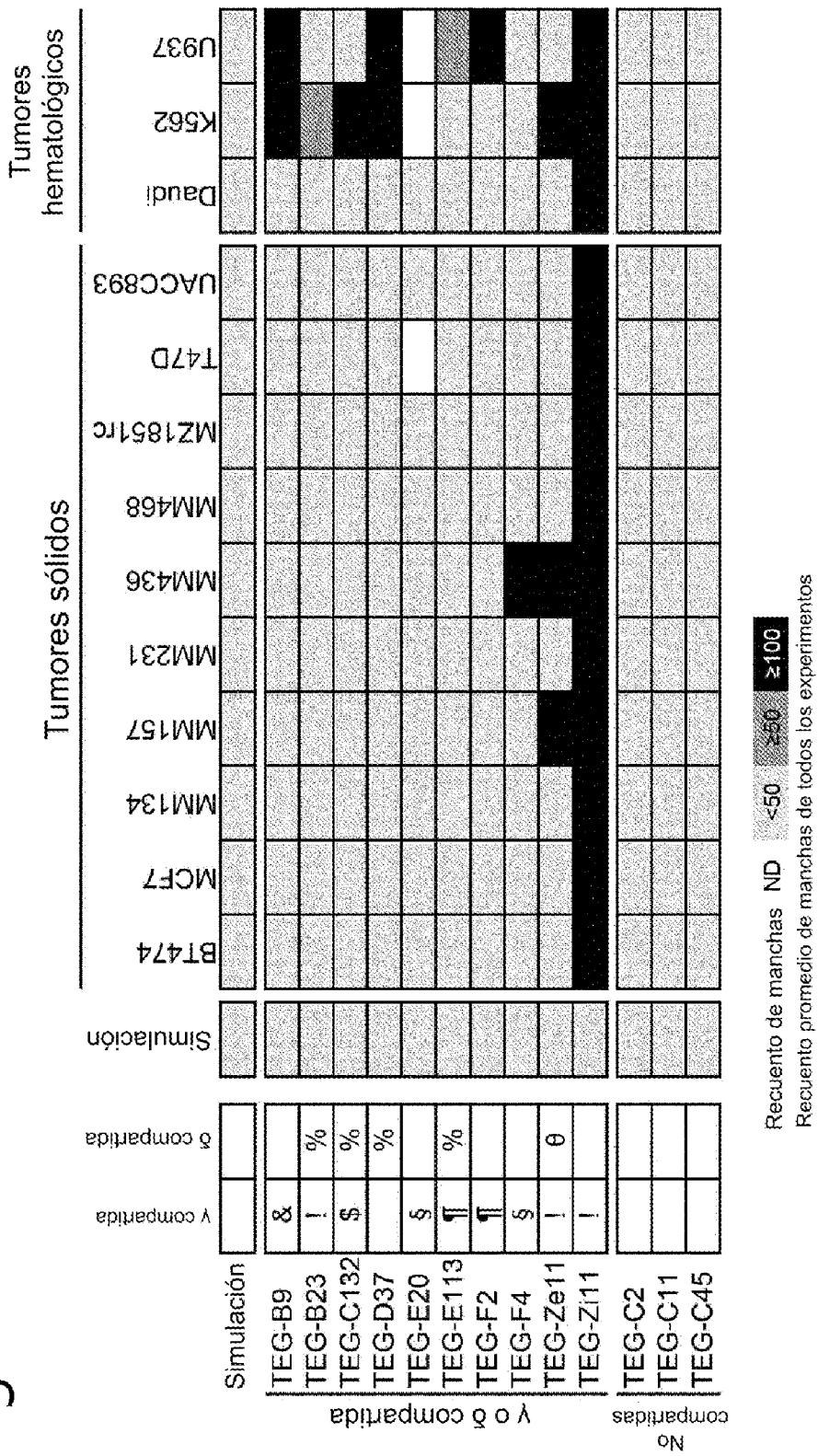


Fig. 11A

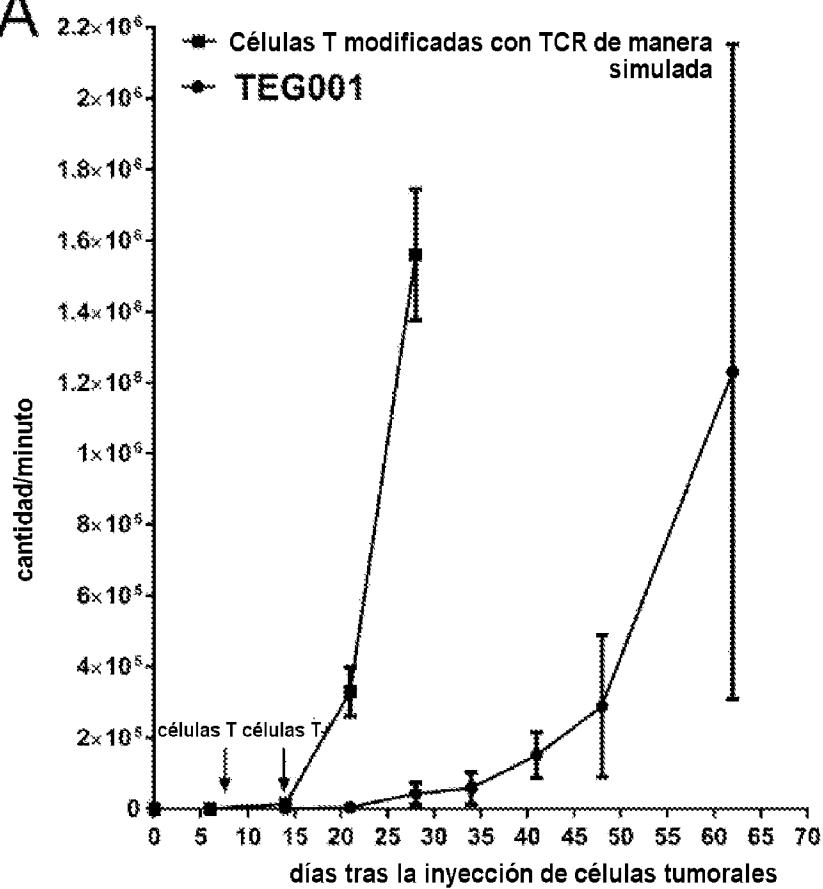


Fig. 11B

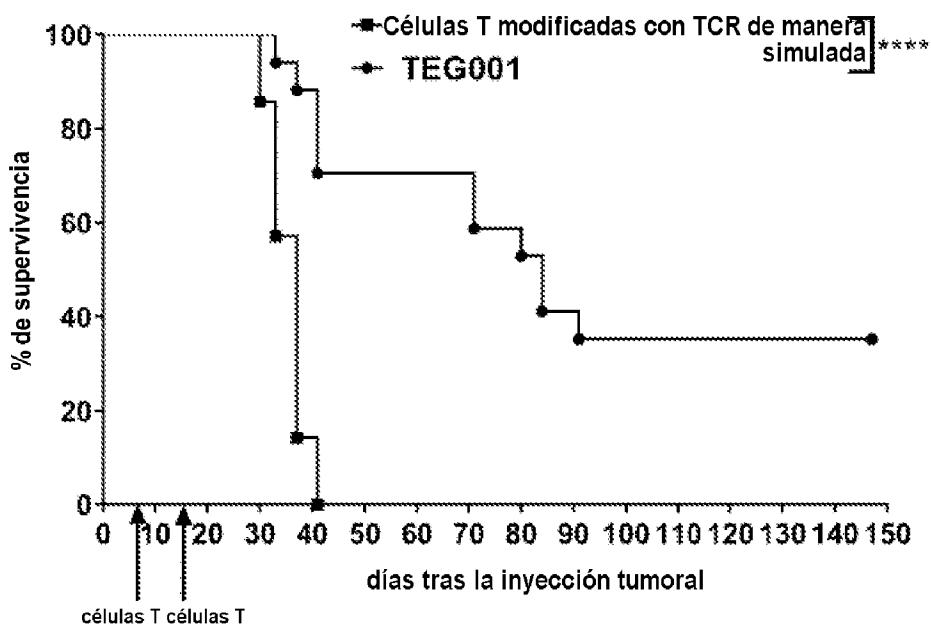


Fig. 12

