

1
NUEVO MÉTODO

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a métodos para expandir células T $\gamma\delta$, dicho método comprende los pasos de preparación de una composición enriquecida para células T $\gamma\delta$ y cultivar dicha composición en presencia de células alimentadoras. Además se proporciona un método para modificar células T $\gamma\delta$, dicho método comprende los pasos de preparación de una composición enriquecida para células T $\gamma\delta$, transducción de la composición para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico para un antígeno asociado a un tumor y cultivar la composición transducida para expandir las células T $\gamma\delta$ modificadas. Tales células T $\gamma\delta$ incluyen células no V δ 2, por ejemplo, células V δ 1, V δ 3 y V δ 5. Las células T $\gamma\delta$ expandidas y modificadas producidas de acuerdo con los métodos descritos en la presente resultan de utilidad en terapias de células T adoptivas, terapias de receptores quiméricos y similares. La presente invención además se refiere tanto a células individuales como a poblaciones de células producidas a través de los métodos descritos en la presente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El creciente interés en la inmunoterapia con células T para el cáncer se ha centrado en la capacidad evidente de los subconjuntos de células T $\alpha\beta$ CD8⁺ y CD4⁺ de reconocer células cancerosas y mediar en los potenciales funcionales protectores del huésped, en particular cuando se desreprimen por el antagonismo clínicamente mediado de las vías inhibitoras ejercidas por PD-1, CTLA-4 y otros receptores. Sin embargo, las células T $\alpha\beta$ están restringidas por el MHC, lo que puede conducir a la enfermedad de injerto contra huésped en un entorno alogénico.

El tratamiento del cáncer con terapia de células adoptivas se limita en gran medida a plataformas basadas en células T $\alpha\beta$ autólogas circulantes, derivadas de pacientes y modificadas por ingeniería genética. Si bien tiene éxito en algunas neoplasias malignas hematológicas, este enfoque presenta desafíos que incluyen las toxicidades asociadas, altos costos de producción y el requisito de editar las células genéticamente para evitar la enfermedad de injerto contra huésped si se usan en un entorno alogénico. Si bien las células T $\alpha\beta$ modificadas han mostrado actividad terapéutica en neoplasias malignas hematológicas, la actividad clínica en tumores sólidos ha sido desafiante.

Las células T gamma delta (células T $\gamma\delta$) representan un subconjunto de células T que expresan en su superficie un receptor de células T (TCR) $\gamma\delta$ distinto y definidor. Este TCR está formado por una cadena gamma (γ) y una cadena delta (δ). Las cadenas de TCR $\gamma\delta$ humanas se seleccionan de tres

238522

cadenas δ principales, V δ 1, V δ 2 y V δ 3 y seis cadenas γ . Las células T $\gamma\delta$ humanas pueden clasificarse ampliamente en función de sus cadenas de TCR, ya que ciertos tipos γ y δ se encuentran en las células con mayor prevalencia, aunque no exclusivamente, en uno o más tipos de tejido. Por ejemplo, la mayoría de las células T $\gamma\delta$ residentes en sangre expresan un TCR V δ 2, por ejemplo V γ 9V δ 2, mientras que esto es menos común entre las células T $\gamma\delta$ residentes en los tejidos, que usan con mayor frecuencia V δ 1 en la piel y V γ 4 en el intestino.

Así, a diferencia de las células T $\alpha\beta$, las células T V δ 1 $\gamma\delta$ son un subconjunto de células T innatas definidas por la expresión de receptores de células T compuestos por una cadena γ emparejada con una cadena V δ 1. En ratones, las células T V δ 1 $\gamma\delta$ residen predominantemente en tejidos donde son altamente protectoras contra un amplio espectro de carcinomas al mediar respuestas antitumorales a través del reconocimiento mediante receptores de citotoxicidad natural y de patrones. De manera similar, en los seres humanos, las células T V δ 1 $\gamma\delta$ residen predominantemente dentro de los tejidos epiteliales, median el reconocimiento de células diana que no está restringido por el MHC y no son alo-HLA reactivas. Por lo tanto, no se requiere la compatibilidad de HLA de los pacientes para las terapias de células adoptivas de células T $\gamma\delta$. La biología innata de las células T V δ 1 $\gamma\delta$ que permite el reconocimiento tumoral independiente de antígenos, la falta de necesidad de compatibilidad con el HLA y la migración inherente a los tejidos humanos y su residencia en ellos hace que las células T V δ 1 $\gamma\delta$ sean una plataforma atractiva para la terapia celular.

Por lo tanto, existe la necesidad de contar con métodos para expandir de manera eficiente células T $\gamma\delta$ con el fin de permitir su adaptación como terapias, por ejemplo, como terapias de células T adoptivas, y de métodos que tengan el potencial de proporcionar terapias con células T $\gamma\delta$ que expresen receptores de antígenos quiméricos "listas para usar" alogénicas, como para el tratamiento de tumores sólidos.

WO2017072367 y WO2018202808 se refieren a métodos de expansión de células T $\gamma\delta$ residentes en tejido no hematopoyético *in vitro* mediante el cultivo de linfocitos obtenidos a partir de tejido no hematopoyético en presencia de por lo menos interleucina-2 (IL-2) y/o interleucina-15 (IL-15). WO2015189356 describe una composición para expandir linfocitos obtenida a partir de una muestra obtenida por aféresis que comprende por lo menos dos tipos de citocinas seleccionadas entre IL-2, IL-15 e IL-21.

En consecuencia, si bien estas divulgaciones contribuyen de alguna manera a abordar el problema antes mencionado, sigue existiendo la necesidad de contar con métodos para expandir y modificar

células T $\gamma\delta$, como las de la piel, que posibiliten el uso de dichas células T $\gamma\delta$ en terapia.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para expandir células

5 T $\gamma\delta$, en donde dicho método comprende los pasos de:

(i) preparación de una composición enriquecida para células T $\gamma\delta$; y

(ii) cultivar la composición en presencia de células alimentadoras, en donde las células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 4:1 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$).

10

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para expandir células T $\gamma\delta$, en donde dicho método comprende los pasos de:

(i) preparación de una composición enriquecida para células T $\gamma\delta$; y

(ii) cultivar la composición en presencia de células alimentadoras y medios que comprenden

15 IL 15 e IL-21, en donde las células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 3:2 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$).

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para expandir células T $\gamma\delta$, en donde dicho método comprende los pasos de:

20 (i) preparación de una composición enriquecida para células T $\gamma\delta$ mediante la depleción (vaciamiento) de células T $\alpha\beta$; y

(ii) cultivar la composición en presencia de células alimentadoras, en donde las células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 3:2 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$).

25

De acuerdo con otro aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para modificar células T $\gamma\delta$, dicho método comprende los pasos de:

(i) preparación de una composición enriquecida para células T $\gamma\delta$;

(ii) transducción de la composición para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconoce un antígeno tumoral en ausencia de estimulación TCR; y

30

(iii) cultivo de la composición transducida para expandir las células T $\gamma\delta$ modificadas, en donde los pasos (ii) y (iii) pueden ejecutarse en cualquier orden o al mismo tiempo.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una población de células T $\gamma\delta$ expandidas que puede obtenerse, tal cual se ha obtenido, mediante el métodos descritos en la

35

presente. De acuerdo con un aspecto adicional, se proporciona una población de células T $\gamma\delta$ modificadas que puede obtenerse, tal cual se ha obtenido, mediante el métodos descritos en la presente.

- 5 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la población de células T $\gamma\delta$ expandidas o la población de células T $\gamma\delta$ modificadas descritas en la presente.

10 De acuerdo con otro aspecto adicional de la invención, se proporciona la población de células T $\gamma\delta$ expandidas, la población de células T $\gamma\delta$ modificadas o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente para usar como un medicamento. En otro aspecto, se proporciona la población de células T $\gamma\delta$ expandidas, la población de células T $\gamma\delta$ modificadas o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente para usar en el tratamiento del cáncer, como para el tratamiento de tumores sólidos.

- 15 Además se proporciona un método para expandir células T $\gamma\delta$, en donde dicho método comprende los pasos de:

(i) preparación de una composición enriquecida para células T $\gamma\delta$; y

- (ii) cultivar la composición en presencia de células alimentadoras, en donde las células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 1:2 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$), en especial por lo menos 1:1 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$), en particular por lo menos 2:1 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$), como por lo menos 3:1 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$).

- 25 Además se proporciona un método para expandir células T $\gamma\delta$, en donde dicho método comprende los pasos de:

(i) preparación de una composición enriquecida para células T $\gamma\delta$; y

- (ii) cultivar la composición en presencia de células alimentadoras y medios que comprenden IL-15 e IL-21, en donde las células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 1:2 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$), como por lo menos 1:1 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$).

- Además se proporciona un método para expandir células T $\gamma\delta$, en donde dicho método comprende los pasos de:

- (i) preparación de una composición enriquecida para células T $\gamma\delta$ mediante la depleción de células T $\alpha\beta$; y

(ii) cultivar la composición en presencia de células alimentadoras, en donde las células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 1:2 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$), como por lo menos 1:1 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$).

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Comparación de varias fuentes de células alimentadoras para la expansión de células T $\gamma\delta$. Las células T $\gamma\delta$ se aislaron de la piel, se vaciaron de las células T $\alpha\beta$ y se cocultivaron durante 7 días con las siguientes células irradiadas: linfocitos alogénicos de sangre periférica (PBLs), células mononucleares de sangre periférica alogénicas (PBMCs), PBMCs alogénicas activadas anti-CD3 CD28 (PBMCs Act) o cultivos alogénicos de aislamiento de piel (células aisladas de la piel /células de la piel $\alpha\beta$), en comparación con el control (4CK). **A)** La proliferación se muestra usando el marcador Ki67, y el número total de células V δ 1 se indica en **B**.

Figura 2: Expansión de células $\gamma\delta$ cuando las células T $\gamma\delta$ se seleccionan positivamente de la población inicial y se vuelven a agregar a la población restante de células alimentadoras en diversas proporciones. **A)** La expansión multiplicada de las células T $\gamma\delta$ se determinó luego de los días indicados en el cultivo en presencia de células alimentadoras (células T $\gamma\delta$ 1%, 5%, 10%, 20%, o 40% enriquecidas, sin contenido de células $\alpha\beta$ al D0 estando el resto del cultivo conformado por células alimentadoras autólogas) a lo que sigue la selección positiva de las células T $\gamma\delta$. **B)** Como para **A** en ausencia de células alimentadoras.

Figura 3: Expansión de células $\gamma\delta$ cuando las células $\alpha\beta$ se deplecionan de la población inicial y se vuelven a agregar como células alimentadoras en varias proporciones. **A)** La expansión multiplicada de células T $\gamma\delta$ se determinó luego de los días indicados en el cultivo en presencia de células alimentadoras (1%, 5%, 10%, 20%, o 40% sin contenido de células $\alpha\beta$ al D0 estando el resto del cultivo conformado por células alimentadoras autólogas). **B)** Como para **A** en ausencia de células alimentadoras.

Figura 4: Las células T $\gamma\delta$ CAR CD19+ muestran actividad citotóxica contra las células diana NALM6. Las composiciones de células T $\gamma\delta$ que incluyen células alimentadoras $\alpha\beta$ fueron transducidas con CAR CD19 a lo que siguió la eliminación de las células alimentadoras de las células T $\gamma\delta$ expandidas mediante el vaciamiento de las células T $\alpha\beta$. Las células T $\gamma\delta$ transducidas luego fueron incubadas con células diana NALM6 que expresan CD19 a las relaciones indicadas y la cantidad de eliminación medida.

Figura 5: Las células T $\gamma\delta$ transducidas criopreservadas son viables, la expresión de CAR es estable y la actividad citotóxica se conserva después de la descongelación. **A)** Los niveles de expresión de CAR al día 14 de la expansión, antes de congelar. **B)** Como para **A**, la proporción de células CAR CD19+ se midió siete días después de la descongelación, lo que demuestra buenos niveles de expresión incluso después de la congelación y la recuperación.

Figura 6: Las células T $\gamma\delta$ CAR CD19 transducidas post-descongelación, en donde las células alimentadoras fueron eliminadas mediante la depleción de células T $\alpha\beta$, fueron incubadas con células diana NALM6 que expresan CD19 a las relaciones indicadas y la cantidad de eliminación medida.

Figura 7: Las células T Meso-CAR $\gamma\delta$ transducidas, en donde la población inicial de T $\gamma\delta$ fue vaciada de $\alpha\beta$, luego fueron transducidas y cultivadas conforme lo descripto, lo que da como resultado una población de células T $\gamma\delta$ que tiene más del 40% de mesotelina CAR⁺.

Figura 8: Las células T $\gamma\delta$ transducidas con un meso-CAR demuestran citotoxicidad contra líneas celulares de cáncer positivas a mesotelina. **A)** Viabilidad de células simuladas y transducidas después de la descongelación **B)** Citotoxicidad frente a células Hela **C)** Citotoxicidad frente a células SCOV-3

Figura 9: Las células T $\gamma\delta$ seleccionadas negativamente se cultivaron ya sea con células T residentes de la piel CD4 $\alpha\beta$ ("Alimentadoras CD4"), o bien con células T residentes de la piel CD8 $\alpha\beta$ "Alimentadoras CD8"), con ambas células T CD4 y CD8 $\alpha\beta$ ("Alimentadoras $\alpha\beta$ ") o se cultivaron alternativamente sin el agregado de otras células alimentadoras ("solamente $\gamma\delta$ "). Luego se expandieron los cultivos durante 14 días (primer gráfico) o 21 días (segundo gráfico) antes de cosecharlos y se calculó el índice de expansión $\gamma\delta$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se ha reportado que las poblaciones de células T $\gamma\delta$ se pueden expandir a una escala clínica utilizando células presentadoras de antígenos artificiales irradiadas (aAPC) como alimentadoras (Deniger *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2014; 20(22): 5708–5719). Tales aAPC se derivan de células tumorales K562 y expresan CD137L que, en presencia de IL-2 e IL-21, conduce a la activación y propagación de una población policlonal de células T $\gamma\delta$. Sin embargo, tales métodos requieren la modificación genética de las células tumorales K562 para que funcionen como aAPC y apoyen la expansión de las células T $\gamma\delta$ y la activación, así como la irradiación para detener el crecimiento de

estas aAPC derivadas de tumores.

En consecuencia, de acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para expandir células T $\gamma\delta$, en donde dicho método comprende los pasos de:

- 5 (i) preparación de una composición enriquecida para células T $\gamma\delta$; y
 - (ii) cultivar la composición en presencia de células alimentadoras, en donde las células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 4:1 (células alimentadoras: células T $\gamma\delta$).
- 10 Los métodos descritos en la presente se ejecutan fuera del cuerpo humano o animal, es decir, son *in vitro* y/o *ex vivo*. Así, en una forma de realización los métodos descritos en la presente son métodos *in vitro*. En una forma de realización adicional, los métodos descritos en la presente son métodos *ex vivo*.
- 15 De acuerdo con la presente, las referencias a “expandidas”, “población expandida” o células T $\gamma\delta$ expandidas” incluyen poblaciones de células que son más grandes o contienen un mayor número de células que una población no expandida. Dichas poblaciones pueden ser grandes en número, pequeñas en número o una población mixta con la expansión de una proporción o tipo de célula particular dentro de la población. Se advertirá que el término “etapa de expansión” hace referencia
- 20 a procesos que dan como resultado una expansión o una población expandida. Por lo tanto, la expansión o una población expandida puede ser mayor en número o contener una mayor cantidad de células en comparación con una población a la que no se le ha realizado un paso de expansión o antes de cualquier paso de expansión. Además se advertirá que cualquier cifra mencionada para indicar expansión (por ejemplo, aumento multiplicado o expansión multiplicada) es ilustrativa de un
- 25 aumento en el número o tamaño de una población de células o el número de células y es indicativa de la cantidad de expansión.

Se advertirá que el cultivo de la composición de células T $\gamma\delta$ se realiza durante un lapso efectivo para producir una población expandida de células T $\gamma\delta$. En una forma de realización, un lapso

30 efectivo para producir una población expandida de células T $\gamma\delta$ es de por lo menos 7 días. Así, en una forma de realización, la composición de células T $\gamma\delta$ se cultiva durante por lo menos 7 días. En una forma de realización adicional, la composición se cultiva durante entre 7 y 21 días, como entre 9 y 15 días. En formas de realización adicionales, la composición se cultiva durante aproximadamente 10, 11, 12, 13 o 14 días.

En aún otras formas de realización, la composición se cultiva durante por lo menos 5 días, por lo menos 6 días, por lo menos 7 días, por lo menos 8 días, por lo menos 9 días, por lo menos 10 días, por lo menos 11 días, por lo menos 12 días, por lo menos 13 días, por lo menos 14 días o por lo menos 21 días, por ejemplo, aproximadamente 14 días o aproximadamente 21 días para producir una población expandida de células T $\gamma\delta$. En una forma de realización, la composición se cultiva durante aproximadamente 10, 11, 12, 13 o 14 días para producir una población expandida de células T $\gamma\delta$.

Convenientemente la expansión de la población de células T $\gamma\delta$ proporciona por lo menos 5 veces, especialmente por lo menos 10 veces, en particular por lo menos 20 veces, como por lo menos 50 veces, por ejemplo por lo menos 100 veces el número de células T $\gamma\delta$.

En una forma de realización, el método comprende congelar las células T $\gamma\delta$ expandidas. Tales células T $\gamma\delta$ expandidas congeladas pueden descongelarse posteriormente para su procesamiento o uso posterior, como el uso terapéutico. La congelación permite el transporte fácil y el almacenamiento a largo plazo de las células T $\gamma\delta$ expandidas y se conoce en la técnica. En consecuencia, resultaría conveniente un método que proporcione células que muestren buena viabilidad y actividad después de la congelación y descongelación, pero no todos los métodos de expansión producen tales células (los datos no se indican).

Una relación de células alimentadoras : células T $\gamma\delta$ de por lo menos 4:1 es igual a una proporción de por lo menos 80% células alimentadoras a 20% o menos células T $\gamma\delta$ en el cultivo. Tal relación de células alimentadoras : células T $\gamma\delta$ produce una expansión mucho mayor de la población de células T $\gamma\delta$ en el cultivo en comparación con una población de células T $\gamma\delta$ cultivada en ausencia de células alimentadoras (**Figuras 2 a 3**). Además, la pureza de las células T $\gamma\delta$ en la población CD45⁺ dentro de estos cultivos aumenta incluso a los niveles más altos de adición de células alimentadoras (los datos no se indican). Estos efectos beneficiosos se ven en todos los puntos de tiempo del cultivo, particularmente al día 14 y al día 21 del cultivo.

Así, en una forma de realización el cultivo comprende por lo menos 80% células alimentadoras. En algunas formas de realización, las células alimentadoras están presentes en una relación de aproximadamente entre 10:1 y aproximadamente 99:1 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$). En una forma de realización, las células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 10:1 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$). Así, en una forma de realización adicional el cultivo comprende por lo menos 90% células alimentadoras. En una forma de realización adicional, las

células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 20:1 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$). Así, de acuerdo con una forma de realización el cultivo comprende por lo menos 95% células alimentadoras. En otra forma de realización adicional, las células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 50:1 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$). Así, en una forma de realización el cultivo comprende por lo menos 98% células alimentadoras. En aún otra forma de realización, las células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 99:1 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$). Así, en una forma de realización adicional el cultivo comprende por lo menos 99% células alimentadoras. Todas las relaciones testeadas en la presente proporcionan una expansión muy mejorada de la población de células T $\gamma\delta$ en el cultivo en comparación con una población de células T $\gamma\delta$ cultivadas sin células alimentadoras (**Figura 1**), con un rendimiento particularmente bueno y pureza de las células T $\gamma\delta$ cuando las células alimentadoras están presentes en una relación de aproximadamente entre 10:1, es decir en donde el cultivo comprende aproximadamente 90% células alimentadoras.

Las células alimentadoras de acuerdo con la presente invención pueden ser células T no $\gamma\delta$ autólogas o alogénicas sin modificar, es decir son células derivadas del mismo o un donante diferente que la composición enriquecidas para células T $\gamma\delta$. Tales células alimentadoras incluyen células T $\alpha\beta$ y opcionalmente células asesinas naturales (células NK) derivadas del mismo tejido o del mismo tipo de tejido (independientemente de que se deriven del mismo/de un único donante o de uno diferente) que la composición enriquecida para células T $\gamma\delta$. Por ejemplo, cuando las células T $\gamma\delta$ se aíslan de tejido no hematopoyético como la piel, las células alimentadoras pueden ser células T no $\gamma\delta$ también aisladas de dicho tejido no hematopoyético (por ejemplo, piel). Tales células alimentadoras, incluyendo las células T $\alpha\beta$ también se pueden aislar inicialmente de tejidos hematopoyéticos, pero posteriormente se modifican mediante un cultivo celular o manipulación genética para parecerse al fenotipo y la biología de las células T $\alpha\beta$ residentes en tejidos o de memoria que normalmente no se encuentran en grandes cantidades en los tejidos hematopoyéticos. Así, en una forma de realización las células alimentadoras y la composición enriquecida para células T $\gamma\delta$ derivan de un solo donante. En otra forma de realización, las células alimentadoras y la composición enriquecida para células T $\gamma\delta$ derivan de distintos donantes.

En una forma de realización, la composición de células T $\gamma\delta$ deriva de un único donante. En una forma de realización alternativa, la composición deriva de múltiples donantes, es decir la composición es una composición 'combinada'. En una forma de realización adicional, las células alimentadoras derivan de un solo donante. En otra forma de realización, las células alimentadoras derivan de múltiples donantes, es decir las células alimentadoras son 'combinadas'. Así, en una

forma de realización, las células alimentadoras se obtienen de múltiples donantes y la composición enriquecida para células T $\gamma\delta$ se obtiene de un solo donante. En otra forma de realización, las células alimentadoras se obtienen de un solo donante y la composición enriquecida para células T $\gamma\delta$ se obtiene de múltiples donantes.

5

En una forma de realización el único o los múltiples donantes pueden comprender un sujeto que va a ser tratado con las poblaciones de células o composiciones de la invención. Alternativamente, el único o los múltiples donantes no comprenden un sujeto que ha de ser tratado con las poblaciones de células o composiciones de la invención.

10

En algunas formas de realización, las células alimentadoras comprenden una población de células T ricas en $\alpha\beta$. En una forma adicional de realización, las células alimentadoras comprenden células T $\alpha\beta$. En una forma de realización, las células T $\alpha\beta$ comprenden células T CD4 y/o células T CD8. Se entenderá que al hablar de las “células CD4” o de las “células CD4+” se hace referencia a un tipo de célula T que expresa la proteína de superficie CD4. Igualmente, cuando se habla de “células T CD8” o de “células T CD8+” se hace referencia a un tipo de célula T que expresa la proteína de superficie CD8.

15

En una forma particular de realización, las células alimentadoras comprenden a las células T CD4. En otra forma de realización, las células alimentadoras consisten en células T CD4.

20

En aún otra forma de realización, las células alimentadoras comprenden una población mixta de células T $\alpha\beta$ y células asesinas naturales (NK). De esta manera, en una forma de realización las células alimentadoras comprenden además células asesinas naturales (NK).

25

Se advertirá que las células alimentadoras de acuerdo con la presente que proporcionan habilidades coestimuladoras y presentadoras de antígenos naturales, no están modificadas genéticamente para funcionar como células presentadoras de antígenos y, por lo tanto, no son aAPC. Además, no es necesario detener el crecimiento de las células alimentadoras, como por irradiación o tratamiento con mitomicina-C porque no derivan de células tumorales. Sin embargo, en otra forma de realización, se detiene el crecimiento de las células alimentadoras. Los métodos de detención del crecimiento son conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, irradiación (por ejemplo, irradiación γ) y tratamiento con mitomicina-C, que producen células alimentadoras que son incapaces de replicarse pero permanecen metabólicamente activas, proporcionando así suficiente apoyo al crecimiento para las células T $\gamma\delta$. La detención del crecimiento de las células alimentadoras permite el cultivo a largo plazo de las células T $\gamma\delta$ sin el crecimiento de estas células cuando están presentes en grandes

30

35

cantidades/una gran proporción en comparación con las células T $\gamma\delta$. Así, en una forma de realización adicional las células alimentadoras son irradiadas. En una forma de realización alternativa, las células alimentadoras son tratadas con mitomicina C.

5 En una forma de realización, las células alimentadoras se obtienen de tejido no hematopoyético. En una forma de realización adicional, las células alimentadoras se obtienen de la piel. Los ejemplos de tejido no hematopoyético y los métodos para su preparación pueden encontrarse en WO2020095058 y, WO2020095059, que se incorporan por completo a la presente.

10 En otras formas de realización, la composición enriquecida para células T $\gamma\delta$ comprende células NK. Así, en una forma de realización, el paso (i) comprende la depleción de células T $\alpha\beta$, es decir la composición enriquecida para células T $\gamma\delta$ se prepara mediante la depleción de células T $\alpha\beta$. En una forma de realización adicional, preparación de una composición enriquecida para células T $\gamma\delta$ de acuerdo con el paso (i) comprende la depleción de células T $\alpha\beta$ a partir de una población de
15 células mixta obtenida de una muestra inicial, como tejido no hematológico según se ha indicado. La presencia de células NK en la composición es ventajosa ya que estas células también son células citotóxicas eficaces. En consecuencia, una composición de células T $\gamma\delta$ que comprende adicionalmente células NK puede tener propiedades citotóxicas mejoradas en comparación con una composición de células T $\gamma\delta$ solas.

20 Las células NK (también conocidas como linfocitos granulares grandes (LGL)) son linfocitos citotóxicos del sistema inmunitario innato. Proporcionan respuestas rápidas a, por ejemplo, células infectadas por virus y células tumorales independientemente de la expresión del MHC en la superficie de la célula diana. En consecuencia, de manera similar a las células T $\gamma\delta$, el
25 reconocimiento de las células diana por parte de las células NK no está restringido por el MHC y no son alo-HLA reactivas, lo que significa que no se requiere la compatibilidad de HLA de los pacientes para las terapias basadas en células NK.

En consecuencia, de acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para
30 expandir células T $\gamma\delta$, en donde dicho método comprende los pasos de:

(i) preparación de una composición enriquecida para células T $\gamma\delta$ mediante la depleción de células T $\alpha\beta$; y

(ii) cultivar la composición en presencia de células alimentadoras, en donde las células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 3:2 (células alimentadoras células
35 T $\gamma\delta$).

Así, en ciertas formas de realización el cultivo comprende por lo menos 60% células alimentadoras. En otras formas de realización, el cultivo comprende por lo menos 66% células alimentadoras, como por lo menos 70% células alimentadoras.

5

En otra forma de realización, el paso (i) comprende la selección positiva de células T $\gamma\delta$ a partir de una población de células mixta obtenida de una muestra inicial.

En ciertas formas de realización, la muestra inicial es una muestra inicial de tejido humano. En formas de realización adicionales, la muestra inicial es tejido no hematopoyético, según se ha mencionado. En una forma de realización específica, la muestra inicial es piel.

En ciertas formas de realización, el método comprende retirar las células alimentadoras de las células T $\gamma\delta$ expandidas mediante la depleción de células T $\alpha\beta$. Esta eliminación mediante la depleción de células T $\alpha\beta$ da como resultado una población de células T $\gamma\delta$ expandidas producida por los métodos descritos en la presente que además comprende células NK. Conforme se ha descrito, las células NK son buenas células efectoras que, de manera similar a las células T $\gamma\delta$, no están restringidas por el MHC ni son alo-HLA reactivas. En consecuencia, en una forma de realización en particular la población de células T $\gamma\delta$ expandidas comprende células NK. En una forma de realización alternativa, el método comprende retirar las células alimentadoras de las células T $\gamma\delta$ expandidas por selección positiva de células T $\gamma\delta$. Tal selección positiva de células T $\gamma\delta$ da como resultado una población altamente purificada de células T $\gamma\delta$ que puede ser más apropiada para procesamiento posterior o uso en terapia en comparación con una población que comprende otros tipos o células adicionales.

25

En una forma de realización, la composición se cultiva en medios que comprenden IL-15. En una forma de realización adicional, la composición se cultiva en medios que comprenden IL-21. Así, en algunas formas de realización los medios comprenden IL-15 e IL-21. En otra forma de realización adicional, los medios además comprenden IL-2. En aún otra forma de realización, los medios además comprenden IL-4. Así, en algunas formas de realización los medios además comprenden IL-2 e IL-4. En formas de realización adicionales, los medios comprenden IL-15, IL-21, IL-2 e IL-4.

En una forma de realización específica, la composición enriquecida para células T $\gamma\delta$ se cultiva en el paso (ii) en presencia de medios que comprenden IL-15 e IL-21. En formas de realización adicionales, el paso (ii) comprende las condiciones y/o métodos para expandir células T $\gamma\delta$

35

divulgados en WO2017072367 y WO2018202808, que se incorporan por completo a la presente.

En consecuencia, de acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para expandir células T $\gamma\delta$, en donde dicho método comprende los pasos de:

- 5 (i) preparación de una composición enriquecida para células T $\gamma\delta$; y
- (ii) cultivar la composición en presencia de células alimentadoras y medios que comprenden IL-15 e IL-21, en donde las células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 3:2 (células alimentadoras: células T $\gamma\delta$).

10 De acuerdo con la presente, "IL-15" se refiere a IL-15 nativa o recombinante o una variante de la misma que actúa como agonista de una o más subunidades del receptor de IL-15 (IL-15R) (por ejemplo, mutantes, muteínas, análogos, subunidades, complejos de receptores, fragmentos, isoformas y peptidomiméticos de los mismos). IL-15, como IL-2, es un factor de crecimiento de células T conocido que puede ayudar a la proliferación de una línea celular dependiente de IL-2, CTLL-2. IL-15 fue reportado por primera vez por Grabstein, *et al.* (Grabstein, *et al. Science* 1994. 264,5161: 965-969) como una proteína madura de 114 aminoácidos. El término "IL-15", de acuerdo con la presente, hace referencia a IL-15 nativa o recombinante y muteínas, análogos, subunidades de las mismas o complejos de las mismas (por ejemplo, complejos de receptores, por ejemplo, péptidos sushi, conforme lo descrito en WO 2007/046006), y cada uno de los cuales puede 15 estimular la proliferación de células CTLL-2. En los ensayos de proliferación de CTLL-2, los sobrenadantes de las células transfectadas con precursores expresados de forma recombinante y fusiones en marco de formas maduras de IL-15 pueden inducir la proliferación de células CTLL-2. 20

La IL-15 humana se puede obtener de acuerdo con los procedimientos descritos por Grabstein, *et al.* o mediante procedimientos convencionales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 25 Se realizó un depósito de ADNc de IL-15 humana por ante la ATCC® el 19 de febrero de 1993 y se le asignó el número de acceso 69245.

La secuencia de aminoácidos de la IL-15 humana (ID de Gen 3600) se encuentra en Genbank bajo el localizador de acceso NP000576.1 GI: 10835153 (isoforma 1) y NP_751915.1 GI: 26787986 (isoforma 2). La secuencia de aminoácidos de IL-15 murina (*Mus musculus*) (ID de Gene 16168) se encuentra en Genbank bajo el localizador de acceso NP_001241676.1 GI: 363000984. 30

IL-15 también puede hacer referencia a IL-15 derivada de una variedad de especies de mamíferos, que incluyen, por ejemplo, humanos, simios, bovinos, porcinos, equinos y murinos. Una "muteína" o 35 238522

"variante" de IL-15, de acuerdo con la presente, es un polipéptido sustancialmente homólogo a una secuencia de una IL-15 de mamífero nativa pero que tiene una secuencia de aminoácidos diferente en comparación con un polipéptido de IL-15 de mamífero nativo debido a una delección, inserción o sustitución de aminoácidos. Las variantes pueden comprender secuencias sustituidas de forma conservadora, lo que significa que un residuo de aminoácido dado se reemplaza por un residuo que tiene características fisicoquímicas similares. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un resto alifático por otro, como Ile, Val, Leu o Ala entre sí, o sustituciones de un resto polar por otro, como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Otras sustituciones conservadoras de este tipo, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobicidad similares, son bien conocidas. Las variantes de IL-15 de origen natural también están contempladas por la invención. Los ejemplos de tales variantes son proteínas que resultan de eventos de corte y empalme Alternativos de ARNm o de la escisión proteolítica de la proteína IL-15, en donde se retiene la propiedad de unión de IL-15. El corte y empalme alternativo del ARNm puede producir una proteína IL-15 truncada pero biológicamente activa. Las variaciones atribuibles a la proteólisis incluyen, por ejemplo, diferencias en los extremos N o C después de la expresión en diferentes tipos de células huésped, debido a la eliminación proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de la proteína IL-15 (generalmente de 1 a 10 aminoácidos). En algunas formas de realización, el terminal de la proteína se puede modificar para alterar sus propiedades físicas, por ejemplo, con un grupo químico como el polietilenglicol (Yang, *et al. Cancer* 1995. 76:687-694). En algunas formas de realización, el terminal o interior de la proteína se puede modificar con aminoácidos adicionales (Clark-Lewis, *et al. PNAS* 1993. 90:3574-3577).

En algunas formas de realización, los métodos definidos en la presente incluyen IL-15 por lo general a una concentración de por lo menos 0,1 ng/mL, como por lo menos 10 ng/mL (por ejemplo, entre 0.1 ng/mL y 10,000 ng/mL, entre 1,0 ng/mL y 1,000 ng/mL, entre 5 ng/mL y 800 ng/mL, entre 10 ng/mL y 750 ng/mL, entre 20 ng/mL y 500 ng/mL, entre 50 ng/mL y 400 ng/mL, o entre 100 ng/mL y 250 ng/mL, por ejemplo, entre 0.1 ng/mL y 1,0 ng/mL, entre 1,0 ng/mL y 5,0 ng/mL, entre 5,0 ng/mL y 10 ng/mL, entre 10 ng/mL y 20 ng/mL, entre 20 ng/mL y 100 ng/mL, entre 20 ng/mL y 50 ng/mL, entre 40 ng/mL y 70 ng/mL, entre 50 ng/mL y 100 ng/mL, entre 50 ng/mL y 60 ng/mL, entre 100 ng/mL y 200 ng/mL, entre 200 ng/mL y 500 ng/mL, o entre 500 ng/mL y 1,000 ng/mL). En formas de realización adicionales, los métodos definidos en la presente incluyen IL-15 por lo general a una concentración de menos de 500 ng/mL, como menos de 100 ng/mL. En algunas formas de realización, la concentración de IL-15 es de aproximadamente 50 ng/mL. En otra forma de realización, la concentración de IL-15 es de aproximadamente 55 ng/mL.

De acuerdo con la presente, "IL-21" hace referencia a IL-21 nativa o recombinante o una variante de la misma que actúa como agonista de una o más subunidades del receptor de IL-21 (IL-21R) (por ejemplo, mutantes, muteínas, análogos, subunidades, complejos de receptores, fragmentos, isoformas, y peptidomiméticos de los mismos). Tales agentes pueden apoyar la proliferación de células T asesinas naturales (NK) y citotóxicas (CD8+). La IL-21 humana madura se presenta como una secuencia de 133 aminoácidos (menos el péptido señal, que consta de 22 aminoácidos N-terminales adicionales). Una muteína de IL-21 es un polipéptido en el que se han realizado sustituciones específicas a la proteína interleucina-21 conservando la capacidad de unirse a IL-21R α , como las descritas en la Patente Estadounidense Nro. 9,388,241. Las muteínas de IL-21 se pueden caracterizar por inserciones, deleciones, sustituciones y modificaciones de aminoácidos en uno o más sitios en o en los otros residuos de la cadena polipeptídica de IL-21 nativa. De acuerdo con la presente, cualquiera de tales inserciones, eliminaciones, sustituciones y modificaciones dan como resultado una muteína de IL-21 que retiene la actividad de unión de IL-21R. Los ejemplos de muteínas pueden incluir sustituciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos.

El ácido nucleico que codifica la IL-21 humana puede obtenerse mediante procedimientos convencionales tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La secuencia de aminoácidos de la IL-21 humana (Gene ID 59067) se encuentra en Genbank bajo el localizador de acceso NC_000004.12. La secuencia de aminoácidos de IL 21 murina (*Mus musculus*) (Gene ID 60505) se encuentra en Genbank bajo el localizador de acceso NC_000069.6.

IL-21 también puede hacer referencia a IL-21 derivada de una variedad de especies de mamíferos, que incluyen, por ejemplo, humanos, simios, bovinos, porcinos, equinos y murinos. Las variantes pueden comprender secuencias sustituidas de forma conservadora, lo que significa que un residuo de aminoácido dado se reemplaza por un residuo que tiene características fisicoquímicas similares. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un resto alifático por otro, como Ile, Val, Leu o Ala entre sí, o sustituciones de un resto polar por otro, como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Otras sustituciones conservadoras de este tipo, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobicidad similares, son bien conocidas. Las variantes de IL-21 de origen natural también están contempladas por la invención. Los ejemplos de tales variantes son proteínas que resultan de eventos de corte y empalme Alternativos de ARNm o de la escisión proteolítica de la proteína IL-21, en donde se retiene la propiedad de unión de IL-21. El corte y empalme alternativo del ARNm puede producir una proteína IL-21 truncada pero biológicamente activa. Las variaciones atribuibles a la proteólisis incluyen, por ejemplo, diferencias en los extremos N o C después de la expresión en diferentes tipos de células huésped, debido a la

eliminación proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de la proteína IL-21 (generalmente de 1 a 10 aminoácidos). En algunas formas de realización, el terminal de la proteína se puede modificar para alterar sus propiedades físicas, por ejemplo, con un grupo químico como el polietilenglicol (Yang, *et al. Cancer* 1995. 76:687-694). En algunas formas de realización, el terminal o interior de la proteína se puede modificar con aminoácidos adicionales (Clark-Lewis, *et al. PNAS* 1993. 90:3574-3577).

En formas de realización adicionales, los métodos definidos en la presente incluyen IL-21 por lo general a una concentración de por lo menos 0.1 ng/mL, como por lo menos 1,0 ng/mL (por ejemplo, entre 0.1 ng/mL y 1,000 ng/mL, entre 1,0 ng/mL y 100 ng/mL, entre 1,0 ng/mL y 50 ng/mL, entre 2 ng/mL y 50 ng/mL, entre 3 ng/mL y 10 ng/mL, entre 4 ng/mL y 8 ng/mL, entre 5 ng/mL y 10 ng/mL, entre 6 ng/mL y 8 ng/mL, por ejemplo, entre 0.1 ng/mL y 10 ng/mL, entre 1,0 ng/mL y 5 ng/mL, entre 1,0 ng/mL y 10 ng/mL, entre 1,0 ng/mL y 20 ng/mL). En formas de realización adicionales, los métodos definidos en la presente incluyen IL-21 por lo general a una concentración de menos de 100 ng/mL, como menos de 50 ng/mL. En algunas formas de realización, la concentración de IL-21 es de aproximadamente 6 ng/mL, como aproximadamente 6.25 ng/mL.

De acuerdo con la presente, "IL-2" hace referencia a IL-2 nativa o recombinante o una variante de la misma que actúa como agonista de una o más subunidades del receptor de IL-2 (IL-2R) (por ejemplo, mutantes, muteínas, análogos, subunidades, complejos de receptores, fragmentos, isoformas y peptidomiméticos de los mismos). Dichos agentes pueden apoyar la proliferación de una línea celular dependiente de IL-2, CTLL-2 (33; American Type Culture Collection (ATCC®) TIB 214). La IL-2 humana madura se presenta como una secuencia de 133 aminoácidos (menos el péptido señal, que consta de 20 aminoácidos N-terminales adicionales), conforme lo descrito en Fujita, *et al. Cell* 1986. 46.3:401-407. Una muteína de IL-2 es un polipéptido en el que se han realizado sustituciones específicas de la proteína interleucina-2 conservando la capacidad de unirse a IL-2R β , conforme lo descrito en US 2014/0046026. Las muteínas de IL-2 se pueden caracterizar por inserciones, deleciones, sustituciones y modificaciones de aminoácidos en uno o más sitios en o en los otros residuos de la cadena polipeptídica de IL-2 nativa. De acuerdo con la invención, cualquiera de tales inserciones, eliminaciones, sustituciones y modificaciones dan como resultado una muteína de IL-2 que retiene la actividad de unión a IL-2R β . Los ejemplos de muteínas pueden incluir sustituciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos.

El ácido nucleico que codifica la IL-2 humana puede obtenerse mediante procedimientos convencionales tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La secuencia de 238522

aminoácidos de la IL-2 humana (Gene ID 3558) se encuentra en Genbank bajo el localizador de acceso NP_000577.2 GI: 28178861. La secuencia de aminoácidos de la IL-2 murina (*Mus musculus*) (Gene ID 16183) se encuentra en Genbank bajo localizador de accesiones NP_032392.1 GI: 7110653.

5

IL-2 también puede hacer referencia a IL-2 derivada de una variedad de especies de mamíferos, que incluyen, por ejemplo, humanos, simios, bovinos, porcinos, equinos y murinos. Las variantes pueden comprender secuencias sustituidas de forma conservadora, lo que significa que un residuo de aminoácido dado se reemplaza por un residuo que tiene características fisicoquímicas similares.

10 Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un resto alifático por otro, como Ile, Val, Leu o Ala entre sí, o sustituciones de un resto polar por otro, como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Otras sustituciones conservadoras de este tipo, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobicidad similares, son bien conocidas. Las variantes de IL-2 de origen natural también están contempladas por la invención. Los ejemplos de
15 tales variantes son las proteínas que resultan de eventos de corte y empalme alternativos del ARNm o de la escisión proteolítica de la proteína IL-2, en donde se retiene la propiedad de unión a IL-2. El corte y empalme alternativo del ARNm puede producir una proteína IL-2 truncada pero biológicamente activa. Las variaciones atribuibles a la proteólisis incluyen, por ejemplo, diferencias en los extremos N o C después de la expresión en diferentes tipos de células huésped, debido a la
20 eliminación proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de la proteína IL-2 (generalmente de 1 a 10 aminoácidos). En algunas formas de realización, el terminal o interior de la proteína se puede modificar para alterar sus propiedades físicas, por ejemplo, con un grupo químico como el polietilenglicol (Yang, *et al. Cancer* 1995. 76: 687-694). En algunas formas de realización, el terminal o interior de la proteína se puede modificar con aminoácidos adicionales (Clark-Lewis, *et al. PNAS*
25 1993. 90:3574-3577).

En ciertas formas de realización, los métodos definidos en la presente incluyen IL-2 por lo general a una concentración de por lo menos 10 IU/mL, como por lo menos 100 IU/mL (por ejemplo, entre 10 IU/mL y 1,000 IU/mL, entre 20 IU/mL y 800 IU/mL, entre 25 IU/mL y 750 IU/mL, entre 30 IU/mL y
30 700 IU/mL, entre 40 IU/mL y 600 IU/mL, entre 50 IU/mL y 500 IU/mL, entre 75 IU/mL y 250 IU/mL, o entre 100 IU/mL y 200 IU/mL, por ejemplo, entre 10 IU/mL y 20 IU/mL, entre 20 IU/mL y 30 IU/mL, entre 30 IU/mL y 40 IU/mL, entre 40 IU/mL y 50 IU/mL, entre 50 IU/mL y 75 IU/mL, entre 75 IU/mL y 100 IU/mL, entre 100 IU/mL y 150 IU/mL, entre 150 IU/mL y 200 IU/mL, entre 200 IU/mL y 500 IU/mL, o entre 500 IU/mL y 1,000 IU/mL). En ciertas formas de realización, los métodos definidos en la
35 presente incluyen IL-2 por lo general a una concentración de menos de 1,000 IU/mL, como menos

de 500 IU/mL. En algunas formas de realización, la concentración de IL-2 es de aproximadamente 100 IU/mL.

De acuerdo con la presente, "IL-4" hace referencia a IL-4 nativa o recombinante o una variante de la misma que actúa como agonista de una o más subunidades del receptor de IL-4 (IL-4R) (por ejemplo, 5 mutantes, muteínas, análogos, subunidades, complejos de receptores, fragmentos, isoformas y peptidomiméticos de los mismos). Tales agentes pueden apoyar la diferenciación de células T auxiliares ingenuas (células Th0) en células Th2. La IL-4 humana madura se presenta como una secuencia de 129 aminoácidos (menos el péptido señal, que consta de 24 aminoácidos N-terminales 10 adicionales). Una muteína de IL-4 es un polipéptido en el que se han realizado sustituciones específicas a la proteína interleucina-4 conservando la capacidad de unirse a IL-4R α , conforme lo descrito en la Patente Estadounidense Nro. 6.313.272. Las muteínas de IL-4 se pueden caracterizar por inserciones, deleciones, sustituciones y modificaciones de aminoácidos en uno o más sitios en o en los otros residuos de la cadena polipeptídica de la IL-4 nativa. De acuerdo con la 15 presente cualquiera de tales inserciones, eliminaciones, sustituciones y modificaciones dan como resultado una muteína de IL-4 que retiene la actividad de unión de IL-2R α . Los ejemplos de muteínas pueden incluir sustituciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos.

El ácido nucleico que codifica la IL-4 humana puede obtenerse mediante procedimientos 20 convencionales tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La secuencia de aminoácidos de la IL-4 humana (Gene ID 3565) se encuentra en Genbank bajo el localizador de acceso NG_023252. La secuencia de aminoácidos de IL-4 murina (*Mus musculus*) (Gene ID 16189) se encuentra en Genbank bajo el localizador de acceso NC_000077.6.

25 IL-4 también puede hacer referencia a IL-4 derivada de una variedad de especies de mamíferos, que incluyen, por ejemplo, humanos, simios, bovinos, porcinos, equinos y murinos. Las variantes pueden comprender secuencias sustituidas de forma conservadora, lo que significa que un residuo de aminoácido dado se reemplaza por un residuo que tiene características fisicoquímicas similares. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un resto alifático por otro, 30 como Ile, Val, Leu o Ala entre sí, o sustituciones de un resto polar por otro, como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Otras sustituciones conservadoras de este tipo, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobicidad similares, son bien conocidas. Las variantes de IL 4 de origen natural también están contempladas por la invención. Los ejemplos de tales variantes son las proteínas que resultan de eventos de corte y empalme alternativos del ARNm 35 o de la escisión proteolítica de la proteína IL-4, en donde se retiene la propiedad de unión a IL-4. El

238522

corte y empalme alternativo del ARNm puede producir una proteína IL-4 truncada pero biológicamente activa. Las variaciones atribuibles a la proteólisis incluyen, por ejemplo, diferencias en los extremos N o C después de la expresión en diferentes tipos de células huésped, debido a la eliminación proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de la proteína IL-4 (generalmente de 1 a 10 aminoácidos). En algunas formas de realización, el terminal de la proteína se puede modificar para alterar sus propiedades físicas, por ejemplo, con un grupo químico como el polietilenglicol (Yang, *et al. Cancer* 1995. 76:687-694). En algunas formas de realización, el término o interior de la proteína se puede modificar con aminoácidos adicionales (Clark-Lewis, *et al. PNAS* 1993. 90:3574-3577).

En formas de realización adicionales, los métodos definidos en la presente incluyen IL-4 por lo general a una concentración de por lo menos 0.1 ng/mL, como por lo menos 10 ng/mL (por ejemplo, entre 0.1 ng/mL y 1,000 ng/mL, entre 1,0 ng/mL y 100 ng/mL, entre 1,0 ng/mL y 50 ng/mL, entre 2 ng/mL y 50 ng/mL, entre 3 ng/mL y 40 ng/mL, entre 4 ng/mL y 30 ng/mL, entre 5 ng/mL y 20 ng/mL, entre 10 ng/mL y 20 ng/mL, por ejemplo, entre 0.1 ng/mL y 50 ng/mL, entre 1,0 ng/mL y 25 ng/mL, entre 5 ng/mL y 25 ng/mL). En formas de realización adicionales, los métodos definidos en la presente incluyen IL-4 por lo general a una concentración de menos de 100 ng/mL, como menos de 50 ng/mL, in particular menos de 20 ng/mL. En algunas formas de realización, la concentración de IL-4 es de aproximadamente 15 ng/mL.

Las células T y/o aquí descritas pueden también manipularse genéticamente para mejorar las propiedades terapéuticas, como para la terapia CAR-T. Esto implica la generación de receptores de células modificados, tales como los receptores de antígeno quimérico (CAR, según las siglas en inglés) o los receptores de células T modificados (TCR, según las siglas en inglés) para reprogramar la célula T con una nueva especificidad, por ejemplo, la especificidad de un anticuerpo monoclonal. El CAR o el TCR modificado pueden hacer que las células T resulten específicas para células malignas y, por lo tanto, sean útiles para la inmunoterapia contra el cáncer. Por ejemplo, las células T pueden reconocer las células cancerosas que expresan un antígeno tumoral, como un antígeno tumoral específico que no es expresado por células somáticas normales del tejido del sujeto, un antígeno asociado a tumor que se sobreexpresa preferentemente en las células cancerosas en comparación con células somáticas sanas o antígenos expresados en el contexto de eventos de estrés tales como estrés oxidativo, daño en el ADN, radiación UV, estimulación del receptor EGF; u otros medios para identificar células cancerosas frente a no cancerosas. Así, las células T modificadas con CAR pueden usarse para la terapia de células T adoptivas de, por ejemplo, pacientes con cáncer.

En consecuencia, en una forma de realización, los métodos descritos en la presente comprenden la transducción de la composición de células T $\gamma\delta$ para expresar un receptor de superficie de interés, como un receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconoce un antígeno tumoral. En la presente invención es posible usar cualquier CAR, incluidos los CAR dirigidos a CD19 u otros antígenos asociados a tumores conocidos.

Se ha descrito el uso de células T $\gamma\delta$ residentes en sangre para la terapia CAR-T. Sin embargo, es probable que las células T $\gamma\delta$ no hematopoyéticas obtenidas por el método de la invención sean vehículos particularmente buenos para los abordajes de la CAR-T, ya que pueden transducirse con receptores específicos de antígeno quimérico mientras conservan sus capacidades innatas de reconocer células transformadas y es probable que presenten mejores capacidades de penetración y retención tumoral que las células T $\gamma\delta$ residentes en sangre o las células T $\alpha\beta$ sistémicas convencionales. Además, su falta de presentación del antígeno dependiente del MHC reduce el potencial de la enfermedad de injerto contra huésped y les permite tener como objetivo a tumores que expresan bajos niveles de MHC. Asimismo, su no dependencia de la coestimulación convencional, por ejemplo a través de la participación de CD28, mejora la selección de tumores que expresan bajos niveles de ligandos para receptores coestimuladores.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para modificar células T $\gamma\delta$, dicho método comprende los pasos de:

(i) preparación de una composición enriquecida para células T $\gamma\delta$;

(ii) transducción de la composición para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconoce un antígeno tumoral; y

(iii) cultivo de la composición transducida para expandir las células T $\gamma\delta$ modificadas, en donde los pasos (ii) y (iii) pueden ejecutarse en cualquier orden o al mismo tiempo.

En una forma de realización, el paso (ii) se ejecuta antes del paso (iii). Así, de acuerdo con esta forma de realización la transducción de la composición se ejecuta en ausencia de las células alimentadoras que pueden estar presentes en el cultivo. En consecuencia, la cantidad de material utilizado para la transducción puede reducirse debido a que solo se transducen las células T $\gamma\delta$. En una forma de realización alternativa, el paso (ii) se ejecuta al mismo tiempo que el paso (iii). De acuerdo con esta forma de realización, la transducción de la composición se realiza en presencia de las células alimentadoras en el cultivo. En consecuencia, si bien es posible que sea necesario aumentar la cantidad de material de transducción en comparación cuando el paso (ii) se ejecuta

antes del paso (iii), se advertirá que puede reducirse la manipulación, lo que lleva a un método general más simple y reduce las pérdidas que pueden estar asociadas con la misma.

Así, en algunas formas de realización el paso (iii) comprende el cultivo de la composición transducida en presencia de células alimentadoras. En formas de realización adicionales, el método de acuerdo con este aspecto comprende cualquiera de los pasos antes descriptos.

Sorprendentemente se ha descubierto que la composición enriquecida para las células T $\gamma\delta$, en particular para las células T $\gamma\delta$ derivadas de tejido no hematopoyético, no requiere de la estimulación del TCR (receptor de células T), a diferencia de los métodos de transducción de células T previamente conocidos, incluida la transducción de células T $\gamma\delta$ que requiere la estimulación del TCR mediante, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 como el OKT- 3, o un anticuerpo anti- $\gamma\delta$ TCR, como el anticuerpo anti-V δ 1. En consecuencia, los métodos aquí descriptos comprenden la transducción de la composición de células T $\gamma\delta$ en ausencia de la estimulación del TCR.

En ciertas formas de realización, la composición se transduce usando un vector viral. Dichos vectores virales son conocidos en la técnica y el experto en la materia podrá reconocer el vector viral apropiado que se utilizará de acuerdo con las células que se transducirán. En una forma de realización, el vector viral es un vector lentiviral o un vector retroviral, como un vector gammaretroviral. En otra forma de realización, el vector viral es un vector gammaretroviral, como el virus de células madre murinas (MSCV) o el virus de la leucemia murina de Moloney (MLV). En aún otra forma de realización, al vector viral se le da un pseudotipo con una envoltura distinta del virus de la estomatitis vesicular-G (VSV-G), por ejemplo una envoltura betaretroviral como el virus endógeno del babuino (BaEV) o RD114.

En algunas formas de realización, el paso (ii) se ejecuta usando entre 1×10^6 y 1×10^8 TU/ml, como aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 5×10^7 o aproximadamente 1×10^8 TU/ml de vector viral. En una forma de realización específica, el paso (ii) se ejecuta usando 1×10^7 TU/ml de vector viral. En otras formas de realización, el paso (ii) se ejecuta usando un MOI de vector viral entre 0,5 y 50, como un MOI de aproximadamente 0,5, aproximadamente 1, aproximadamente 1,5, aproximadamente 2,5, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 25, aproximadamente 40 o aproximadamente 50. En una forma de realización, el paso (ii) se ejecuta usando un MOI de vector viral de 2,5. En otra forma de realización, el paso (ii) se ejecuta usando un MOI de vector viral de 5. En una forma de realización adicional, el paso (ii) se ejecuta usando un MOI de vector viral de 10.

En una forma de realización, el antígeno asociado al tumor es un antígeno asociado a un tumor sólido. Así, en algunas formas de realización el tumor y/o cáncer es un tumor sólido. La expresión constitutiva de CD70, un miembro de la familia de la necrosis tumoral, se ha descrito tanto en cánceres hematológicos como sólidos, donde aumenta la supervivencia de las células tumorales y las células T reguladoras dentro del microambiente tumoral mediante la señalización a través de su receptor, CD27. Así, en una forma de realización adicional el tumor sólido es un tumor CD70+. Se advertirá que CD70 puede usarse para dirigir las células T $\gamma\delta$ modificadas a dichos tumores. En consecuencia, en aún otra forma de realización, el antígeno asociado al tumor es CD70.

En una forma de realización alternativa, el antígeno asociado al tumor es la mesotelina. La mesotelina es una proteína de 40 kDa que se expresa en las células mesoteliales y se sobreexpresa en varios tumores, incluidos el mesotelioma, el cáncer de ovario, el adenocarcinoma de páncreas, el adenocarcinoma de pulmón y el colangiocarcinoma. Por lo tanto, se ha propuesto como un marcador tumoral o antígeno asociado a un tumor que puede ser un objetivo en la inmunoterapia (Hassan *et al. Clin. Cancer Res.*, 2004, 10(12):3937-3942). La expresión de mesotelina en estos tumores puede contribuir a la implantación y diseminación peritoneal de los tumores por adhesión celular (Rump *et al., Biological Chemistry*, 2004, 279(10):9190-9198).

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una población de células T $\gamma\delta$ expandidas obtenida mediante los métodos descritos en la presente. De acuerdo con un aspecto adicional, se proporciona una población de células T $\gamma\delta$ modificadas obtenida mediante los métodos descritos en la presente.

En algunas formas de realización, población de células T $\gamma\delta$ expandidas/modificadas comprende más de 50% células T $\gamma\delta$, como más de 75% células T $\gamma\delta$, en particular más de 85% células T $\gamma\delta$. En una forma de realización, la población expandida/modificada comprende células V δ 1, en donde menos de 50%, como menos de 25% de las células V δ 1 que expresan TIGIT. En una forma de realización, la población expandida/modificada comprende células V δ 1, en donde más del 50%, como más del 60% de las células V δ 1 expresan CD27.

La población de células T $\gamma\delta$ expandidas/modificadas obtenida mediante los métodos descritos en la presente puede usarse como un medicamento, por ejemplo para la terapia de células T adoptivas. Esto implica la transferencia de una población expandida/modificada obtenida a través de los métodos a un paciente. La terapia puede ser autóloga, es decir, las células T $\gamma\delta$ pueden volver a

transferirse al mismo paciente del que se obtuvieron, o la terapia puede ser alogénica, es decir, las células T $\gamma\delta$ de una persona pueden transferirse a un paciente diferente. En casos que impliquen transferencia alogénica, la población expandida/modificada puede estar sustancialmente libre de células T $\alpha\beta$. Por ejemplo, las células T $\alpha\beta$ pueden ser vaciadas de la población expandida/modificada, por ejemplo, luego de la manipulación, usando cualquier medio adecuado conocido en la técnica (por ejemplo, por selección negativa, por ejemplo, usando perlas magnéticas). Un método de tratamiento puede incluir: proporcionar una muestra de tejido no hematopoyético obtenido de un donante individual; expandir y/o modificar las células T $\gamma\delta$ de acuerdo con la presente para producir una población expandida/modificada; y administrar la población expandida/modificada de células T $\gamma\delta$ a un individuo receptor.

El paciente o sujeto a tratar es preferentemente un paciente humano que padece cáncer (por ejemplo, un paciente humano con cáncer que está siendo tratado por un tumor sólido) o un paciente infectado por un virus (por ejemplo, un paciente infectado por CMV o VIH). En algunos casos, el paciente ha sido y/o está siendo tratado por un tumor sólido. Debido a que normalmente residen en tejidos no hematopoyéticos, las células T V δ 1 residentes en los tejidos también tienen más probabilidades de alojarse y ser retenidas dentro de masas tumorales que sus contrapartes sistémicas residentes en sangre y es probable que la transferencia de estas células adoptivas sea más efectiva para atacar tumores sólidos y potencialmente otras inmunopatologías asociadas al tejido no hematopoyético.

Como las células T $\gamma\delta$ no están restringidas por el MHC, no reconocen al huésped al que se transfieren como extraño, lo que significa que es menos probable que causen la enfermedad de injerto contra huésped. Esto significa que se pueden usar "directamente" y transferirse a cualquier receptor, por ejemplo, para la terapia de células T adoptivas alogénicas.

Las células T $\gamma\delta$ obtenidas por los métodos descritos en la presente expresan NKG2D y responden a un ligando de NKG2D (por ejemplo, MICA), que está fuertemente asociado con la malignidad. También expresan un perfil citotóxico en ausencia de cualquier activación y, por lo tanto, es probable que sean efectivas para destruir células tumorales. Por ejemplo, las células T $\gamma\delta$ expandidas/modificadas obtenidas de acuerdo con la presente pueden expresar uno o más, preferiblemente todos, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, CCL4, IL-13, Granulicina, Granzima A y B, y Perforina en ausencia de cualquier activación. Es posible que no se exprese IL-17A.

En consecuencia, los hallazgos informados en la presente proporcionan evidencia convincente de

la practicidad y la idoneidad de la aplicación clínica de las células T $\gamma\delta$ expandidas/modificadas obtenidas a través de los métodos de la invención como un reactivo inmunoterapéutico "listo para usar". Estas células presentan una capacidad de eliminación similar a la innata, no tienen restricción del MHC y muestran un mejor alojamiento y/o retención dentro de los tumores que otras células T.

5

En algunas formas de realización, un método de tratamiento de un individuo con un tumor sólido en un tejido no hematopoyético puede incluir: expandir/modificar células T $\gamma\delta$ a partir de una muestra del individuo de acuerdo con la presente para producir una población expandida/modificada; y administrar la población expandida/modificada de células T $\gamma\delta$ al individuo. En formas de realización

10 alternativas, el método de tratamiento comprende expandir/modificar células T $\gamma\delta$ a partir de una muestra de un individuo distinto de acuerdo con la presente para producir una población expandida/modificada; y administrar la población expandida/modificada de células T $\gamma\delta$ al individuo con un tumor sólido. En una forma de realización, la cantidad de células T $\gamma\delta$ expandidas/modificadas administradas al individuo es una cantidad terapéuticamente efectiva.

15

En formas de realización adicionales, el método de tratamiento y/o la cantidad terapéuticamente efectiva comprende lo divulgado en WO2020095058, que se incorpora por completo a la presente.

20

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir células T $\gamma\delta$ expandidas/modificadas de acuerdo con la presente en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Tales composiciones pueden incluir tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo,

25 hidróxido de aluminio); y conservantes. Las soluciones de crioconservación que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, por ejemplo, DMSO. Las composiciones se pueden formular, por ejemplo, para administración intravenosa.

25

Así, de acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que

30 comprende la población de células T $\gamma\delta$ expandidas o la población de células T $\gamma\delta$ modificadas de acuerdo con la presente.

En una forma de realización, la composición farmacéutica está sustancialmente libre de (por ejemplo, no hay) niveles detectables de un contaminante, por ejemplo, endotoxina o micoplasma.

35

De acuerdo con otro aspecto adicional de la invención, se proporciona la población de células T $\gamma\delta$ expandidas, la población de células T $\gamma\delta$ modificadas o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente para usar como un medicamento. En otro aspecto, se proporciona la población de células T $\gamma\delta$ expandidas, la población de células T $\gamma\delta$ modificadas o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente para usar en el tratamiento del cáncer.

Se entenderá que todas las formas de realización descritas pueden aplicarse a todos los aspectos de la invención.

De acuerdo con la presente, el término "aproximadamente" incluye hasta un 10 % más y hasta un 10 % menos que el valor especificado, convenientemente hasta un 5 % más y hasta un 5 % menos que el valor especificado, especialmente el valor especificado. El término "entre" incluye los valores de los límites especificados.

Ciertos aspectos y formas de realización de la invención se ilustrarán a continuación por medio de los siguientes ejemplos y con referencia a las figuras antes descritas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Expansión de células $\gamma\delta$ derivadas de piel utilizando células alimentadoras

Las células residentes en la piel se aislaron conforme a lo descrito previamente en WO2020095058 y WO2020095059. Los linfocitos residentes en la piel se descongelaron e inmediatamente se procesaron para eliminar las células alimentadoras de células T $\alpha\beta$ con el fin de producir cultivos enriquecidos para células T $\gamma\delta$. Los cultivos vaciados de $\alpha\beta$ luego fueron expandidos en presencia de una población de células alimentadoras irradiadas. En este experimento se probaron células alimentadoras irradiadas de diversos orígenes; linfocitos alogénicos de sangre periférica (PBL), células mononucleares de sangre periférica alogénica (PBMC), PBMC alogénicas activadas anti-CD3 CD28 (PBMCs Act) o cultivos alogénicos de aislamiento de piel. Luego, los cocultivos se incubaron durante 7 días antes de la recolección y el análisis de flujo para los marcadores de linaje y la expresión nuclear de Ki67. Se midió el nivel de expresión de Ki67 intranuclear dentro de las células T $\gamma\delta$, así como el número total de células T V δ 1 $\gamma\delta$ por pocillo. Tanto la expresión de Ki67 intracelular de las células T $\gamma\delta$ como el número total de células T V δ 1 $\gamma\delta$ fue mayor en los cultivos estimulados con células de aislamiento de piel irradiadas como células alimentadoras, lo que indica proliferación de las células T $\gamma\delta$. Estos resultados demuestran la superioridad de los linfocitos residentes en la piel sobre los leucocitos de la sangre como un componente de las células alimentadoras para impulsar la proliferación de células T $\gamma\delta$ derivadas de la piel (**Figuras 1A-B**)

En experimentos separados, los linfocitos residentes en la piel se descongelaron y se procesaron inmediatamente a través de 2 estrategias de selección diferentes para producir cultivos enriquecidos con células T $\gamma\delta$ y empobrecidos de células T $\alpha\beta$. El enriquecimiento de células T $\gamma\delta$ se llevó a cabo mediante la selección positiva de las células T $\gamma\delta$ (**Figuras 2A-B**) o a través del enriquecimiento de la selección negativa de células T $\gamma\delta$ mediante la selección positiva de la fracción de células T $\alpha\beta$ (**Figuras 3A-B**). Luego estos cultivos fueron expandidos ya sea sin la presencia de células T $\alpha\beta$ como células alimentadoras, o como una población inicial establecida expresada en % de población de células T no $\alpha\beta$ en relación con las células alimentadoras de células T $\alpha\beta$ autólogas (1%, 5%, 10%, 20% o 40% de contenido de células no $\alpha\beta$ en el Día 0 estando el resto del cultivo formado por células alimentadoras autólogas). Para las células T $\gamma\delta$ seleccionadas positivamente, la fracción negativa que contenía predominantemente células T $\alpha\beta$ de la piel sirvió como capa de células alimentadoras. En estos experimentos, no se irradiaron las capas de células alimentadoras no fueron irradiadas. Para las células T $\gamma\delta$ seleccionadas negativamente, las células T $\alpha\beta$ seleccionadas positivamente sirvieron como capa de células alimentadoras. Posteriormente, se expandieron los cultivos durante 14 días en presencia de citoquinas de crecimiento IL-15 e IL-21. Tras la cosecha, en el Día 14, se registró el porcentaje de células T $\gamma\delta$ de la fracción de linfocitos CD45, así como el aumento global multiplicado en el crecimiento de las células T $\gamma\delta$ del Día 0 al Día 14. Los resultados muestran claramente un aumento del crecimiento multiplicado de células T $\gamma\delta$ durante el periodo de expansión cuando las células alimentadoras están presentes en el cultivo. Las expansiones de 21 días fueron superiores a las de 14 días en términos de crecimiento global multiplicado de células $\gamma\delta$ T en todos los casos. Tanto las estrategias de enriquecimiento de células T $\gamma\delta$ negativas como positivas en el Día 0 dieron lugar a expansiones exitosas tanto en cultivos con o sin células alimentadoras.

Ejemplo 2: Transducción de células $\gamma\delta$ derivadas de la piel utilizando CAR CD19

Los linfocitos residentes en la piel se descongelaron y se cultivaron durante 7 días en presencia de IL-15 e IL-21. En el día 7, se cosecharon todas las células y se transdujeron con un vector que codificaba una construcción CAR específica para CD19. A continuación, se expandieron las células durante otros 7 días en presencia de IL-15 e IL-21 antes de ser cosechadas y criopreservadas. La intervención de transducción no afectó a la expansión de las células T $\gamma\delta$ residentes en la piel (datos no indicados). Para los ensayos funcionales, las células criopreservadas se descongelaron y las células T $\alpha\beta$ se clasificaron mediante el procesamiento MACS de selección positiva, produciendo células T $\alpha\beta$ residentes en la piel seleccionadas positivamente y células T $\gamma\delta$ residentes en la piel seleccionadas negativamente. Las poblaciones de células T $\gamma\delta$ o de células T $\alpha\beta$ se co-cultivaron junto con la línea celular tumoral hematológica NALM6 en una variedad de proporciones célula

efectora - célula diana. A continuación, se incubaron los co-cultivos durante 18 horas y se detectó la lisis de las células diana mediante tinción SYTOX™ (Thermofisher) por citometría de flujo. Las células T $\gamma\delta$ transducidas residentes en la piel mostraron una alta funcionalidad frente a la línea celular NALM6. Este nivel de funcionalidad fue comparable al de las células T $\alpha\beta$ de a piel transducidas con CAR compatibles con el donante. (**Figura 4**)

En experimentos separados, los linfocitos residentes en la piel se descongelaron y se procesaron inmediatamente para deplecionar las células T $\alpha\beta$ mediante la selección positiva de células T $\alpha\beta$ a través de MACS. Estas poblaciones vaciadas o empobrecidas de células T $\alpha\beta$ y enriquecidas con células T $\gamma\delta$ se cultivaron durante 2 días en presencia de IL-15 e IL-21 antes de ser genéticamente modificadas. Después de 2 días, se cosecharon los cultivos y se transdujeron con un vector que codificaba un constructo CAR específico para CD19. Para 2 de los 4 donantes, se establecieron cultivos de transducción simulada en los que las células se sometieron al mismo protocolo de transducción pero sin la presencia del vector. Después de la transducción, las células se expandieron durante otros 12 días, tras los cuales se cosecharon, se les dio un fenotipo mediante citometría de flujo para determinar el linaje y la expresión de CAR específicos de CD19, y se criopreservaron. Los resultados indican que las células T $\gamma\delta$ transducidas expresan el constructo CAR específico para CD19, mientras que los controles transducidos de forma simulada (en su caso) no lo hacían (**Figura 5A**). Además, una vez que las células criopreservadas fueron descongeladas y cultivadas durante otros 7 días en IL-15 e IL-21, el porcentaje de células T $\gamma\delta$ CAR+ se mantuvo estable (**Figura 5B**). Las células criopreservadas también se utilizaron en ensayos de funcionalidad. Las células fueron descongeladas y cocultivadas junto a la línea celular tumoral hematológica NALM6 en una variedad de proporciones célula efectora: célula diana durante 18 horas. Los resultados indican que en los 2 donantes analizados, las células T $\gamma\delta$ transducidas con CAR presentaron un mejor rendimiento citotóxico frente a NAML6 en comparación con los controles no transducidos compatibles (**Figura 6**).

Ejemplo 3: Transducción y expansión de células $\gamma\delta$ derivadas de la piel usando mesotelina-CAR

Los linfocitos residentes en la piel se descongelaron e inmediatamente se procesaron para deplecionar las células T $\alpha\beta$ mediante la selección positiva de células T $\alpha\beta$ a través de MACS. Estas poblaciones empobrecidas en células T $\alpha\beta$ y enriquecidas con células T $\gamma\delta$ se cultivaron durante 2 días en presencia de IL-15 e IL-21 antes de ser genéticamente modificadas. El día 2, se cosecharon las células del cultivo y se transdujeron con el vector de pseudotipo de retrovirus- γ RD-114 que codifica un constructo CAR específico de mesotelina. Como control, se establecieron cultivos de

transducción simulados en los que las células se sometieron al mismo protocolo de transducción pero sin la presencia del vector. Posteriormente, las células se expandieron durante otros 12 días, después de lo cual se procedió a la cosecha, se les dio un fenotipo mediante citometría de flujo para determinar el linaje y la expresión de CAR, y luego se crioconservaron. Las células transducidas expresaron el constructo CAR mientras que los controles transducidos simulados no lo hicieron. (**Figura 7**). Tras la descongelación, tanto las células simuladas como las transducidas con CAR exhibieron una alta viabilidad (medida mediante el recuento de células viables NC250) (**Figura 8A**).

A continuación, las células transducidas y transducidas de forma simulada se descongelaron y se analizaron inmediatamente para determinar la citotoxicidad frente a líneas celulares de tumor sólido (adenocarcinoma) que expresan mesotelina (Hela y SCOV-3). Además de las células T $\gamma\delta$ transducidas, también se analizó la citotoxicidad de las células T $\alpha\beta$ derivadas de PBMC no compatibles con el donante transducidas con el mismo aglutinante y expandidas en IL-2 frente a las mismas líneas celulares diana de tumor sólido. Las células se cultivaron en la proporción células efectoras: células diana de 5:1, 2,5:1, 1,25:1, 0,625:1, 0,312:1 y 0,156:1. Los cocultivos de citotoxicidad se incubaron durante 18 horas antes del análisis final. La citotoxicidad de las células diana en tumores sólidos se determinó mediante la enumeración de células diana viables utilizando el sistema de ensayo CellTiter GLO® (Promega). Las células T $\gamma\delta$ transducidas con CAR exhibieron una eliminación mejorada de las líneas celulares HeLa y SCOV-3 en comparación con los controles transducidos simulados (**Figuras 8 B-C**). Dado que las células T $\gamma\delta$ no transducidas tienen alguna actividad contra las líneas de células tumorales, muestran una citotoxicidad similar frente a las líneas de células tumorales que las células T $\alpha\beta$ transducidas con CAR. Sin embargo, las células T $\gamma\delta$ transducidas con CAR muestran un aumento de la citotoxicidad en comparación con las células T $\gamma\delta$ no transducidas y las células T $\alpha\beta$ transducidas con CAR.

Ejemplo 4: Las células residentes en la piel se aislaron y congelaron como se describe en el Ejemplo 1. Tras la descongelación, las células T $\gamma\delta$ se enriquecieron a través de la selección negativa vía la clasificación celular activada magnéticamente (MACS, según las siglas en inglés) y posteriormente se co-cultivaron con una variedad de diferentes poblaciones autólogas de células T $\alpha\beta$ seleccionadas positivamente, y se midió el efecto del co-cultivo con células T $\alpha\beta$ sobre la tasa de expansión de las células T $\gamma\delta$ en los días 14 y 21 de cultivo. En primer lugar, se enriquecieron las células T $\gamma\delta$ a partir de células aisladas congeladas mediante la depleción de las células T $\alpha\beta$ vía la clasificación MACS. Esto dio lugar a poblaciones de células $\gamma\delta$ y TCR negativas sin tocar (es decir, sin etiquetar con ningún anticuerpo marcado magnéticamente). Estas poblaciones enriquecidas de células T $\gamma\delta$ se co-cultivaron después con células T $\alpha\beta$ CD4 autólogas ("CD4 Feeder"), células T $\alpha\beta$

- CD8 ("CD8 Feeder") o con células T $\alpha\beta$ CD4 y CD8 (" $\alpha\beta$ Feeder"). Todas las capas de células alimentadoras se purificaron a partir de las células residentes en piel mediante la selección MACS de etiquetado positivo. En todos los co-cultivos, las células se configuraron en una proporción de 10% de población enriquecida de células T $\gamma\delta$ y el 90% restante del cultivo formado por la capa de células alimentadoras autólogas, con cultivos realizados en medios TexMACS suplementados con un 5% de plasma alogénico y 80ng/ml de IL-15 y 11,25ng/ml de IL-21. Los cultivos se expandieron durante 14 o 21 días y la expansión de las células T $\gamma\delta$ en cada configuración de cultivo se registró en cada punto de tiempo. Los cultivos se sometieron a un régimen de alimentación de 48 horas, con eliminación del 50% de los medios y la reposición del 50% de los medios suplementado con citoquinas suficientes para devolver el cultivo a la concentración inicial de citoquinas. No se añadieron más células alimentadoras a los cultivos después de la configuración del Día 0. Se establecieron poblaciones de control de cultivos enriquecidos con células T $\gamma\delta$ expandidas sin el agregado de ninguna célula alimentadora $\alpha\beta$ ("solamente $\gamma\delta$ ").
- La expansión multiplicada de células T $\gamma\delta$ se potenció cuando se co-cultivó con alguno de los cultivos de células alimentadoras de células T $\alpha\beta$ sometidos a prueba. La utilización de células T $\alpha\beta$ CD4 enriquecidas provocó el mayor aumento de la expansión multiplicada $\gamma\delta$ durante los 14 y 21 días de cultivo. Los resultados indican que las células T $\alpha\beta$ sirven como una capa de células alimentadoras eficaz para promover la expansión de las células T $\gamma\delta$, siendo las células T $\alpha\beta$ CD4 superiores a las células T $\alpha\beta$ CD8 para impulsar la expansión (**Figura 9**).