

REIVINDICACIONES

1. 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 2. 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 3:2 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$).
- 15 3. 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
- 20 alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 3:2 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$).
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 4:1 (células alimentadoras : células
- 25 T $\gamma\delta$).
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células alimentadoras están presentes en una relación de por lo menos 10:1 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$).
- 30 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las células alimentadoras están presentes en una relación de aproximadamente entre 10:1 y aproximadamente 99:1 (células alimentadoras : células T $\gamma\delta$).
- 35 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las células
- 238522

alimentadoras comprenden células T $\alpha\beta$.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde las células T $\alpha\beta$ comprenden células T CD4.

5

9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde las células alimentadoras además comprenden células asesinas naturales (NK).

10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde las células alimentadoras son irradiadas.

10

11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde las células alimentadoras se derivan de tejido no hematopoyético.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde las células alimentadoras derivan de la piel.

15

13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde las células alimentadoras derivan de un solo donante.

20

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde las células alimentadoras derivan de múltiples donantes.

15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde las células T $\gamma\delta$ derivan de un solo donante.

25

16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde las células T $\gamma\delta$ derivan de múltiples donantes.

17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde las células alimentadoras y las células T $\gamma\delta$ derivan del o de los mismos donantes.

30

18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde las células alimentadoras y las células T $\gamma\delta$ derivan de diferentes donantes.

35

19. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde el método comprende retirar las células alimentadoras de las células T $\gamma\delta$ expandidas mediante la depleción de células T $\alpha\beta$.

5 20. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde el método comprende retirar las células alimentadoras de las células T $\gamma\delta$ expandidas mediante la selección positiva de células T $\gamma\delta$.

21. Un método para modificar células T $\gamma\delta$, dicho método comprende los pasos de:

- 10 (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 del TCR; 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.

15 22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el paso (ii) se ejecuta antes del paso (iii).

20 23. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el paso (ii) se ejecuta al mismo tiempo que el paso (iii).

24. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en donde la composición se transduce usando un vector viral, como un vector retroviral, un vector gammaretroviral o un vector lentiviral.

25 25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en donde 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).

30 26. El método de acuerdo con la reivindicación 24 o la reivindicación 25, en donde 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.

35 27. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en donde el paso (ii) se ejecuta usando 1×10^7 TU/ml de vector viral.

28. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 27, en donde el antígeno tumoral es un antígeno tumoral específico que no es expresado por las células somáticas normales del tejido del sujeto.

5

29. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 27, en donde el antígeno tumoral es un antígeno asociado al tumor que se sobreexpresa preferentemente en las células cancerosas en comparación con las células somáticas sanas.

10 30. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 27, en donde el antígeno tumoral es un antígeno expresado en el contexto de eventos de estrés tales como estrés oxidativo, daño en el ADN, radiación UV, estimulación del receptor EGF.

15 31. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 30, en donde el antígeno tumoral es un antígeno asociado a un tumor sólido.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el tumor sólido es un tumor mesotelina⁺.

20 33. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 32, en donde el antígeno asociado al tumor es mesotelina.

25 34. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 33, en donde el paso (iii) comprende el cultivo de la composición transducida en ausencia de células alimentadoras.

35. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 33, en donde el paso (iii) comprende el cultivo de la composición transducida en presencia de células alimentadoras.

30 36. El método de acuerdo con la reivindicación 32 que comprende los pasos de un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

37. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, en donde el paso (i) comprende la depleción de células T $\alpha\beta$ a partir de una población de células mixta obtenida de una muestra inicial.

35

38. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, en donde 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.

5 39. El método de acuerdo con la reivindicación 37 o la reivindicación 38, en donde la muestra inicial es un tejido humano.

40. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, en donde la muestra inicial es tejido no hematopoyético.

10

41. El método de acuerdo con la reivindicación 40, en donde la muestra inicial es piel.

42. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 41, en donde la composición se cultiva en medios que comprenden IL-15 o IL-21.

15

43 El método de acuerdo con la reivindicación 42, en donde los medios comprenden IL-15 e IL-21.

20

44. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 42 o 43, en donde los medios además comprenden IL-2 y/o IL-4

45. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44, en donde el método comprende cultivar la composición durante entre 7 y 21 días.

25 46. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 45, en donde el método comprende cultivar la composición durante aproximadamente 10, 11, 12, 13, o 14 días.

30 47. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42, en donde la expansión de la población de células T $\gamma\delta$ proporciona por lo menos un número de células T $\gamma\delta$ multiplicado 5 veces, por lo menos especialmente 10 veces, por lo menos en particular 20 veces, como por lo menos 50 veces, por ejemplo por lo menos 100 veces.

35 48. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 47, en donde el método comprende congelar las células T $\gamma\delta$ expandidas.

49. Una población de células T $\gamma\delta$ expandidas que puede obtenerse, tal como se ha obtenido, mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o 36 a 48.

50. Una población de células T $\gamma\delta$ modificadas que puede obtenerse, tal como se ha obtenido, mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 21 a 48.

51. Una composición farmacéutica que comprende la población de células T $\gamma\delta$ expandidas de acuerdo con la reivindicación 48 o la población de células T $\gamma\delta$ modificadas de acuerdo con la reivindicación 50.

52. La población de células T $\gamma\delta$ expandidas de acuerdo con la reivindicación 49, la población de células T $\gamma\delta$ modificadas de acuerdo con la reivindicación 50 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 51 para usar como un medicamento.

53. La población de células T $\gamma\delta$ expandidas de acuerdo con la reivindicación 49, la población de células T $\gamma\delta$ modificadas de acuerdo con la reivindicación 50 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 51 para usar en el tratamiento del cáncer.

54. La población de células T $\gamma\delta$ expandidas, la población de células T $\gamma\delta$ modificadas o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 53, en donde el cáncer es un tumor sólido.