

BLINDAJE GENÉTICO NOVEDOSO*REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS*

[0001] La presente solicitud PCT reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional estadounidense núm. 63/327,230, presentada el 4 de abril de 2022; 63/371.860, presentada el 18 de agosto de 2022; y 63/482,755, presentada el 1 de febrero de 2023, cada una de las cuales se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad.

*REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO**ELECTRÓNICAMENTE A TRAVÉS DE EFS-WEB*

[0002] El contenido del listado de secuencias presentado electrónicamente en un archivo de texto ASCII (Nombre: 3817_170PC03_Seqlisting_ST26; Tamaño: 39.258 bytes; y Fecha de creación: 3 de abril de 2023), presentado con la solicitud, se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

[0003] El blindaje tradicional del receptor de antígeno quimérico (CAR) busca mejorar la persistencia, el crecimiento u otras características de las células CAR+ mediante, además, la expresión de IL-15 en la célula (ya sea secretada o por unión a la membrana). La coexpresión, ya sea en la misma construcción o por separado, de IL-15 por la célula T CAR+ $\gamma\delta$ reduce la capacidad de respuesta de esa célula a IL-15. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas composiciones y métodos para reprogramar las células T $\gamma\delta$ para proporcionar capacidad de respuesta a IL-15 con el fin de adaptar estas células para diversas inmunoterapias.

ANTECEDENTES

[0004] El creciente interés en la inmunoterapia de células T para el cáncer se ha centrado en la capacidad evidente de las células T modificadas como restos terapéuticos. Las células T gamma delta ($\gamma\delta$) representan un subconjunto de células T que expresan en su superficie un receptor de células T (TCR) $\gamma\delta$ distintivo y definitorio. Este TCR está formado por una cadena gamma (γ) y una cadena delta (δ). Las células T $\gamma\delta$ humanas pueden clasificarse ampliamente en uno o dos tipos: células T $\gamma\delta$ residentes en sangre periférica y células T $\gamma\delta$ residentes en tejidos no hematopoyéticos. La mayoría de las células T $\gamma\delta$ residentes en sangre expresan un TCR V δ 2, mientras que esto es menos común entre las células T $\gamma\delta$ residentes en tejidos, que usan con mayor frecuencia V δ 1 y/u otras cadenas V δ .

[0005] La IL-15 es una citocina y un factor de crecimiento de las células T que se une a y señala a través de un complejo receptor compuesto por una subunidad β del receptor de IL-15 (IL-15R β , también conocida como IL-2R β), una subunidad α del receptor de IL-15 (IL-15R α) y una cadena γ común. La IL-15 normalmente es secretada por fagocitos después de una infección e induce la proliferación de ciertas células inmunitarias (p. ej., linfocitos citolíticos naturales), que luego matan a

las células infectadas. El blindaje tradicional del receptor de antígeno quimérico (CAR) busca mejorar la persistencia, el crecimiento u otras características de las células CAR+ mediante, además, la expresión de IL-15 en la célula (ya sea secretada o por unión a la membrana). La coexpresión, ya sea en la misma construcción o por separado, de IL-15 por la célula T CAR+ V δ 1 reduce la capacidad de respuesta de esa célula a IL-15. En consecuencia, se necesitan nuevas composiciones y métodos para reprogramar las células T $\gamma\delta$ para proporcionar capacidad de respuesta a IL-15 con el fin de adaptar estas células para diversas inmunoterapias.

COMPENDIO DE LA DESCRIPCIÓN

[0006] En un aspecto, la invención presenta una célula T $\gamma\delta$ que expresa una subunidad β del receptor de IL-15 recombinante (IL-15R β) (p. ej., en donde IL-15R β se expresa sin la coexpresión de una subunidad α del receptor de IL-15 recombinante (IL-15R α) (p. ej., sin la coexpresión de una subunidad α del receptor de IL-15 recombinante (IL-15R α), en donde el extremo N de IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo C del IL-15 o variante de esta).

[0007] En algunas modalidades, la célula T $\gamma\delta$ expresa adicionalmente una subunidad α del receptor de IL-15 recombinante (IL-15R α) o fragmento de esta.

[0008] En algunas modalidades, la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a una IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo C de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo N de la IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo N de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo C de la IL-15 o una variante de esta.

[0009] En algunas modalidades, la IL-15R β y la IL-15R α o fragmento de estas se expresan en tándem. La IL-15R β y la IL-15R α o fragmento de estas pueden incluir un enlazador entre ellas. El enlazador puede incluir un péptido escindible. El péptido escindible puede ser, por ejemplo, un péptido autoescindible, tal como un péptido 2A. En algunas modalidades, el péptido 2A es un péptido 2A del virus de la fiebre aftosa 18 (F2A), un péptido 2A del virus A de la rinitis equina (E2A), un péptido 2A del teschovirus-1 porcino (P2A) o un péptido 2A del virus thosa asigna (T2A).

[0010] En algunas modalidades, la célula T $\gamma\delta$ expresa adicionalmente un receptor de antígeno quimérico (CAR). El CAR puede carecer de un dominio de señalización intracelular.

[0011] En algunas modalidades, la célula T $\gamma\delta$ carece de un gen endógeno que codifica IL-15.

[0012] En algunas modalidades, la célula T $\gamma\delta$ expresa adicionalmente una IL-15 secretada o una variante de esta.

[0013] En otro aspecto, la invención presenta una célula T $\gamma\delta$ que expresa una IL-15R β recombinante y una IL-15 recombinante o una variante de estas.

[0014] En algunas modalidades, la IL-15R β y la IL-15 o variante de estas se expresan en tándem. La IL-15R β y la IL-15 o variante de estas pueden incluir un enlazador entre ellas. El enlazador puede incluir un péptido escindible. El péptido escindible puede ser, por ejemplo, un péptido autoescindible,

tal como un péptido 2A. En algunas modalidades, el péptido 2A es un péptido F2A, un péptido E2A, un péptido P2A o un péptido T2A.

[0015] En algunas modalidades, la célula T $\gamma\delta$ expresa adicionalmente una IL-15R α recombinante o fragmento de esta. El fragmento de la IL-15R α puede incluir, por ejemplo, un fragmento soluble.

5 El fragmento soluble puede incluir, por ejemplo, un dominio sushi. El dominio sushi puede estar unido a un dominio Fc. En algunas modalidades, la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a la IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo C de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo N de la IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo N de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo C de la IL-15 o una variante
10 de esta.

[0016] En algunas modalidades, la IL-15R β y la IL-15R α o fragmento de estas se expresan en tándem. Por ejemplo, la IL-15R β y la IL-15R α o fragmento de estas pueden incluir un segundo enlazador entre ellas. El segundo enlazador puede incluir un péptido escindible. El péptido escindible puede ser, por ejemplo, un péptido autoescindible, tal como un péptido 2A. En algunas modalidades,
15 el péptido 2A es un péptido F2A, un péptido E2A, un péptido P2A o un péptido T2A.

[0017] En algunas modalidades, la IL-15R β , la IL-15 o variante de esta y la IL-15R α recombinante o fragmento de estas se expresan en tándem.

[0018] En algunas modalidades, la célula T $\gamma\delta$ expresa adicionalmente un CAR. El CAR puede carecer de un dominio de señalización intracelular.

20 [0019] En algunas modalidades, la célula T $\gamma\delta$ carece de un gen endógeno que codifica IL-15.

[0020] En otro aspecto, la invención presenta una población aislada de células T $\gamma\delta$, en donde al menos 10 % (*p. ej.*, al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99%) de la población de células T $\gamma\delta$ expresan una IL-15R β recombinante. En algunas modalidades, al menos 50 % de la población de células T $\gamma\delta$ expresa la IL-15R β recombinante.

25 [0021] En algunas modalidades, la población aislada de células T $\gamma\delta$ expresa adicionalmente una IL-15R α recombinante o un fragmento de esta.

[0022] En algunas modalidades, la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a una IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo C de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo N de la IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo N de
30 la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo C de la IL-15 o una variante de esta.

[0023] En algunas modalidades, la IL-15R β y la IL-15R α o fragmento de estas se expresan en tándem. La IL-15R β y la IL-15R α o fragmento de estas pueden incluir un enlazador entre ellas. El enlazador puede incluir un péptido escindible. El péptido escindible puede ser, por ejemplo, un péptido autoescindible, tal como un péptido 2^a. En algunas modalidades, el péptido 2^a es un péptido
35 F2A, un péptido E2A, un péptido P2A o un péptido T2A.

[0024] En algunas modalidades, la población aislada de células T $\gamma\delta$ expresa adicionalmente CAR. El CAR puede carecer de un dominio de señalización intracelular.

[0025] En algunas modalidades, la población aislada de las células T $\gamma\delta$ carece de un gen endógeno que codifica IL-15.

5 [0026] En algunas modalidades, la población aislada de las célula T $\gamma\delta$ expresa adicionalmente una IL-15 secretada o una variante de esta.

[0027] En otro aspecto, la invención presenta una población aislada de células T $\gamma\delta$, en donde al menos 10 % (*p. ej.*, al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % , 97% o 99%) de la población de células T $\gamma\delta$ expresan una IL-15R β recombinante e IL-15 o variante de esta. En
10 algunas modalidades, al menos 50 % de la población de células T $\gamma\delta$ expresa una IL-15R β recombinante e IL-15 o variante de esta.

[0028] En algunas modalidades, la IL-15R β y la IL-15 o variante de estas se expresan en tándem. Por ejemplo, la IL-15R β y el receptor de IL-15 o variante de estas pueden incluir un enlazador entre ellas. El enlazador puede incluir un péptido escindible. El péptido escindible puede ser, por ejemplo,
15 un péptido autoescindible, tal como un péptido 2^a. En algunas modalidades, el péptido 2^a es un péptido F2A, un péptido E2A, un péptido P2A o un péptido T2A.

[0029] En algunas modalidades, la población aislada de células T $\gamma\delta$ expresa adicionalmente una IL-15R α recombinante o un fragmento de esta. El fragmento de la IL-15R α puede incluir, por ejemplo, un fragmento soluble. El fragmento soluble puede incluir, por ejemplo, un dominio sushi. El dominio
20 sushi puede estar unido a un dominio Fc. En algunas modalidades, la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a la IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo C de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo N de la IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo N de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo C de la IL-15 o una variante de esta.

25 [0030] En algunas modalidades, la IL-15R β y la IL-15R α o fragmento de estas se expresan en tándem. Por ejemplo, IL-15R β y la IL-15R α o fragmento de estas pueden incluir un segundo enlazador entre ellas. Por ejemplo, la IL-15R β y la IL-15R α o fragmento de estas pueden incluir un segundo enlazador entre ellas. El segundo enlazador puede incluir un péptido escindible. El péptido escindible puede ser, por ejemplo, un péptido autoescindible, tal como un péptido 2A. En algunas
30 modalidades, el péptido 2A es un péptido F2A, un péptido E2A, un péptido P2A o un péptido T2A.

[0031] En algunas modalidades, la IL-15R β , la IL-15 o variante de esta y la IL-15R α recombinante o fragmento de estas se expresan en tándem.

[0032] En algunas modalidades, la población aislada de células T $\gamma\delta$ expresa adicionalmente un CAR. El CAR puede carecer de un dominio de señalización intracelular.

35 [0033] En algunas modalidades, la población aislada de las células T $\gamma\delta$ carece de un gen endógeno

que codifica IL-15.

[0034] En otro aspecto, la invención presenta un método para producir una población de células T $\gamma\delta$ que expresan una IL-15R β recombinante. El método incluye (a) proporcionar una población de células T $\gamma\delta$; y (b) transducir la población de células T $\gamma\delta$ con un polinucleótido que codifica la IL-15R β , produciendo así la población de células T $\gamma\delta$ que expresan la IL-15R β recombinante.

[0035] En algunas modalidades, el polinucleótido incluye un IRES conectado operativamente a la IL-15R β .

[0036] En algunas modalidades, el método incluye además la transducción de la población inicial de células T $\gamma\delta$ con un polinucleótido que codifica una IL-15R α o un fragmento de esta. En algunas modalidades, la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo C de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo N de la IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo N de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo C de la IL-15 o una variante de esta.

[0037] En algunas modalidades, el polinucleótido codifica la IL-15R β y la IL-15R α en tándem. El polinucleótido puede incluir un enlazador entre la IL-15R β y la IL-15R α . El enlazador puede codificar un péptido escindible o incluir un IRES. El péptido escindible puede ser, por ejemplo, un péptido autoescindible, tal como un péptido 2A. En algunas modalidades, el péptido 2A es un péptido F2A, un péptido E2A, un péptido P2A o un péptido T2A.

[0038] En alguna modalidad, el método incluye adicionalmente la transducción de la célula con un polinucleótido que codifica un CAR. En algunas modalidades, el polinucleótido codifica el CAR y la IL-15R β en tándem. Por ejemplo, el polinucleótido puede incluir un enlazador entre el CAR y la IL-15R β . El enlazador puede codificar un péptido escindible o incluir un IRES. El péptido escindible puede ser, por ejemplo, un péptido autoescindible, tal como un péptido 2A. En algunas modalidades, el péptido 2A es un péptido F2A, un péptido E2A, un péptido P2A o un péptido T2A.

[0039] En otro aspecto, la invención presenta un método para producir una población de células T $\gamma\delta$ que expresan una IL-15R β recombinante y una IL-15 o variante de esta. El método incluye (a) proporcionar una población de células T $\gamma\delta$; (b) transducir la población de células T $\gamma\delta$ con un polinucleótido que codifica la IL-15R β ; y (c) transducir la población de células T $\gamma\delta$ con un polinucleótido que codifica la IL-15 o una variante de esta, produciendo así la población de células T $\gamma\delta$ que expresan la IL-15R β recombinante y la IL-15 o una variante de esta.

[0040] En algunas modalidades, el polinucleótido incluye un IRES conectado operativamente a la IL-15R β y/o la IL-15 o una variante de esta.

[0041] En algunas modalidades, el polinucleótido codifica la IL-15R β y la IL-15 o variante de esta en tándem. Por ejemplo, el polinucleótido puede incluir un enlazador entre la IL-15R β y la IL-15 o una variante de esta. El enlazador puede codificar un péptido escindible o incluir un IRES. El péptido

escindible puede ser, por ejemplo, un péptido autoescindible, tal como un péptido 2A. En algunas modalidades, el péptido 2A es un péptido F2A, un péptido E2A, un péptido P2A o un péptido T2A.

[0042] En algunas modalidades, el método incluye además la transducción de la población inicial de células T $\gamma\delta$ con un polinucleótido que codifica una IL-15R α o un fragmento de esta. El fragmento de la IL-15R α puede incluir un fragmento soluble. Por ejemplo, el fragmento soluble puede incluir un dominio sushi. En algunas modalidades, el dominio sushi está unido a un dominio Fc.

[0043] En algunas modalidades, la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a la IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo C de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo N de la IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo N de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo C de la IL-15 o una variante de esta.

[0044] En algunas modalidades, el polinucleótido codifica la IL-15R β y la IL-15R α en tándem.

[0045] En algunas realizaciones, el polinucleótido incluye un segundo enlazador entre la IL-15R β y la IL-15R α . El segundo enlazador puede codificar un péptido escindible o incluir un IRES. El péptido escindible puede ser, por ejemplo, un péptido autoescindible, tal como un péptido 2A. En algunas modalidades, el péptido 2A es un péptido F2A, un péptido E2A, un péptido P2A o un péptido T2A.

[0046] En algunas modalidades, el polinucleótido codifica la IL-15R β , la IL-15 o variante de esta y la IL-15R α recombinante o fragmento de estas en tándem.

[0047] En algunas modalidades, el método incluye adicionalmente la transducción de la célula con un polinucleótido que codifica un CAR. El polinucleótido puede codificar el CAR y la IL-15R β en tándem. Por ejemplo, el polinucleótido puede incluir un enlazador entre el CAR y la IL-15R β . El enlazador puede codificar un péptido escindible o incluir un IRES. El péptido escindible puede ser, por ejemplo, un péptido autoescindible, tal como un péptido 2A. En algunas modalidades, el péptido 2A es un péptido F2A, un péptido E2A, un péptido P2A o un péptido T2A.

[0048] En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el método incluye proporcionar un vector que incluye el polinucleótido. El vector puede ser, *p. ej.*, un vector viral. El vector viral puede ser, por ejemplo, un virus de la familia Retroviridae, un adenovirus, un parvovirus, un coronavirus, un rhabdovirus, un paramixovirus, un picornavirus, un alfavirus, un virus del herpes o un poxvirus.

[0049] En algunas modalidades, el vector viral parvovirus es un vector AAV.

[0050] En algunas modalidades, el vector viral es un vector viral de la familia Retroviridae. El vector viral de la familia Retroviridae puede ser, *p. ej.*, un vector lentiviral. El vector viral de la familia Retroviridae puede ser, *p. ej.*, un vector alfaretroviral o un vector gammaretroviral. En algunas modalidades, el vector viral de la familia Retroviridae incluye un tracto de polipurina central, un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota, una secuencia de señal de VIH LTR en 5', un sitio de empalme en 5' de la señal Psi de VIH, elemento delta-GAG, sitio

de empalme en 3' y un LTR autoinactivante en 3'.

[0051] En algunas modalidades, el vector viral es un vector viral pseudotipado. El vector viral pseudotipado puede ser, p. ej., un adenovirus pseudotipado, un parvovirus pseudotipado, un coronavirus pseudotipado, un rabdovirus pseudotipado, un paramixovirus pseudotipado, un picornavirus pseudotipado, un alfavirus pseudotipado, un virus del herpes pseudotipado, un poxvirus pseudotipado y un virus de la familia Retroviridae pseudotipado. En algunas modalidades, el vector viral pseudotipado es un vector lentiviral. En algunas modalidades, el vector viral pseudotipado incluye una o más proteínas de envoltura de un virus seleccionado de virus de estomatitis vesicular VSV, virus RD114, MLV, FeLV, VEE, HFV, WDSV, SFV, virus de la rabia, ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, virus CT10 del sarcoma aviar y EIAV. Por ejemplo, en algunas modalidades, el vector viral pseudotipado incluye una proteína de envoltura VSV-G.

[0052] En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el método incluye además cultivar la población inicial de células T $\gamma\delta$ en presencia de IL-2 y/o IL-15 exógenas.

[0053] En algunas modalidades, al menos 10 % (p. ej., al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, o 99 %) de la población de células T $\gamma\delta$ expresa la IL-15R β . En algunas modalidades, al menos 50 % de la población de células T $\gamma\delta$ expresa la IL-15R β .

[0054] En otro aspecto, la invención presenta un método de expansión de células T $\gamma\delta$. El método incluye (a) proporcionar una población de células T $\gamma\delta$ que expresan una IL-15R β ; y (b) cultivar la población de células T $\gamma\delta$ en presencia de IL-2 y/o IL-15 exógena o una variante de estas.

[0055] En algunas modalidades, la población de células T $\gamma\delta$ expresa adicionalmente una IL-15R α recombinante o un fragmento de esta. La IL-15R α o un fragmento de esta puede unirse a IL-15 o a una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo C de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo N de la IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo N de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo C de la IL-15 o una variante de esta.

[0056] En otro aspecto, la invención presenta un método de expansión de células T $\gamma\delta$. El método incluye (a) proporcionar una población de células T $\gamma\delta$ que expresan una IL-15R β e IL-15 o una variante de estas; y (b) cultivar las células T $\gamma\delta$, en donde la IL-15 o variante de esta expande la población de células T $\gamma\delta$.

[0057] En algunas modalidades, el método incluye además cultivar la población de células T $\gamma\delta$ en presencia de IL-2 exógena.

[0058] En algunas modalidades, la población de células T $\gamma\delta$ expresa adicionalmente una IL-15R α recombinante o un fragmento de esta. El fragmento de la IL-15R α puede incluir, por ejemplo, un fragmento soluble. El fragmento soluble puede incluir, por ejemplo, un dominio sushi. En algunas

modalidades, el dominio sushi está unido a un dominio Fc.

[0059] En algunas modalidades, la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo C de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo N de la IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo N de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo C de la IL-15 o una variante de esta. Como se usa en la presente, "mbIL-15" se refiere a una IL-15R α unida a la membrana unido a una IL-15 (p. ej., en donde el extremo C de la IL-15R α está unido a un extremo N de la IL-15).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0060] Las Figuras 1A-1C son descripciones generales esquemáticas de construcciones convencionales y novedosas de blindaje de IL-15. La Figura 1A muestra dibujos de las estrategias de blindaje evaluadas en esta invención. Las construcciones de blindaje convencionales utilizadas en el contexto de las células T $\alpha\beta$, las células NK y las células iNKT utilizan construcciones de IL-15 secretada (sIL-15) o unidas a la membrana (mbIL-15). Las nuevas estrategias de blindaje se basan en la introducción de la cadena beta común (también conocida como IL-2R β , IL-15R β o CD122) sola o en combinación con la cadena de IL-15R α (CD215) unida a IL-15 o sin mutaciones. La Figura 1B muestra la estructura de dominio de los vectores gammaretrovirales blindados convencionales que codifican CAR. La Figura 1C muestra la estructura de dominio de los vectores gammaretrovirales blindados nuevos que codifican CAR.

[0061] Las Figuras 2A-2C son gráficas que evalúan el efecto de las estrategias de blindaje convencionales sobre la expansión y el fenotipo de las células T V δ 1. La Figura 2A muestra el factor de expansión de células T V δ 1 modificadas con CAR sin blindaje (muCAR19) y convencionalmente blindadas (muCAR19.sIL-15 y muCAR19-mbIL-15). La Figura 2B muestra el análisis de la expresión superficial de CAR, IL-15 e IL-15R α mediante citometría de flujo en células T V δ 1 modificadas con CAR blindada con mbIL-15. La Figura 2C muestra el análisis de la producción de IL-15 mediante ELISA en células T V δ 1 modificadas con CAR sin blindaje (muCAR19) y blindadas con IL-15 secretadas (muCAR19.sIL-15).

[0062] Las Figuras 3A-3C son gráficos que evalúan el efecto de las estrategias de blindaje convencionales sobre la citotoxicidad de las células T V δ 1, la supervivencia y la proliferación inducida por la estimulación repetida del antígeno. La Figura 3A muestra la comparación de la actividad citotóxica de células T V δ 1 no blindadas (muCAR19) y blindados convencionalmente frente a la línea celular de leucemia linfoblástica aguda NALM-6. La Figura 3B muestra el análisis de la supervivencia de células T V δ 1 modificadas con CAR no blindadas y blindadas convencionalmente mediante citometría de flujo. La Figura 3C muestra el factor de expansión de células T V δ 1 no blindadas modificados con CAR y blindadas convencionalmente durante tres rondas de estimulación antigénica repetida con células CD19+ NALM-6.

[0063] La Figura 4 es una gráfica que evalúa el efecto del blindaje de mbIL-15 sobre el factor de expansión de las células T V δ 1 modificadas con CAR. Las gráficas muestran la comparación del factor de expansión de células V δ 1 CAR-T no blindadas y blindadas con mbIL-15 en presencia de concentraciones altas y bajas de IL-15.

5 [0064] La Figura 5 es una gráfica que muestra el análisis de la expresión del componente de la cadena del receptor de IL-15 mediante LEGENDScreen. El mapa de calor muestra el porcentaje de IL-15R α (CD215), IL-15R β (CD122, también conocida como IL-2R β) y cadena gamma común (CD123, γ_c) que expresan células T V δ 1 en células T V δ 1 no modificadas.

[0065] Las Figuras 6A y 6B son gráficas que evalúan el efecto de la transferencia de la cadena β de IL-15R en presencia de la cadena α de mbIL-15 o IL-15R. La Figura 6A muestra la comparación del factor de expansión sin blindaje (muCAR19), mbIL-15 blindado (muCAR19. α .15), cadena de mbIL-15 e IL-15 β blindada (muCAR19. α .15. β) y células T V δ 1 modificadas con CAR de IL-15R α y β blindados (muCAR19. α . β). La Figura 6B muestra expansión en pliegues de las células T V δ 1 que expresan cadenas α .15, α . β o α .15. β en presencia de concentraciones bajas y altas de IL-15.

15 [0066] Las Figuras 7A-7C son gráficas que evalúan el efecto de la transferencia de cadena de IL-15R β sobre la citotoxicidad, supervivencia y proliferación inducida por estimulación repetida de antígeno de células T V δ 1. La Figura 7A muestra la comparación de la actividad citotóxica del blindaje convencional (mbIL-15, α .15), cadena mbIL-15 e IL-15 β blindada (muCAR19. α .15. β) y células T V δ 1 modificadas con CAR de IL-15R α y β blindadas (muCAR19. α . β) frente a la línea celular de leucemia linfoblástica aguda NALM-6. La Figura 7B muestra el efecto del blindaje sobre la expansión del pliegue, el enriquecimiento y la eliminación del objetivo (NALM-6) de células T V δ 1 modificadas con CAR durante la estimulación repetida del antígeno con células CD19+ NALM-6 en ausencia y presencia (Figura 7C) de IL-15 exógena.

[0067] Las Figuras 8A y 8B son gráficas que muestran el análisis de la expresión de CAR y la cadena IL-15R 3 días después de la transducción. La Figura 8A muestra la comparación de la expresión de CAR en células T V δ 1 blindadas con construcciones de blindaje novedosas 3 días después de la transducción. La Figura 8B muestra la comparación de la expresión de IL-15R α , IL-15R β , cadena gamma común e IL-15 unida en células T V δ 1 modificadas con CAR blindados.

[0068] Las Figuras 9A y 9B son gráficas que evalúan el efecto de la transferencia de la cadena IL15R β sola o en combinación con cadenas de IL-15R α sin mutaciones o unidas a IL-15 sobre la expansión de células T V δ 1. La Figura 9A muestra la comparación del factor de expansión de IL-15R β (muCAR19. β), mbIL-15 e IL-15R β (muCAR19. α .15. β) y células T V δ 1 modificadas con CAR blindadas con IL-15R α y β (muCAR19. α . β). La Figura 9B muestra el factor de expansión de células T V δ 1 modificadas con CAR blindadas con construcciones novedosas.

35 [0069] Las Figuras 10A-10D son gráficas que muestran el análisis fenotípico de productos

farmacológicos de células T V δ 1 modificadas con CAR blindadas, congelados y descongelados. La Figura 10A muestra el análisis de la expresión de CAR en células T V δ 1 blindadas. La Figura 10B muestra la comparación de la expresión de IL-15R α , IL-15R β , cadena gamma común e IL-15 unida en células T V δ 1 modificadas con CAR blindadas. La Figura 10C muestra la comparación de la expresión de CAR en células T V δ 1 blindadas cultivadas en presencia de concentraciones altas y bajas de IL-15 3 días después de la transducción (día 7) y el día de la recolección (día 14). La Figura 10D muestra el análisis de citometría de flujo de la expresión de marcador inhibidor y activador de células inmunitarias en fracciones de células T CAR+ve y CAR-ve V δ 1.

[0070] Las Figuras 11A-11E son gráficas que muestran la actividad citotóxica de productos farmacológicos de células T V δ 1 modificados con CAR blindados, recién descongelados. La actividad citotóxica de las células blindadas se muestra en ausencia (Figura 11A) y presencia (Figura 11B) de IL-15. La citotoxicidad de células modificadas con CAR dirigidas a CD19 frente a dianas de antígeno negativo (Figura 11C) se muestra frente a dianas de AML MV4-11 a la izquierda y MOLM-13 a la derecha. La Figura 11D muestra la citotoxicidad de células modificadas con CAR dirigidas a CD123 no blindado (CAR123) o blindado con mbIL-15 e IL-15R β (CAR123. α .15. β). La Figura 11E muestra la citotoxicidad de células modificadas con CAR dirigidas a la mesotelina sin blindaje (Meso-CAR) o con blindaje con mbIL-15 e IL-15R β (Meso-CAR. α .15. β).

[0071] Las Figuras 12A-12D son gráficas que muestran la supervivencia in vitro de productos farmacológicos de células T V δ 1 modificados con CAR con blindaje, recién descongelados en ausencia de IL-15 exógena. La Figura 12A muestra el factor de expansión de células T V δ 1 modificadas con CAR blindadas. Figura 12B Factor de multiplicación relativo de los números de células T V δ 1 no transducidas (CAR -ve). La Figura 12C muestra el enriquecimiento de células T V δ 1 modificadas con CAR. La Figura 12D muestra el porcentaje de linfocitos viables durante el transcurso del ensayo.

[0072] Las Figuras 13A-13F son gráficas que evalúan el efecto de la exposición repetida al antígeno sobre la proliferación, el enriquecimiento y la eliminación de células diana de células T V δ 1 modificados con CAR con blindaje. Las Figuras 13A-13C muestran estimulación repetida de antígeno con células NALM-6 en presencia de concentraciones suprafisiológicas (10 ng/mL), y las Figuras 13D-13F muestra concentraciones fisiológicas de IL-15 (70 pg/mL).

[0073] Las Figuras 14A-14M son un diagrama esquemático y los resultados que evalúan el rendimiento in vivo de células T V δ 1 modificados con CAR con blindaje en ratones NSG y NOG-IL15 expuestos a células tumorales NALM6. La Figura 14A muestra el diseño del estudio in vivo y la agrupación del estudio experimental. La Figura 14B muestra la eficacia in vivo en ratones NSG con IL-15 exógena. La Figura 14C muestra la eficacia in vivo en ratones NSG sin IL-15 exógena. La Figura 14D muestra la eficacia in vivo en ratones NOG-hIL15. La Figura 14E muestra la persistencia

in vivo de células T CD19 CAR+ y CAR-V δ 1 en la médula ósea de ratones NSG en el día 3 después de la dosificación. La Figura 14F compara las proporciones del producto farmacológico de V δ 1 CD19 CAR+ tras la descongelación con las células recuperadas de la médula ósea de ratones NSG 3 días después de la dosificación. La Figura 14G muestra la eficacia in vivo en ratones NSG con IL-15 exógena hasta la finalización del estudio el día 20/21. La Figura 14H muestra la eficacia in vivo en ratones NSG sin IL-15 exógena hasta la finalización del estudio el día 20/21. La Figura 14I muestra la eficacia in vivo en ratones NOG-hIL15 hasta la finalización del estudio el día 20/21. La Figura 14J compara las proporciones del producto farmacológico de V δ 1 CD19 CAR+ tras la descongelación con las células recuperadas de la médula ósea de ratones NSG 3 y 14 días después de la dosificación. La Figura 14K compara el número de células V δ 1 CD19 CAR+ y CAR- recuperadas de muestras de médula ósea recolectadas el día 14 después de la dosificación de ratones NSG dosificados con IL-15 exógena. La Figura 14L compara el número de células V δ 1 CD19 CAR+ y CAR- recuperadas de muestras de médula ósea recolectadas el día 14 después de la dosificación de ratones NSG que no recibieron IL-15 exógena. La Figura 14M compara el número de células tumorales NALM-6 recuperadas de muestras de médula ósea recolectadas el día 14 después de la dosificación de ratones NSG que no recibieron IL-15 exógena.

[0074] Las Figuras 15A-15E son gráficas que evalúan la supervivencia in vitro y el efecto de la exposición repetida al antígeno en dos V δ 1 T modificados con CAR(YP218 o P4) no blindados diferentes dirigidos a la mesotelina, blindados con mbIL-15 e IL-15R β (CAR. α .15. β) o blindados con IL-15R β (CAR. β). La Figura 15A muestra la supervivencia de los células T CAR sin blindaje y blindadas con α .15. β . Las Figuras 15B y 15D muestran la confluencia tumoral que se midió rastreando la fluorescencia de GFP a lo largo del tiempo después del tratamiento con diferentes productos de células T Meso-CAR. Las Figuras 15C y 15E muestran el factor de expansión de células T CAR seguido durante el ensayo de estimulación con antígeno repetida.

[0075] Las Figuras 16A y 16B son un diagrama esquemático y los resultados que evalúan el rendimiento in vivo de células T V δ 1 modificados con MesoCAR no blindado, blindado con mbIL-15 e IL-15R β y blindado con IL-15R β (P4 CAR, P4 CAR. α .15. β y P4 CAR. β respectivamente) en un modelo tumoral A549 diseminado. Las líneas celulares A549 están modificadas para expresar mesotelina (A549-Meso). La Figura 16A muestra el esquema del modelo utilizado. La Figura 16B muestra la eficacia in vivo de los productos estudiados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0076] La presente invención proporciona composiciones y métodos para modificar células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, células T v δ 1 y células T v δ 2) para que respondan a IL-15. La IL-15 es una citocina y un factor de crecimiento de las células T que se une a y señala a través de un complejo receptor compuesto por una subunidad β del receptor de IL-2 (IL-15R β), una subunidad α del receptor de IL-15 (IL-15R α)

y una cadena γ común.

[0077] El blindaje tradicional del receptor de antígeno quimérico (CAR) busca mejorar la persistencia, el crecimiento u otras características de las células CAR+ mediante, además, la expresión de IL-15 en la célula (ya sea secretada o por unión a la membrana). La coexpresión, ya sea en la misma construcción o por separado, de IL-15 por la célula CAR+ reduce la capacidad de respuesta de esa célula a IL-15 exógena. La presente invención introduce un bucle de señalización de IL-15 positivo y aumenta la capacidad de respuesta a IL-15 en las células CAR+ al coexpresar las subunidades β y/o α del receptor de IL-15, que parecen estar limitadas en algunas células, incluidas las células T $\gamma\delta$. Esto puede mejorar la sensibilidad de la célula CAR+ incluso en ausencia de construcciones blindadas. La estrategia descrita se puede utilizar sola o junto con CAR para mejorar la persistencia y proliferación de células T $\gamma\delta$.

[0078] Los enfoques tradicionales para diseñar bucles de señalización de IL-15 en células NK y células T $\alpha\beta$ incluyen la transducción con una construcción que codifica IL-15R α . En cada caso, una célula NK o una célula $\alpha\beta$ que expresa IL-15R α y es tratada con IL-15 aumenta la proliferación, supervivencia y toxicidad de las células. Por el contrario, las células T $\gamma\delta$ modificados con IL-15R α exhiben una proliferación reducida con efectos moderados sobre la supervivencia. La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que las células T $\gamma\delta$ pueden modificarse con una IL-15R β recombinante para introducir de forma eficaz un bucle de señalización de IL-15 positivo. Esto fue inesperado porque se esperaba que se necesitaría IL-15R α para la capacidad de respuesta de IL-15.

[0079] Las composiciones y métodos descritos en la presente presentan células T $\gamma\delta$ y poblaciones de estos que están modificados para expresar una IL-15R β recombinante. Estas células T $\gamma\delta$ modificados con IL-15R β proporcionan una proliferación y supervivencia eficientes en presencia de IL-15 y las dotan de una citotoxicidad sustancial para diversos enfoques terapéuticos.

I. Definiciones

[0080] Debe entenderse que los aspectos y las modalidades de la invención descrita en la presente incluyen “que comprende”, “que consiste en” y “que consiste esencialmente en” aspectos y modalidades. Tal como se usan en la presente, las formas “un/una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que claramente se indique lo contrario.

[0081] La expresión “aproximadamente”, tal como se utiliza en la presente, se refiere al rango de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a “aproximadamente” un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) modalidades que se dirigen a ese valor o parámetro en sí. En algunos casos, “aproximadamente” abarca variaciones de +20 %, en algunos casos +10 %, en algunos casos +5 %, en algunos casos +1 %, o en algunos casos +0,1 % del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas

para realizar los métodos descritos.

[0082] Como se usa en la presente, el término "célula T $\gamma\delta$ modificada" se refiere a una célula T $\gamma\delta$ que expresa un transgén (es decir, un gen que ha sido transducido en la célula T $\gamma\delta$ modificado o una célula parental de este).

5 [0083] Como se usa en la presente, el término "célula T $\gamma\delta$ cebada" se refiere a una población inicial (*p. ej.*, una población endógena de células T $\gamma\delta$) que se ha visto afectada por una condición de cultivo. En algunos casos, una célula T $\gamma\delta$ cebado tiene un perfil de receptor de entrada viral funcional diferente en relación con su contraparte no cebado antes de experimentar la condición de cultivo. En algunas modalidades, una población de células T $\gamma\delta$ cebadas es una población expandida
10 de células T $\gamma\delta$.

[0084] Como se usa en la presente, una "población expandida de células $\gamma\delta$ " se refiere a una población de células hematopoyéticas que incluyen células T $\gamma\delta$ que se ha cultivado en una condición y durante un tiempo que ha inducido la expansión de las células $\gamma\delta$, es decir, un mayor número de células $\gamma\delta$. Asimismo, una "población expandida de células T V δ 1", tal como se usa en
15 la presente, se refiere a una población de células hematopoyéticas que incluyen células T V δ 1 que se ha cultivado en una condición y durante un tiempo que ha inducido la expansión de las células T V δ 1, es decir, un mayor número de células V δ 1. De manera similar, una "población expandida de células T V δ 2", tal como se usa en la presente, se refiere a una población de células hematopoyéticas que incluyen células T V δ 2 que se ha cultivado en una condición y durante un
20 tiempo que ha inducido la expansión de las células T V δ 2, es decir, un mayor número de células V δ 2.

[0085] Tal como se usa en la presente, una "población" de células T $\gamma\delta$ se refiere a un grupo de tres o más células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, al menos 10, al menos 102, al menos 103, al menos 104, al menos 105, al menos 106, al menos 107, al menos 108, al menos 109, al menos 1010, al menos 1011, al menos
25 1012 o al menos 1013) células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, células T $\gamma\delta$ modificadas). Una población de un tipo de célula particular (*p. ej.*, una población de células T $\gamma\delta$ endógenas, una población de células T $\gamma\delta$ cebadas o una población de células T $\gamma\delta$ modificadas) se refiere a las células de ese tipo y no a las células de un tipo diferente dentro de una población más amplia. Por ejemplo, si 10 % de las células de una población inicial de 108 células T son células T $\gamma\delta$, la población inicial de células T $\gamma\delta$ es 107.

30 [0086] Como se usa en la presente, una "proteína de blindaje" se refiere a una proteína codificada por un transgén que, cuando es expresado por una célula T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, una célula T $\gamma\delta$ que expresa un CAR), aumenta la persistencia de la célula T $\gamma\delta$, la proliferación de la célula T $\gamma\delta$ o incrementa la citotoxicidad de la célula T $\gamma\delta$ hacia una célula objetivo, *p. ej.*, a través de la señalización (*p. ej.*, señalización de citocinas) para mejorar, *p. ej.*, la persistencia celular, la viabilidad celular, la
35 activación y otras características deseadas. Una proteína de blindaje puede ser una proteína unida

a la membrana o una proteína soluble. Por ejemplo, las proteínas blindadas incluyen proteínas unidas a la membrana, tal como un receptor unido a la membrana (*p. ej.*, IL-15R, *p. ej.*, IL-15R β e IL-15R α , TCR $\alpha\beta$, un receptor de citotoxicidad natural (*p. ej.*, NKp30, NKp44 o NKp46), un receptor de citocinas (*p. ej.*, receptor IL-12), y/o un receptor de quimiocinas (*p. ej.*, receptor CCR2) y/o un ligando o citocina unido a la membrana (*p. ej.*, IL-15 unido a la membrana, IL-7 unido a la membrana, CD40L unido a la membrana, 4-1BB unido a la membrana, 4-1BBL unido a la membrana, CCL19 unido a la membrana). De manera adicional o alternativa, las proteínas blindadas pueden ser proteínas solubles, tales como ligandos solubles o citocinas (*p. ej.*, IL-15 soluble, IL-7 soluble, IL-12 soluble, CD40L soluble, 4-1BBL soluble, y/o CCL19 soluble). En algunas modalidades, una proteína de blindaje no es específica de antígeno.

[0087] Tal como se usa en la presente, "IL-15" se refiere a IL-15 nativa o recombinante o una variante de esta que tiene al menos 70 % (*p. ej.*, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, *p. ej.*, al menos 85 %) de identidad de secuencia sobre una porción de igual longitud que actúa como agonista de una o más subunidades del receptor de IL-15 (IL-15R) (*p. ej.*, muteínas, análogos, subunidades, complejos de receptores, fragmentos, isoformas y peptidomiméticos de estos). IL-15, tal 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. La IL-15 fue reportada por primera vez por Grabstein et al. (Science 264.5161: 965-969, 1994) como una proteína madura de 114 aminoácidos. El término "IL-15", tal como se usa en la presente, significa IL-15 nativa o recombinante y muteínas, análogos, subunidades de estas o complejos de estas (*p. ej.*, complejos de receptores, *p. ej.*, péptidos de sushi, tal como se describe en la publicación PCT n.º WO 2007/046006), y cada uno de los cuales puede estimular la proliferación de las células CTLL-2. En los ensayos de proliferación de CTLL-2, los sobrenadantes de 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.

[0088] La IL-15 humana se puede obtener de acuerdo con los procedimientos descritos por Grabstein et al. (Science 264.5161: 965-969, 1994) o mediante procedimientos convencionales tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se realizó un depósito de ADNc de IL-15 humana con la ATCC® el 19 de febrero de 1993 y se le asignó el número de acceso 69245.

[0089] La secuencia de aminoácidos de la IL-15 humana (ID del 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 la IL-15 murina (*Mus musculus*) (ID del gen 16168) se encuentra en Genbank bajo el localizador de acceso NP_001241676.1 GI: 363000984.

[0090] IL-15 también puede referirse a IL-15 derivada de una variedad de especies de mamíferos, que incluyen, por ejemplo, humanos, simios, bovinos, porcinos, equinos y murinos. Una "muteína"

de IL-15, tal como se hace referencia en la presente, es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de un polipéptido de IL-15 de mamífero nativo debido a una o más eliminaciones, inserciones y/o sustituciones de aminoácido. 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, tal como Ile, Val, Leu o Ala entre sí, o sustituciones de un resto polar por otro, tal como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Se conocen bien otras sustituciones conservadoras de este tipo, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras con características de hidrofobicidad similares. Las variantes de IL-15 de origen natural también están abarcadas por la invención. Ejemplos de tales variantes son proteínas que resultan de eventos alternativos de corte y empalme de ARNm o de la escisión proteolítica de la proteína IL-15, donde se retiene la propiedad de unión a 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 hospedadoras, debido a la eliminación proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de la proteína IL-15 (generalmente de 1-10 aminoácidos). En algunas modalidades, el extremo de la proteína se puede modificar para alterar sus propiedades físicas, por ejemplo, con un grupo químico tal como el polietilenglicol (Yang et al. Cancer 76:687-694, 1995). En algunas modalidades, el extremo o interior de la proteína se puede modificar con aminoácidos adicionales (Clark-Lewis et al. PNAS 90:3574-3577, 1993).

[0091] Como se usa en la presente, "subunidad β del receptor de IL-2", "IL-2R β ", "subunidad β del receptor de IL-15" e "IL-15R β ", usados indistintamente en la presente, se refieren a IL-15R β nativo o recombinante o una variante del mismo que tiene al menos un 70 % (*p. ej.*, al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, *p. ej.*, al menos un 85 %) de identidad de secuencia en una porción de igual longitud que actúa como receptor de uno o más de IL-2 o IL-15 (*p. ej.*, muteínas, análogos, fragmentos, isoformas y peptidomiméticos de estos). IL-15R β incluye longitud completa y fragmentos de esta. IL-2R β , denominada IL-15R β en la presente, es un receptor del factor de crecimiento de células T conocido que puede ayudar a la proliferación de una línea celular dependiente de IL-2, CTLL-2. IL-2R β es una proteína madura de 551 aminoácidos. El término "IL-15R β ", como se usa en la presente, significa IL-2R β nativa o recombinante y muteínas, análogos, subunidades de esta o complejos de esta.

[0092] La secuencia de aminoácidos de IL-2R β humana (ID del gen 3560) se encuentra en Genbank bajo el localizador de acceso NP_000869, NP_001333151 y NP_001333152. La secuencia de aminoácidos de la IL-2R β murina (*Mus musculus*) (ID del gen 16185) se encuentra en Genbank bajo el localizador de acceso NP_032394.

[0093] IL-15R β también puede referirse a IL-15R β derivada de una variedad de especies de mamíferos, que incluyen, por ejemplo, humanos, simios, bovinos, porcinos, equinos y murinos. Una "muteína" de IL-15R β , tal como se hace referencia en la presente, es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de un polipéptido de IL-15R β de mamífero nativo debido a una o más eliminaciones, inserciones y/o sustituciones de aminoácido. 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, tal como Ile, Val, Leu o Ala entre sí, o sustituciones de un resto polar por otro, tal como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Se conocen bien otras sustituciones conservadoras de este tipo, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras con características de hidrofobicidad similares. Las variantes de IL-15R β de origen natural también están abarcadas por la invención. Ejemplos de tales variantes son proteínas que resultan de eventos alternativos de corte y empalme de ARNm o de la escisión proteolítica de la proteína IL-15R β , donde se retiene la propiedad de unión a IL-15R β . El corte y empalme alternativo del ARNm puede producir una proteína IL-15R β 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 hospedadoras, debido a la eliminación proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de la proteína IL-15R β (generalmente de 1-10 aminoácidos).

[0094] Tal como se usa en la presente, "subunidad α del receptor de IL-15" e "IL-15R α ", se refiere a IL-15R α nativa o recombinante o una variante de esta que actúa como receptor de IL-15 (*p. ej.*, muteínas, análogos, fragmentos, isoformas y peptidomiméticos de estos). IL-15R α incluye longitud completa y fragmentos de esta. IL-15R α , es un receptor del factor de crecimiento de células T conocido. IL-15R α es una proteína madura de 267 aminoácidos. El término "IL-15R α ", como se usa en la presente, significa IL-15R α nativa o recombinante y muteínas, análogos, subunidades de esta o complejos de esta. Los fragmentos de IL-15R α incluyen fragmentos solubles, *p. ej.*, péptidos de sushi, como se describe en la publicación PCT n.º WO 2007/046006. Los fragmentos solubles (*p. ej.*, péptidos de sushi, como un fragmento que contiene los residuos 31-95 de IL-15R α o una variante de esta que tiene al menos 70 % (*p. ej.*, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, *p. ej.*, al menos 85 %) de identidad de secuencia en una porción de igual longitud) también incluyen muteínas, análogos, fragmentos, isoformas y peptidomiméticos de los mismos. En algunas modalidades, un fragmento soluble se une a un dominio Fc, *p. ej.*, Fc-sushi o sushi-Fc.

[0095] La secuencia de aminoácidos de IL-15R α humana (ID del gen 3601) se encuentra en Genbank bajo el localizador de acceso NP_001230468, NP_001243694, NP_002180, NP_751950 y NP_001338024. La secuencia de aminoácidos de la IL-15R α murina (*Mus musculus*) (Gen ID

16169) se encuentra en Genbank bajo el localizador de acceso NP_001258426.

[0096] IL-15R α también puede referirse a IL-15R α derivada de una variedad de especies de mamíferos, que incluyen, por ejemplo, humanos, simios, bovinos, porcinos, equinos y murinos. Una "muteína" de IL-15R α , tal como se hace referencia en la presente, es un polipéptido que tiene una

5 secuencia de aminoácidos diferente de un polipéptido de IL-15R α de mamífero nativo debido a una o más eliminaciones, inserciones y/o sustituciones de aminoácido. 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, tal

10 como Ile, Val, Leu o Ala entre sí, o sustituciones de un resto polar por otro, tal como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Se conocen bien otras sustituciones conservadoras de este tipo, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras con características de hidrofobicidad similares. Las variantes de IL-15R α de origen natural también están abarcadas por la invención. Ejemplos de tales variantes son proteínas que resultan de eventos alternativos de corte y empalme de ARNm o de la escisión

15 proteolítica de la proteína IL-15R α , donde se retiene la propiedad de unión a IL-15R α . El corte y empalme alternativo del ARNm puede producir una proteína IL-15R α 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 hospedadoras, debido a la eliminación proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de la proteína IL-15R α (generalmente de 1-10

20 aminoácidos). En algunas modalidades, el extremo de la proteína se puede modificar para alterar sus propiedades físicas, por ejemplo, con un grupo químico tal como el polietilenglicol (Yang et al. Cancer 76:687-694, 1995). En algunas modalidades, el extremo o interior de la proteína se puede modificar con aminoácidos adicionales (Clark-Lewis et al. PNAS 90:3574-3577, 1993).

[0097] Como se usa en la presente, "sitio interno de entrada al ribosoma" o "IRES" se refiere a un

25 elemento de ARN que permite el inicio de la traducción de una manera independiente del casquete 5'. En algunas modalidades, un polirribonucleótido descrito en la presente incluye uno o más elementos del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). En algunas modalidades, el IRES está unido operativamente a una o más secuencias transgénicas (*p. ej.*, cada IRES está unido operativamente a una o más secuencias de expresión). En modalidades, el IRES está ubicado entre

30 un promotor heterólogo y el extremo 5' de una secuencia codificante. Un IRES puede incluir una secuencia de ARN capaz de unirse a un ribosoma eucariótico. En algunas modalidades, el elemento IRES tiene al menos aproximadamente 5 nt, al menos aproximadamente 8 nt, al menos aproximadamente 9 nt, al menos aproximadamente 10 nt, al menos aproximadamente 15 nt, al menos aproximadamente 20 nt, al menos aproximadamente 25 nt, al menos aproximadamente 30

35 nt, al menos aproximadamente 40 nt, al menos aproximadamente 50 nt, al menos aproximadamente

100 nt, al menos aproximadamente 200 nt, al menos aproximadamente 250 nt, al menos aproximadamente 350 nt, o al menos aproximadamente 500 nt.

[0098] Tal como se usa en la presente, la frase "en una cantidad eficaz para" se refiere a una cantidad que induce un resultado detectable (*p. ej.*, un número de células que tienen un número

5 aumentado estadísticamente significativo en relación con su población inicial, *p. ej.*, en un $p < 0,05$).

[0099] Como se usa en la presente, una "población expandida de células $\gamma\delta$ " se refiere a una población de células hematopoyéticas que incluyen células T $\gamma\delta$ que se ha cultivado en una condición y durante un tiempo que ha inducido la expansión de las células $\gamma\delta$, es decir, un mayor número de células $\gamma\delta$. Asimismo, una "población expandida de células T V δ 1", tal como se usa en

10 la presente, se refiere a una población de células hematopoyéticas que incluyen células T V δ 1 que se ha cultivado en una condición y durante un tiempo que ha inducido la expansión de las células T V δ 1, es decir, un mayor número de células V δ 1. De manera similar, una "población expandida de células T V δ 2", tal como se usa en la presente, se refiere a una población de células hematopoyéticas que incluyen células T V δ 2 que se ha cultivado en una condición y durante un

15 tiempo que ha inducido la expansión de las células T V δ 2, es decir, un mayor número de células V δ 2.

[0100] El término "marcador" e en la presente hace referencia a un marcador molecular basado en ADN, ARN, proteína, carbohidrato, glicolípido o células cuya expresión o presencia en la muestra de un paciente puede ser detectada por métodos estándar (o métodos descritos en la presente).

20 [0101] Una célula o población de células que "expresa" un marcador de interés es aquella en la que se determina que el ARNm que codifica la proteína, o la propia proteína, incluidos fragmentos de esta, está presente en la célula o la población. La expresión de un marcador puede detectarse por diversos medios. Por ejemplo, en algunas modalidades, la expresión de un marcador se refiere a una densidad superficial del marcador en una célula. La intensidad de fluorescencia media (MFI),

25 por ejemplo, tal como se utiliza como lectura de citometría de flujo, es representativa de la densidad de un marcador en una población de células. Un experto en la técnica comprenderá que los valores de MFI dependen de los parámetros de tinción (*p. ej.*, concentración, duración y temperatura) y la composición del fluorocromo. Sin embargo, la MFI puede ser cuantitativa cuando se considera en el contexto de los controles apropiados. Por ejemplo, se puede decir que una población de células

30 expresa un marcador si la MFI de un anticuerpo respecto a ese marcador es significativamente más alta que la MFI de un anticuerpo de control de isotipo apropiado en la misma población de células, teñidas en condiciones equivalentes. De manera adicional, o alternativa, se puede decir que una población de células expresa un marcador célula por célula mediante el uso de una puerta positiva y negativa de acuerdo con los métodos analíticos de citometría de flujo convencionales (*p. ej.*,

35 mediante el ajuste de la puerta de acuerdo con los controles de isotipo o "fluorescencia-menos-uno"

(FMO)). Mediante esta métrica, se puede decir que una población "expresa" un marcador si el número de células positivas detectadas para el marcador es significativamente mayor que el fondo (*p. ej.*, al regular un control de isotipo).

[0102] Como se usa en la presente, "expresión funcional de un receptor de entrada de VSV-G" se refiere a un nivel de expresión del receptor de entrada de VSV-G suficiente para mediar la entrada de VSV-G detectable en al menos 5 % de la población objetivo de células, medida mediante un ensayo basado en beta-lactamasa-Vpr (BlaM-VpR). Ver, *p. ej.*, Cavois et al., Nat Biotechnol. 11:1151-1154, 2002. Por el contrario, en una población de células que "carece de la expresión funcional de un receptor de entrada de VSV-G", más del 95 % de la población celular carece del nivel suficiente de expresión del receptor de entrada de VSV-G para mediar la entrada detectable de VSV-G, según lo medido mediante un ensayo basado en BlaM-VpR.

[0103] Tal como se usa en la presente, cuando la expresión de una población se expresa como un porcentaje de células positivas y ese porcentaje se compara con un porcentaje correspondiente de células positivas de una población de referencia, la diferencia porcentual es un porcentaje de la población original de cada población respectiva. Por ejemplo, si un marcador se expresa en el 10 % de las células de la población A, y el mismo marcador se expresa en 1 % de las células de la población B, entonces se dice que la población A tiene un 9 % de mayor frecuencia de células positivas para marcadores que la población B (es decir, $10\% - 1\%$, no $10\% \div 1\%$). Cuando una frecuencia se multiplica por el número de células en la población original, se calcula la diferencia en el número absoluto de células. En el ejemplo anterior, si hay 100 células en la población A y 10 células en la población B, entonces la población A tiene 100 veces el número de células en relación con la población B, es decir, $(10\% \times 100) \div (1\% \times 10)$.

[0104] Un nivel de expresión de un marcador puede ser un nivel de expresión de ácido nucleico (*p. ej.*, un nivel de expresión de ADN o un nivel de expresión de ARN, *p. ej.*, un nivel de expresión de ARNm). Se puede utilizar cualquier método adecuado para determinar un nivel de expresión de ácido nucleico. En algunas modalidades, el nivel de expresión de ácido nucleico se determina mediante el uso de qPCR, rtPCR, ARN-seq, múltiplex qPCR o RT-qPCR, análisis de micromatrices, análisis en serie de la expresión génica (SAGE), técnica MASSARRAY®, hibridación in situ (*p. ej.*, FISH), o combinaciones de estos.

[0105] Tal como se usa en la presente, una "población de referencia" de células se refiere a una población de células correspondiente a las células de interés, frente a las cuales se mide un fenotipo de las células de interés. Por ejemplo, un nivel de expresión de un marcador en una población separada de células y/o derivadas de tejido no hematopoyético se puede comparar con el nivel de expresión del mismo marcador en una célula T y/o derivado de tejido hematopoyético (*p. ej.*, una célula y/o residente en la sangre, *p. ej.*, una célula y/o residente en la sangre derivada del mismo

donante o de un donante diferente) o una célula T $\gamma\delta$ derivado de tejido no hematopoyético expandido en diferentes condiciones (*p. ej.*, en presencia de una activación sustancial de TCR, en presencia de un agente de activación de TCR exógeno (*p. ej.*, anti-CD3), o en contacto sustancial con células estromales (*p. ej.*, fibroblastos)). Una población también se puede comparar consigo misma en un estado anterior. Por ejemplo, una población de referencia puede ser una población celular separada antes de su expansión. En este caso, la población expandida se compara con su propia composición antes de la etapa de expansión, es decir, su composición pasada, en este caso, es la población de referencia.

[0106] Como se usa en la presente, el término "receptor de antígeno quimérico" o, de manera alternativa, un "CAR" se refiere a una construcción de polipéptidos recombinante que incluye un dominio de unión al antígeno extracelular, un dominio transmembrana y, opcionalmente, un dominio intracelular que propaga una señal de activación que activa la célula y/o una señal coestimuladora. En algunas modalidades, el CAR incluye una secuencia líder opcional en el extremo N de la proteína de fusión CAR. En algunas modalidades, CAR carece de un dominio intracelular (*p. ej.*, de señalización).

[0107] Los términos "unir" o "unido", tal como se utilizan en la presente, se refieren a un polipéptido que, cuando está presente, une los dos o más polipéptidos (*p. ej.*, una IL-15R α o un fragmento de esta (*p. ej.*, un dominio sushi) e IL-15 o una variante de esta). En general, una unión puede ser de aproximadamente, *p. ej.*, 1 a 100 (*p. ej.*, 5 a 50, 5 a 30, 5 a 20, *p. ej.*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, o 100) aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, la unión es muy flexible y puede ser rica en residuos de glicina (G) y/o serina (S), que pueden estar presentes en forma de repeticiones GS. En algunas modalidades, una unión puede unir un extremo C de una primera proteína con un extremo N de una segunda proteína. En otras modalidades, una unión puede unir un extremo C de la segunda proteína a un extremo N de la primera proteína.

[0108] Como se usa en la presente, el término "porcentaje (%) de identidad" se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos de una secuencia candidata, *p. ej.*, una variante de IL-15R β , que son idénticos a los residuos de aminoácidos de una secuencia de referencia, *p. ej.*, un polipéptido IL-15R β sin mutaciones, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad (es decir, los espacios se pueden introducir en una o ambas secuencias candidatas y de referencia para una alineación óptima y secuencias no homólogas pueden descartarse a efectos de comparación). La alineación a efectos de determinar el porcentaje de identidad puede lograrse de diversas maneras conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, con software informático disponible al público, tal como el software BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la

alineación, lo que incluye cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se comparan. En algunas modalidades, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia candidata dada a, con o contra una secuencia de referencia dada (que alternativamente puede expresarse como una secuencia candidata dada que tiene o incluye un cierto porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos a, con , o contra una secuencia de referencia dada) se calcula de la siguiente manera:

[0109] $100 \times (\text{fracción de } A/B)$

[0110] donde A es el número de residuos de aminoácidos puntuados como idénticos en el alineamiento de la secuencia candidata y la secuencia de referencia, y donde B es el número total de residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia. En algunas modalidades donde la longitud de la secuencia candidata no es igual a la longitud de la secuencia de referencia, el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de la secuencia candidata con la secuencia de referencia no sería igual al porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de referencia con la secuencia candidata.

[0111] Como se usa en el presente documento, un "péptido 2A" se refiere a una clase de péptidos de 18-22 aminoácidos de longitud que comparten un motivo de secuencia principal de DxExNPGP, donde X es cualquier aminoácido. El péptido 2A puede ser un péptido 2A del virus de la fiebre aftosa 18 (F2A), un péptido 2A del virus A de la rinitis equina (E2A), un péptido 2A del teschovirus-1 porcino (P2A) o un péptido 2A del virus thosa asigna (T2A).

[0112] Una "respuesta inmune" es como se entiende en la técnica, y generalmente se refiere a una respuesta biológica dentro de un vertebrado contra agentes extraños o anormales, *p. ej.*, células cancerosas, cuya respuesta protege al organismo contra estos agentes y enfermedades causadas por ellos. Una respuesta inmunitaria está mediada por la acción de una o más células del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, linfocito citolíticos (NK), macrófagos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas o neutrófilos) y macromoléculas solubles producidas por cualquiera de estas células o el hígado (incluidos los anticuerpos, las citoquinas y el complemento) que resulta en la selección, unión, daño, destrucción y/o eliminación selectivas del cuerpo del vertebrado de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas u otras células anormales o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales. Una reacción inmunitaria incluye, *p. ej.*, la activación o inhibición de una célula T, *p. ej.*, una célula T efectora, una célula Th, una célula CD4+, una célula T CD8+ o una célula Treg, o la activación o inhibición de cualquier otra célula del sistema inmunitario, *p. ej.*, célula NK.

[0113] "Inmunoterapia" se refiere al tratamiento de un sujeto afectado por o en riesgo de contraer o padecer una recurrencia de una enfermedad mediante un método que comprende inducir, potenciar, suprimir o modificar de otro modo el sistema inmunitario o una respuesta inmunitaria.

[0114] Como se usa en la presente, los términos "tratar", "tratamiento" o "tratamiento de" cuando se usan en el contexto del tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto, *p. ej.*, un cáncer, se refieren a reducir la patología de la enfermedad, reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad, promover mayores tasas de supervivencia y/o reducir el malestar. Por ejemplo, tratar puede referirse a la capacidad de una terapia cuando se administra a un sujeto, para reducir uno o más síntomas, signos o causas de una enfermedad. Tratar también se refiere a mitigar o disminuir uno o más síntomas clínicos y/o inhibición o retraso en la progresión de la afección y/o prevención o retraso en la aparición de una enfermedad o dolencia.

[0115] Como se usa en la presente, "cáncer" refiere a un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo. La división celular no regulada puede generar la formación de tumores o células malignos que invaden tejidos vecinos y pueden formar metástasis en partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo.

[0116] Como se usa en la presente, el término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia terapéutica administrada, tal como una célula inmunitaria que comprende un polinucleótido que codifica un CAR, es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito específico o deseado tales como tratamiento del cáncer. Una "cantidad efectiva" se puede determinar empíricamente de manera rutinaria en relación con el propósito declarado.

[0117] Tal como se usa en la presente, los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" hacen referencia a cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el cual es deseable el diagnóstico, el pronóstico o la terapia. Los sujetos mamíferos incluyen, por ejemplo, humanos, primates no humanos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, vacas, osos, etc.

[0118] Como se usa en la presente, los términos "ug" y "uM" se usan indistintamente con "μg" y "μM", respectivamente.

[0119] Diversos aspectos descritos en la presente se describen en más detalle en las subsecciones que siguen a continuación.

II. Células T γδ modificadas

II.A. Células T γδ que expresan IL-15Rβ

[0120] La invención presenta células T γδ modificadas que expresan una IL-15Rβ recombinante. Dichas células modificadas proporcionan una mayor capacidad de respuesta a IL-15, incluso sin expresión adicional de componentes adicionales del complejo del receptor de IL15. En algunas modalidades, la célula T γδ carece de un gen endógeno que codifica IL-15. Dicha célula modificada exhibe una mayor sensibilidad a la IL-15 exógena para la señalización.

[0121] En otra modalidad, se describe en la presente una célula T γδ que expresa una IL-15Rβ recombinante y una IL-15 recombinante o una variante de estas. En algunas modalidades, la IL-15

recombinante es una IL-15 secretada o una variante de esta o una IL-15 unida o una variante de esta. Dicha célula modificada exhibe una señal continua de IL-15 y no depende de la IL-15 exógena para la señalización.

[0122] En algunas modalidades, la célula T $\gamma\delta$ que expresa una IL-15R β recombinante expresa adicionalmente una IL-15R α recombinante o un fragmento de estas (*p. ej.*, un fragmento soluble, tal como un dominio sushi). La IL-15R α o un fragmento de esta puede unirse a una IL-15 o variante de esta. En algunas modalidades, un extremo C de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo N de la IL-15 o una variante de esta. En algunas modalidades, un extremo N de la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a un extremo C de la IL-15 o una variante de esta. Dicha célula modificada aumenta además la capacidad de respuesta como se muestra en la presente.

[0123] Los diversos transgenes expresados descritos en la presente pueden expresarse en tándem, *p. ej.*, en una sola construcción. Por ejemplo, en algunas modalidades, la IL-15R β y la IL-15R α o fragmento de estas se expresan en tándem. En algunas modalidades, la IL-15R β y la IL-15 o variante de estas se expresan en tándem. En algunas modalidades, la IL-15R β y la IL-15R α o fragmento de estas se expresan en tándem. En algunas modalidades, la IL-15R β , la IL-15 o variante de esta y la IL-15R α recombinante o fragmento de estas se expresan en tándem.

[0124] Uno o más transgenes pueden incluir un enlazador entre ellos. La IL-15R β y la IL-15R α o fragmento de estas pueden incluir un enlazador entre ellas. El enlazador puede incluir un péptido escindible. El péptido escindible puede ser, por ejemplo, un péptido autoescindible, tal como un péptido 2A. En algunas modalidades, el péptido 2A es un péptido 2A del virus de la fiebre aftosa 18 (F2A), un péptido 2A del virus A de la rinitis equina (E2A), un péptido 2A del teschovirus-1 porcino (P2A) o un péptido 2A del virus thosa asigna (T2A). La IL-15R β y la IL-15 o variante de estas pueden incluir un enlazador entre ellas. El enlazador puede incluir un péptido escindible. El péptido escindible puede ser, por ejemplo, un péptido autoescindible, tal como un péptido 2A. En algunas modalidades, el péptido 2A es un péptido F2A, un péptido E2A, un péptido P2A o un péptido T2A. Los péptidos 2A, que se utilizan para unir dos o más transgenes y permitir que el polipéptido traducido se autoescinda en cadenas polipeptídicas individuales (*p. ej.*, IL-15R β e IL-15R α). Por lo tanto, en algunas modalidades, el transgén codifica un péptido 2A entre el primer y el segundo transgén, opcionalmente con un enlazador flexible que flanquea el péptido 2A (*p. ej.*, enlazador GSG). El transgén puede incluir además una o más secuencias de escisión modificadas, *p. ej.*, una secuencia de escisión de furina para eliminar los residuos del péptido 2A unidos al péptido. Los péptidos 2A de ejemplo se describen, *p. ej.*, en Chng et al. MABs 7: 403-412, 2015, y Lin et al. Front. Plant Sci. 9:1379, 2018, cuyas descripciones se incorporan en su totalidad mediante esta referencia.

[0125] En algunas modalidades, la IL-15R α o un fragmento de esta está unido a la IL-15 o una variante de esta. La unión puede ser un enlazador peptídico de cualquier largo apropiado, *p. ej.*, que

tiene de 1 a 100 (*p. ej.*, 5 a 50, 5 a 30, 5 a 20, *p. ej.*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, o 100) residuos de aminoácido. El enlazador puede ser un enlazador flexible, *p. ej.*, que contiene una o más glicinas o serinas.

[0126] En la Tabla 1 se muestran ejemplos de proteínas de blindaje.

5 Tabla 1: Proteínas de blindaje

Proteína de blindaje	Secuencia
IL-2R β	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCE LLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPF ENLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWE EAPLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFR TKPAALGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTP DPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSPPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVT QLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDP YSEEDPDEGVAGAPTGSSPQLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGG PSPPTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTPGVPDLVDFQ PPPELVREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAY LSLQELQGQDPHTLV (SEQ ID NO: 1)
IL-15	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINTS (SEQ ID NO: 2)
IL-15R α	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATN VAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASS PSSNNTAATTAIVPGSQLMPSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWEL TASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLKSQRQTPPLA SVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLNCSHHL (SEQ ID NO: 3)
Enlazador P2A	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 4)
Enlazador T2A	GSGEGRGSLLTCDGVEENPGP (SEQ ID NO: 5)
Enlazador Gly-Ser	GGGGS (SEQ ID NO: 6)
Enlazador	GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 7)

Gly-Ser	
Enlazador Gly-Ser	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 8)
Enlazador Gly-Ser	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 9)
Enlazador Gly-Ser	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 10)
Enlazador Gly-Ser	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11)
Enlazador Gly-Ser	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12)
Enlazador Gly-Ser	GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13)

[0127] En algunos aspectos, el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de péptido señal.

[0128] En algunos aspectos el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de péptido señal.

[0129] En algunos aspectos, el polipéptido IL-15R α está unido al polipéptido IL-15 mediante un enlazador. Por ejemplo, en donde el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97

%, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3 y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente

5 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de

10 aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, el enlazador comprende uno o más enlaces peptídicos. En algunos aspectos, el enlazador comprende un enlazador peptídico. En algunos aspectos, el enlazador peptídico es un enlazador flexible. En algunos aspectos, el enlazador es un enlazador rígido. En algunos aspectos, el enlazador es un enlazador escindible. En algunos aspectos, el enlazador es un enlazador Gly-Ser. En algunos aspectos, el enlazador comprende una

15 o más repeticiones de la secuencia GGGS, GGGS (SEQ ID NO: 6), o una combinación de estas. En algunos aspectos, el polipéptido IL-15R α está unido al polipéptido IL-15 mediante un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, el polipéptido IL-15R α está unido al polipéptido IL-15 por un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8. En algunos aspectos, el polipéptido IL-15R α está

20 unido al polipéptido IL-15 por un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 9. En algunos aspectos, el polipéptido IL-15R α está unido al polipéptido IL-15 mediante un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, el polipéptido IL-15R α está unido al polipéptido IL-15 mediante un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 11. En algunos

25 aspectos, el polipéptido IL-15R α está unido al polipéptido IL-15 mediante un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, el polipéptido IL-15R α está unido al polipéptido IL-15 mediante un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 13.

[0130] En algunos aspectos, la construcción que comprende el polipéptido IL-15R α está unida al

30 polipéptido IL-15 y está dispuesta del extremo N al extremo C de acuerdo con el siguiente orden: (i) extremo N, (ii) el polipéptido IL-15, (iii) un enlazador peptídico descrito en la presente (*p. ej.*, un polipéptido que comprende GGGS, GGGS (SEQ ID NO: 6), o una combinación de estas; (iv) el polipéptido IL-15R α ; (v) extremo C. En algunos aspectos, la construcción que comprende el polipéptido IL-15R α está unida al polipéptido IL-15 y está dispuesta del extremo N al extremo C de

35 acuerdo con el siguiente orden: (i) extremo N, (ii) un polipéptido IL-15 que comprende la secuencia

de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2, (iii) un enlazador peptídico descrito en la presente (*p. ej.*, un polipéptido que comprende GGGS, GGGS (SEQ ID NO: 6), o una combinación de estas; (iv) un polipéptido IL-15R α que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; (v) extremo C.

- 5 [0131] En algunos aspectos, la proteína de blindaje se expresa como un único polipéptido. En algunos aspectos, la proteína de blindaje se expresa como un único polipéptido que comprende (i) un polipéptido IL-2R β ; (ii) un enlazador; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15. En algunos aspectos, la proteína de blindaje se expresa como un único polipéptido que comprende (i) un polipéptido IL-2R β ; (ii) un enlazador escindible; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15. En algunos aspectos, el enlazador escindible comprende una secuencia P2A. En algunos aspectos el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, la proteína de blindaje se expresa como un polipéptido único que comprende (i) un polipéptido IL-2R β ; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15.

- [0132] En algunos aspectos, la proteína blindada se expresa como un único polipéptido que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99

% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0133] En algunos aspectos, la proteína de blindaje se expresa como un único polipéptido que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

II.B. células T $\gamma\delta$

[0134] Las células T $\gamma\delta$ representan un subconjunto de células T que expresan en su superficie un receptor de células T (TCR) $\gamma\delta$ distintivo y definitorio. Este TCR está formado por una cadena gamma (γ) y una cadena delta (δ). Las células T $\gamma\delta$ humanas pueden clasificarse ampliamente en uno o dos tipos— células T $\gamma\delta$ residentes en sangre periférica y células T $\gamma\delta$ residentes en tejidos no hematopoyéticos. La mayoría de las células T $\gamma\delta$ residentes en sangre expresan un TCR V δ 2, mientras que esto es menos común entre las células T $\gamma\delta$ residentes en tejidos, que usan con mayor frecuencia V δ 1 y/u otras cadenas V δ . La invención proporciona células T $\gamma\delta$ que se transducen con un vector viral que codifica un transgén deseado tal como se describe en la presente.

[0135] En algunas modalidades, las células T $\gamma\delta$ adecuadas para usar como fuente de las células T $\gamma\delta$ modificadas descritas en la presente incluyen células V δ 1, células V δ 2, células V δ 3, células V δ 5 y células V δ 8. En algunas modalidades, la población de células T $\gamma\delta$ modificadas deriva de una población de células V δ 1 o células V δ 2. En algunos casos, la población de células T $\gamma\delta$ modificadas deriva de una población de células T no V δ 1/V δ 2. En algunos casos, la población de células T $\gamma\delta$ modificadas deriva de una población mixta de células V δ 1 y células V δ 2.

[0136] Las células T $\gamma\delta$ descritas en la presente (*p. ej.*, células T $\gamma\delta$ endógenas o células T $\gamma\delta$ cebadas) pueden carecer de un receptor de entrada de glicoproteína G del virus del estoma vesicular (VSV-G) (*p. ej.*, LDL). La célula T $\gamma\delta$ (por ejemplo, células T $\gamma\delta$ endógenas o células T $\gamma\delta$ cebadas) puede expresar ASCT-1 y/o ASCT-2. La expresión de ASCT-1 y/o ASCT-2 puede permitir la transducción con un vector pseudotipado betaretroviral (*p. ej.*, BaEV y RD114). La falta de expresión de VSV-G puede impedir la transducción con un vector pseudotipado de VSV-G.

[0137] En un aspecto, la invención proporciona una población de células T $\gamma\delta$ modificadas para

expresar uno o más transgenes, que pueden codificar una proteína unida a la membrana (*p. ej.*, un receptor de superficie celular, tal como un receptor de antígeno quimérico (CAR), un TCR $\alpha\beta$, un receptor de citotoxicidad natural (*p. ej.*, NKp30, NKp44 o NKp46), un receptor de citocinas (*p. ej.*, receptor IL-12), un receptor de quimiocinas (*p. ej.*, receptor CCR2), y/o un ligando o citocina unido a la membrana (*p. ej.*, IL-15 unido a la membrana, IL-7 unido a la membrana, CD40L unido a la membrana, 4-1BB unido a la membrana, 4-1BBL unido a la membrana, CCL19 unido a la membrana), una proteína soluble (*p. ej.*, ligandos solubles o citocinas, *p. ej.*, IL-15 soluble, IL-7 soluble, IL-12 soluble, CD40L soluble, 4-1BBL soluble, y/o CCL19 soluble), un marcador seleccionable (*p. ej.*, un gen indicador) o un gen suicida. En algunos casos, la invención proporciona una población de células T $\gamma\delta$ modificadas para expresar IL-15R β , un CAR y una o más proteínas codificadas por transgén adicionales (*p. ej.*, una proteína de blindaje). En algunas modalidades, uno o más transgenes tienen codones optimizados.

[0138] En algunas modalidades, la célula T $\gamma\delta$ se transduce con un vector viral que codifica un transgén (*p. ej.*, IL-15R β y/o un CAR). En algunas modalidades, el vector viral es un vector retroviral. En algunas modalidades, el vector viral es un vector lentiviral. En algunas de tales modalidades, la célula puede expresar de forma estable el transgén. En algunas modalidades, la célula puede expresar de forma transitoria el transgén.

[0139] En un aspecto, la invención presenta una población celular (*p. ej.*, una población celular aislada) de células T $\gamma\delta$ modificadas (*p. ej.*, al menos 10, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 1010, 1011, 1012 o 1013 células), donde al menos 3 % (*p. ej.*, al menos 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, o sustancialmente la totalidad) de la población celular son células T $\gamma\delta$ modificadas que expresan un transgén (*p. ej.*, IL-15R β y/o un CAR y/o una o más proteínas adicionales).

II.C. Receptores de antígenos quiméricos (CAR)

[0140] Algunos aspectos de la presente descripción están dirigidos a una población de células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, una población de células Vd1+ $\gamma\delta$ derivadas de la sangre o la piel) que comprende células T $\gamma\delta$ que comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana. En algunos aspectos, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana (*p. ej.*, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 - 8). En algunos aspectos, las células pueden comprender además un dominio zeta 4-1BB y CD3. En otro aspecto adicional, las células se dirigen a una población de células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, una población de células Vd1+ $\gamma\delta$ derivadas de la sangre o la piel) que comprende células T $\gamma\delta$ que comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica un CAR, en donde el CAR

comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana (*p. ej.*, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 - 8), en donde las células T $\gamma\delta$ comprenden además un dominio transmembrana CD8. En todavía otro aspecto adicional, las células se dirigen a una población de células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, una población de células Vd1+ $\gamma\delta$ derivadas de la sangre o la piel) que comprende células T $\gamma\delta$ que comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana (*p. ej.*, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 - 8), en donde las células T $\gamma\delta$ comprenden además (a) IL-15R-beta o (b)(i) IL-15R-alfa unida con una IL-15 o una variante de esta e (ii) IL-15R-beta. En un aspecto adicional, las células T $\gamma\delta$ descritas en la presente comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana (*p. ej.*, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 1 - 8), puede comprender además un dominio 4-1BB y CD3 zeta y/o un dominio CD8 y (a) IL-15R-beta o (b)(i) IL-15R-alfa unida con una IL -15 o una variante de esta e (ii) IL-15R-beta.

[0141] En algunos aspectos, el dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) pesada variable (VH), una VH-CDR2, una VH-CDR3, una CDR-1 ligera variable (VL) , una VL-CDR2 y una VL-CDR3. En algunos aspectos, la VH-CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, la VH-CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, la VH-CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la VL-CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la VL-CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 18. En algunos aspectos, la VL-CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 19.

[0142] En algunos aspectos, las células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, de una población de células Vd1+ $\gamma\delta$ derivadas de la sangre o la piel) comprenden una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, y en donde CAR comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14; una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15; una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 16; una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17; una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 18; y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 19.

[0143] En algunos aspectos, las células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, de una población de células Vd1+ $\gamma\delta$ derivadas de la sangre o la piel) comprenden una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, y en donde CAR comprende (i) un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 20, (ii) un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 21, o (iii) tanto (i) como (ii).

[0144] En algunos aspectos, las células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, de una población de células Vd1+ $\gamma\delta$ derivadas de la sangre o la piel) comprenden una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, y en donde el CAR comprende (i) un VH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 20, (ii) un VL que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 21, o (iii) tanto (i) como (ii).

[0145] En algunos aspectos, el dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana comprende el dominio de unión a antígeno P4 (Tabla 2).

[0146] En algunos aspectos, el dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) pesada variable (VH), una VH-CDR2, una VH-CDR3, una CDR-1 ligera variable (VL), una VL-CDR2 y una VL-CDR3. En algunos aspectos, la VH-CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 24. En algunos aspectos, la VH-CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 23. En algunos aspectos, la VH-CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 22. En algunos aspectos, la VL-CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 25. En algunos aspectos, la VL-CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 26. En algunos aspectos, la VL-CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 27.

[0147] En algunos aspectos, las células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, de una población de células Vd1+ $\gamma\delta$ derivadas de la sangre o la piel) comprenden una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la

mesotelina humana, y en donde CAR comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22; una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 23; una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24; una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25; una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26; y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 27.

[0148] En algunos aspectos, las células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, de una población de células Vd1+ $\gamma\delta$ derivadas de la sangre o la piel) comprenden una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, y en donde CAR comprende (i) un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 28, (ii) un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 29, o (iii) tanto (i) como (ii).

[0149] En algunos aspectos, las células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, de una población de células Vd1+ $\gamma\delta$ derivadas de la sangre o la piel) comprenden una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, y en donde el CAR comprende (i) un VH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 28, (ii) un VL que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 29, o (iii) tanto (i) como (ii).

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos del dominio de unión a antígeno P4

P4	
Anti-Meso. HC-CDR1	GDSVSSNSAT (SEQ ID NO: 14)
Anti-Meso. HC-CDR2	TYYRSKWYN (SEQ ID NO: 15)

Anti-Meso. HC-CDR3	ARGMMTTYYYGMDV (SEQ ID NO: 16)
Anti-Meso. LC-CDR1	SGINVGPYR (SEQ ID NO: 17)
Anti-Meso. LC-CDR2	YKSDSDK (SEQ ID NO: 18)
Anti-Meso. LC-CDR3	MIWHSSAAV (SEQ ID NO: 19)
Anti-Meso. VH	QVQLQQSGPGLVTPSQTLSLTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRGLEWLG RTYYRSKWYNDYAVSVKSRMSINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARG MMTTYYYGMDVWGQGTTVTVSSGILGS (SEQ ID NO: 20)
Anti-Meso. VL	QPVLTQSSSLASPGASASLTCTLRSGINVGPYRIYWYQQKPGSPPQYLLNY KSDSDKQQGSGVPSRFGSGSKDASANAGVLLISGLRSEDEADYYCMIWHSSA AVFGGGTQLTVLS (SEQ ID NO: 21)
YP218	
Anti-Meso. HC-CDR1	FYFYAC (SEQ ID NO: 22)
Anti-Meso. HC-CDR2	CIYTAGSGSTYYASWAKG (SEQ ID NO: 23)
Anti-Meso. HC-CDR3	TANTRSTYYLNLW (SEQ ID NO: 24)
Anti-Meso. LC-CDR1	ASQRISSYLS (SEQ ID NO: 25)
Anti-Meso. LC-CDR2	GASTLAS (SEQ ID NO: 26)
Anti-Meso. LC-CDR3	SYAYFDSNNWHAF (SEQ ID NO: 27)
Anti-Meso. VH	MEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLGFYFYACWVRQAPGKGLEWV SCIYTAGSGSTYYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS TANTRSTYYLNLWGQGTLLVTV (SEQ ID NO: 28)
Anti-Meso. VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQRISSYLSWYQQKPGKVPKLLIYGAST LASGVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDVATYYCQSYAYFDSNNWHAFGG GTKVEI (SEQ ID NO: 29)

[0150] En algunos aspectos, el CAR comprende además una región bisagra entre el dominio de unión a antígeno y el dominio transmembrana. En algunos aspectos, la bisagra se deriva de una inmunoglobulina (*p. ej.*, se deriva de regiones bisagra o regiones de bucle). En determinados aspectos, estas bisagras comprenden, *p. ej.*, regiones bisagra IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE o IgM, fragmentos de estas (solos o protegidos por secuencias adicionales, *p. ej.*, secuencias de regiones CH1 o CH2), o combinaciones de fragmentos de regiones bisagra IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE o IgM. En algunos aspectos, las bisagras comprenden, *p. ej.*, regiones de bucle de dominio constante de IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE o IgM, fragmentos de estos (solos o protegidos por secuencias adicionales, *p. ej.*, de cadenas β adyacentes), o combinaciones de fragmentos de las regiones de bucle IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE o IgM. En algunos aspectos, la bisagra de la presente descripción comprende secuencias derivadas de la región bisagra, secuencias derivadas de la región bucle o combinaciones de estas.

[0151] En algunos aspectos, la región bisagra se selecciona de una bisagra CD8, una bisagra CD28 y una bisagra de inmunoglobulina. En algunos aspectos, la bisagra comprende una bisagra CD28.

En algunos aspectos el CAR comprende una bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 30 (Tabla 3). En algunos aspectos, el CAR comprende una bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 30.

Tabla 3: Secuencias de CAR

Elemento	Secuencia de aminoácidos
Región bisagra (CD28)	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP (SEQ ID NO: 30)
Dominio TM (CD28)	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 31)
Región bisagra (CD8)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL (SEQ ID NO: 32)
Dominio TM (CD8)	DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 33)
Costim. Región (4-1BB)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 34)

Dominio de señalización intracelular (CD3z)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 35)
---	--

[0152] En consecuencia, en algunos aspectos, la presente descripción proporciona un CAR (o un polinucleótido que codifica un CAR), en donde el CAR comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina (*p.ej.*, scFv anti-mesotelina), (ii) una región bisagra que comprende la región bisagra de CD28, (iii) un dominio transmembrana y (iv) un dominio intracelular.

5 En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un CAR (o un polinucleótido que codifica un CAR), en donde el CAR comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina (*p.ej.*, scFv anti-mesotelina), (ii) una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 30, (iii) un dominio transmembrana y (iv) un dominio intracelular.

10 [0153] En algunos aspectos, la bisagra comprende una bisagra CD8. En algunos aspectos el CAR comprende una bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % , al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32 (Tabla 3). En algunos aspectos, el CAR comprende una bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32.

[0154] En consecuencia, en algunos aspectos, la presente descripción proporciona un CAR (o un polinucleótido que codifica un CAR), en donde el CAR comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina (*p.ej.*, scFv anti-mesotelina), (ii) una región bisagra que comprende la región bisagra de CD8, (iii) un dominio transmembrana y (iv) un dominio intracelular. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un CAR (o un polinucleótido que codifica un CAR), en donde el CAR comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina (*p.ej.*, scFv anti-mesotelina), (ii) una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 32, (iii) un dominio transmembrana y (iv) un dominio intracelular.

[0155] En algunos aspectos, el CAR comprende además un dominio transmembrana. El dominio transmembrana puede provenir de una fuente natural o recombinante. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. En algunos aspectos, el dominio transmembrana es capaz de enviar señales al dominio o dominios intracelulares siempre que el CAR de la presente descripción se haya unido a una diana.

[0156] En algunos aspectos, un dominio transmembrana puede incluir al menos la(s) región(es) transmembrana(s) de, *p. ej.*, CD8, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D, NKG2C o CD19.

[0157] En algunos aspectos, el dominio TM se deriva de CD8, CD2, CD4, CD28, CD45, PD1, CD152 o cualquier combinación de estos. En algunos aspectos, el dominio TM se deriva de CD28. En algunos aspectos, el dominio TM comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 31. En determinados aspectos, el dominio TM comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 31.

[0158] En consecuencia, en algunos aspectos, la presente descripción proporciona un CAR (o un polinucleótido que codifica un CAR), en donde el CAR comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina (*p. ej.*, scFv anti-mesotelina), (ii) una región bisagra, (iii) un dominio transmembrana CD28 y (iv) un dominio intracelular. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un CAR (o un polinucleótido que codifica un CAR), en donde el CAR comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina (*p. ej.*, scFv anti-mesotelina), (ii) una región bisagra, (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 31 y (iv) un dominio intracelular.

[0159] En algunos aspectos, el dominio TM se deriva de CD8. En algunos aspectos, el dominio TM comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 33. En determinados aspectos, el dominio TM comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33.

[0160] En consecuencia, en algunos aspectos, la presente descripción proporciona un CAR (o un polinucleótido que codifica un CAR), en donde el CAR comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina (*p. ej.*, scFv anti-mesotelina), (ii) una región bisagra, (iii)

un dominio transmembrana CD8 y (iv) un dominio intracelular. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un CAR (o un polinucleótido que codifica un CAR), en donde el CAR comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina (*p.ej.*, scFv anti-mesotelina), (ii) una región bisagra, (iii) un dominio transmembrana que comprende la

[0161] En algunos aspectos, el CAR comprende además un dominio coestimulador. En algunos aspectos, el dominio coestimulador comprende un dominio coestimulador de 4-1BB/CD137, receptor de interleucina-2 (IL-2R), receptor de interleucina-12 (IL-12R), IL-7, IL-21, IL-23, IL-15, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD27, CD28, CD30, CD40, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1), LIGHT, NKG2C, OX40, DAP10, B7-H3, CD28 eliminado para unión a Lck (ICA), BTLA, GITR, HVEM, LFA-1, LIGHT, NKG2C, PD-1, TILR2, TILR4, TILR7, TILR9, cadena gamma del receptor Fc, cadena ϵ del receptor Fc, un ligando que específicamente se une con CD83, o cualquier combinación de estos. En algunos aspectos, el CAR comprende un dominio coestimulador 4-1BB.

[0162] En algunos aspectos, el dominio coestimulador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34. En determinados aspectos, el dominio coestimulador comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34.

[0163] En consecuencia, en algunos aspectos, la presente descripción proporciona un CAR (o un polinucleótido que codifica un CAR), en donde el CAR comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina (*p.ej.*, scFv anti-mesotelina), (ii) una región bisagra, (iii) un dominio transmembrana, (iv) un dominio coestimulador y (v) un dominio de señalización intracelular. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un CAR (o un polinucleótido que codifica un CAR), en donde el CAR comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina (*p.ej.*, scFv anti-mesotelina), (ii) una región bisagra, (iii) un dominio transmembrana, (vi) un dominio coestimulador 4-1BB y (v) un dominio de señalización intracelular. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un CAR (o un polinucleótido que codifica un CAR), en donde el CAR comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina (*p.ej.*, scFv anti-mesotelina), (ii) una región bisagra, (iii) un dominio transmembrana, (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 34 y (v) un dominio de señalización intracelular.

[0164] En algunos aspectos, CAR comprende además un dominio de señalización intracelular. En algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de activación de

CD3 ζ , un dominio de activación de CD3 δ , un dominio de activación de CD3 ϵ , un dominio de activación de CD3 η , un dominio de activación de CD79A, un dominio de activación de DAP 12, un dominio de activación de FCER1G, un dominio de activación de DAP10/CD28, un dominio de activación de ZAP70, o cualquier combinación de estos. En algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de activación de CD3 ζ .

[0165] En algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 35. En determinados aspectos, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35.

[0166] En consecuencia, en algunos aspectos, la presente descripción proporciona un CAR (o un polinucleótido que codifica un CAR), en donde el CAR comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina (*p.ej.*, scFv anti-mesotelina), (ii) una región bisagra, (iii) un dominio transmembrana, (vi) un dominio estimulador y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de activación de CD3 ζ . En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un CAR (o un polinucleótido que codifica un CAR), en donde el CAR comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina (*p.ej.*, scFv anti-mesotelina), (ii) una región bisagra, (iii) un dominio transmembrana, (iv) un dominio coestimulador y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 35.

II.D. Células T CAR- $\gamma\delta$ blindadas

[0167] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (*p. ej.*, una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH- CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 16, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 18 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 19; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID

NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 31;

5 (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

10 aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos

15 aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada no comprende un polipéptido IL-15R α o un polipéptido IL-15.

20 [0168] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:14, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, una VH-CDR3 que comprende la

25 secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 16, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 17, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 18 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 19; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos

30 aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos

35 aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la

secuencia establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la

5 secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % identidad de secuencia con la

10 secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de

15 aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de

20 secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97

25 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96

30 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0169] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina

35 humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH que comprende la secuencia

de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 20 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

5 al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 21; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente

10 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99

15 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de

20 señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos

25 que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende

30 una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en

35 SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-

15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0170] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 16, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 18 y una VL-CDR3 que comprende la secuencias de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 19; (ii) una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α anclado a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0171] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 20, y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 21; (ii) una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos

establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2

[0172] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH- CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 16 , una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 18 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 19; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un

polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada no comprende un polipéptido IL-15R α o un polipéptido IL-15.

[0173] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 16, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 18 y una VL-CDR3 que comprende el conjunto de secuencias de aminoácidos adelante en SEQ ID NO: 19; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 98 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor del 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 98 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor del 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína blindada, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente

97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor del 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α anclado a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor del 70%, al menos alrededor del 75%, al menos alrededor del 80%, al menos alrededor del 85%, al menos alrededor del 90%, al menos alrededor del 95%, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en el que el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor del 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0174] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 20 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 21; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio

coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0175] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14, una VH-CDR2 que comprende la

secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 16, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 18 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 19; (ii) una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α anclado a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0176] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 20, y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 21; (ii) una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0177] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH- CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 23, una VH-CDR3 que comprende la

secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 27; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada no comprende un polipéptido IL-15R α o un polipéptido IL-15.

[0178] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 23, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO : 24, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26 y una VL-CDR3 que comprende el

conjunto de secuencias de aminoácidos adelante en SEQ ID NO: 27; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 98 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor del 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 98 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor del 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína blindada, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor del 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α anclado a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor del 70%, al menos alrededor del 75%, al menos alrededor del 80%, al menos alrededor del 85%, al menos alrededor del 90%, al menos alrededor del 95%, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en el que el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos al menos alrededor del

96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor del 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0179] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina

5 humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 28 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene
10 al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 29; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente
15 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99
20 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de
25 señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos
30 que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende
35 una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos

aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0180] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 23, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 27; (ii) una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α anclado a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0181] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 28, y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 29; (ii) una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0182] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH- CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 23, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 27; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la

secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada no comprende un polipéptido IL-15R α o un polipéptido IL-15.

[0183] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 23, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO : 24, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26 y una VL-CDR3 que comprende el conjunto de secuencias de aminoácidos adelante en SEQ ID NO: 27; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 98 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor del 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 98 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor del 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99

% identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína blindada, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor del 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α anclado a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor del 70%, al menos alrededor del 75%, al menos alrededor del 80%, al menos alrededor del 85%, al menos alrededor del 90%, al menos alrededor del 95%, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en el que el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 % o al menos alrededor del 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0184] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 28 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 29; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos

aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con

la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0185] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 23, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 27; (ii) una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α anclado a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0186] En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada (p. ej., una célula Vd1+) comprende (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 28, y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 29; (ii) una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

III. Métodos de transducción

[0187] En un aspecto, la invención proporciona un método para producir una población de células T $\gamma\delta$ modificadas mediante la transducción de una población de células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, células T V δ 1, células T V δ 2, y/o células T no V δ 1/V δ 2) con un polinucleótido, *p. ej.*, un vector viral, *p. ej.*, vector retroviral. El método incluye proporcionar una población de células T $\gamma\delta$ y transducir la población de células T $\gamma\delta$ con un polinucleótido que codifica la IL-15R β , produciendo así la población de células T $\gamma\delta$ que expresan la IL-15R β recombinante. El método puede incluir además la transducción de la población inicial de células T $\gamma\delta$ con un polinucleótido que codifica una subunidad α del receptor de IL-15 o un fragmento de esta. En otras modalidades, el método incluye producir una población de células T $\gamma\delta$ que expresan una IL-15R β recombinante y una IL-15 o una variante de esta. El método incluye proporcionar una población de células T $\gamma\delta$, transducir la población de células T $\gamma\delta$ con un polinucleótido que codifica la IL-15R β y transducir la población de células T $\gamma\delta$ con un polinucleótido que codifica la IL-15 o una variante de esta, produciendo así la población de células T $\gamma\delta$ que expresan la IL-15R β recombinante y la IL-15 o una variante de esta. El método puede incluir la transducción de la población inicial de células T $\gamma\delta$ con un polinucleótido que codifica una subunidad α del receptor de IL-15 o un fragmento de esta. Los métodos descritos en la presente pueden incluir además la transducción de las células con un polinucleótido que codifica un CAR.

[0188] En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir una población de células T $\gamma\delta$ modificadas al proporcionar una población inicial de células T $\gamma\delta$, cebar las células T $\gamma\delta$ en ausencia de un vector viral, y cultivar la población de células T $\gamma\delta$ cebadas en presencia de un vector viral en una cantidad eficaz para transducir al menos 3 % (*p. ej.*, al menos 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, o sustancialmente la totalidad) de las células T $\gamma\delta$ cebadas. En algunas modalidades, la población de células T $\gamma\delta$ cebadas se cultiva en presencia de un vector viral en una cantidad eficaz para transducir al menos 5 % de las células T $\gamma\delta$ cebadas. En algunas modalidades, la población de las células T $\gamma\delta$ cebadas está cultivada en presencia de un vector viral en una cantidad eficaz para transducir al menos el 20 % de las células T $\gamma\delta$ cebadas.

[0189] Las células T $\gamma\delta$ cebadas pueden obtenerse al cultivar la población inicial de células T $\gamma\delta$ en ausencia de un vector viral. Por ejemplo, la población inicial de células T $\gamma\delta$ puede cultivarse durante un primer período de cultivo de al menos 1 hora (*p. ej.*, al menos 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días o más, *p. ej.*, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 14 días, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 14 días, de aproximadamente 1 día a

aproximadamente 14 días, de aproximadamente 2 días a aproximadamente 14 días, de aproximadamente 5 días a aproximadamente 14 días, de aproximadamente 7 días a aproximadamente 14 días, de aproximadamente 5 días a aproximadamente 10 días, de aproximadamente 5 días a aproximadamente 7 días, o de aproximadamente 7 días a aproximadamente 10 días). Cuando se obtienen las células T y δ cebadas, *p. ej.*, después del cultivo de las células en ausencia de un vector viral, las células T y δ cebadas pueden seguir cultivándose durante un segundo período de cultivo de al menos 1 día (*p. ej.*, al menos 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días o más, *p. ej.*, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 14 días, de aproximadamente 2 días a aproximadamente 14 días, de aproximadamente 5 días a aproximadamente 14 días, de aproximadamente 7 días a aproximadamente 14 días, de aproximadamente 5 días a aproximadamente 10 días, de aproximadamente 5 días a aproximadamente 7 días o de aproximadamente 7 días a aproximadamente 10 días). El segundo período de cultivo puede ser de aproximadamente 1 día a aproximadamente 14 días (*p. ej.*, de aproximadamente 3 días a aproximadamente 14 días, de aproximadamente 3 días a aproximadamente 12 días, de aproximadamente 4 días a aproximadamente 1 día, de aproximadamente 5 días a aproximadamente 10 días, o de aproximadamente 5 días a aproximadamente 7 días).

[0190] En algunas modalidades, el vector viral se cultiva con las células T y δ cebadas a una multiplicidad de infección (MOI) no superior a aproximadamente 10, *p. ej.*, no superior a aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 o 0,25. En algunas modalidades, el vector viral se cultiva con las células T y δ cebadas en una multiplicidad de infección (MOI) de no más de aproximadamente 5. En algunas modalidades, el vector viral se cultiva con las células T y δ cebadas en una multiplicidad de infección (MOI) no superior a aproximadamente 4. En algunas modalidades, el vector viral se cultiva con las células T y δ cebadas en una multiplicidad de infección (MOI) de no más de aproximadamente 3. En algunas modalidades, el vector viral se cultiva con las células T y δ cebadas en una multiplicidad de infección (MOI) de no más de aproximadamente 2. En algunas modalidades, el vector viral se cultiva con las células T y δ cebadas en una multiplicidad de infección (MOI) de no más de aproximadamente 1. En algunas modalidades, el vector viral se cultiva con las células T y δ cebadas en una multiplicidad de infección (MOI) de no más de aproximadamente 0,5. En algunas modalidades, el vector viral se cultiva con las células T y δ cebadas a una multiplicidad de infección (MOI) no superior a aproximadamente 0,25. En algunas modalidades, el vector viral se cultiva con las células T y δ cebadas a una multiplicidad de infección (MOI) de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 10 (*p. ej.*, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5).

[0191] En algunas modalidades, la transducción de células T y δ incluye el uso de un potenciador de

la transducción para potenciar la eficacia de la transducción. Los potenciadores de la transducción adecuados incluyen, *p. ej.*, Vectofusin, spermid y/o retronectin. Los métodos pueden incluir poner en contacto las células T $\gamma\delta$ con el potenciador de la transducción durante el cultivo. En algunas modalidades, el método incluye además poner en contacto las células con nevirapina. En algunas modalidades, la transducción de células T $\gamma\delta$ incluye complementar el medio de cultivo con IL-15, que puede aumentar la expresión de células T $\gamma\delta$ de ASCT-2, el receptor de entrada viral para un vector viral pseudotipado betaretroviral.

IV. Vectores virales

[0192] Las composiciones y métodos descritos en la presente incluyen el uso de vectores virales para la transducción eficiente de células T $\gamma\delta$. Los genomas virales proporcionan una rica fuente de vectores que se pueden utilizar para la entrega eficaz de genes exógenos en una célula de mamífero. Los genomas virales son vectores particularmente útiles para la administración de genes ya que los polinucleótidos contenidos dentro de tales genomas se incorporan típicamente al genoma nuclear de una célula de mamífero mediante transducción generalizada o especializada. Estos procesos ocurren como parte del ciclo de replicación viral natural y no requieren proteínas o reactivos agregados para inducir la integración génica. Ejemplos de vectores virales incluyen retrovirus (*p. ej.*, vector viral de la familia Retroviridae). Ejemplos de retrovirus son leucosis-sarcoma aviar, virus tipo C aviar, virus tipo C de mamíferos, virus tipo B, virus tipo D, oncoretrovirus, grupo HTLV-BLV, lentivirus, alfaretrovirus, betaretrovirus, gammaretrovirus, spumavirus (Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, Virology, Tercera Edición (Lippincott-Raven, Filadelfia, (1996))). Otros ejemplos son los virus de la leucemia murina (MLV), virus del sarcoma murino, virus del tumor mamario de ratón, virus de la leucemia bovina, virus de la leucemia felina, virus del sarcoma felino, virus de la leucemia aviar, virus de la leucemia de células T humanas, virus endógeno del babuino (BaEV), virus de la leucemia del simio gibón, virus del mono Mason Pfizer, virus de la inmunodeficiencia del simio, virus del sarcoma del simio, virus del sarcoma de Rous y lentivirus.

IV.A. Vectores retrovirales

[0193] En algunos casos, el vector viral usado en los métodos y composiciones descritos en la presente es un vector retroviral. Un tipo de vector retroviral que puede usarse en los métodos y composiciones descritos en la presente es un vector lentiviral. Los vectores lentivirales (LV), un subconjunto de retrovirus, transducen una amplia gama de tipos de células que se dividen y que no se dividen con alta eficiencia, lo que confiere una expresión estable a largo plazo del transgén. Se proporciona una descripción general de las estrategias de optimización para empaquetar y transducir LV en Delenda, The Journal of Gene Medicine 6: S125, 2004, cuya descripción se incorpora a la presente mediante esta referencia.

[0194] El uso de técnicas de transferencia de genes basadas en lentivirus se basa en la producción

in vitro de partículas lentivirales recombinantes que portan un genoma viral altamente eliminado en el que se aloja el transgén de interés. En particular, los lentivirus recombinantes se recuperan a través de la coexpresión in trans en una línea celular permisiva de (1) las construcciones de empaquetamiento, es decir, un vector que expresa los precursores de Gag-Pol junto con Rev (alternativamente expresado en trans); (2) un vector que expresa una proteína de la envoltura, generalmente de naturaleza heteróloga; y (3) el vector de transferencia, que consiste en el ADNc viral privado de todos los marcos de lectura abiertos, pero manteniendo las secuencias necesarias para la replicación, encapsidación y expresión, en el que se insertan las secuencias a expresar.

[0195] Un LV utilizado en los métodos y composiciones descritos en la presente puede incluir uno o más de una repetición terminal larga (LTR) de 5', secuencia de señal de VIH, sitio de empalme 5' (SD) de señal Psi de VIH, elemento delta-GAG, Elemento que responde a Rev (RRE), sitio de empalme 3' (SA), factor de elongación (EF), promotor 1-alfa y LTR autoinactivante 3' (SIN-LTR). El vector lentiviral incluye opcionalmente un tracto de polipurina central (cPPT) y un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE), tal como se describe en US 6.136.597, cuya descripción se incorpora a la presente mediante referencia en lo que respecta a WPRE. El vector lentiviral puede incluir además una estructura principal de pHR', que puede incluir, por ejemplo, lo que se proporciona a continuación.

[0196] El Lentigen LV descrito en Lu et al., Journal of Gene Medicine 6:963, 2004, se puede usar para expresar las moléculas de ADN y/o transducir células. Un LV utilizado en los métodos y composiciones descritos en la presente puede incluir una repetición terminal larga (LTR) de 5', secuencia de señal de VIH, sitio de empalme 5' (SD) de señal Psi de VIH, elemento delta-GAG, Elemento que responde a Rev (RRE), sitio de empalme 3' (SA), factor de elongación (EF), promotor 1-alfa y LTR autoinactivante 3' (SIN-LTR). Será evidente para un experto en la técnica que, opcionalmente, una o más de estas regiones se sustituyen por otra región que realiza una función similar.

[0197] Los elementos potenciadores se pueden usar para aumentar la expresión de moléculas de ADN modificadas o aumentar la eficiencia de integración lentiviral. El LV usado en los métodos y composiciones descritos en la presente puede incluir una secuencia nef. El LV usado en los métodos y composiciones descritos en la presente puede incluir una secuencia cPPT que aumenta la integración del vector. El cPPT actúa como un segundo origen de la síntesis de ADN en la cadena (+) e introduce una superposición de cadena parcial en el medio de su genoma de VIH nativo. La introducción de la secuencia cPPT en la estructura principal del vector de transferencia aumentó considerablemente el transporte nuclear y la cantidad total de genoma integrado en el ADN de las células objetivo. El LV utilizado en los métodos y composiciones descritos en la presente puede incluir un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE). El WPRE actúa a nivel

transcripcional, al promover la exportación nuclear de transcritos y/o al aumentar la eficacia de la poliadenilación del transcrito nascente, que de este modo aumenta la cantidad total de ARNm en las células. La adición de WPRE a LV resulta en una mejora sustancial en el nivel de expresión del transgén de varios promotores diferentes, tanto in vitro como in vivo. El LV utilizado en los métodos y composiciones descritos en la presente puede incluir tanto una secuencia de cPPT como una secuencia de WPRE. El vector también puede incluir una secuencia IRES que permita la expresión de múltiples polipéptidos a partir de un solo promotor.

[0198] Además de las secuencias IRES, son útiles otros elementos que permiten la expresión de múltiples polipéptidos. El vector utilizado en los métodos y composiciones descritos en la presente puede incluir múltiples promotores que permitan la expresión de más de un polipéptido. El vector utilizado en los métodos y composiciones descritos en la presente puede incluir un sitio de escisión de proteína que permita la expresión de más de un polipéptido. Ejemplos de sitios de escisión de proteínas que permiten la expresión de más de un polipéptido se describen en Klump et al., Gene Ther.; 8:811, 2001, Osborn et al., Molecular Therapy 12:569, 2005, Szymczak y Vignali, Expert Opin Biol. Ther. 5:627, 2005, and Szymczak et al., Nat. Biotechnol. 22:589, 2004, cuyas descripciones se incorporan a la presente mediante referencia ya que se refieren a sitios de escisión de proteínas que permiten la expresión de más de un polipéptido. Será evidente para un experto en la técnica que otros elementos que permiten la expresión de múltiples polipéptidos identificados en el futuro son útiles y se pueden utilizar en los vectores adecuados para su uso con las composiciones y métodos descritos en la presente.

[0199] Otros vectores retrovirales (*p. ej.*, estructuras principales retrovirales) que se pueden usar junto con las composiciones y métodos descritos en la presente incluyen vectores gammaretrovirales. Los vectores retrovirales gamma de ejemplo son, o derivan del, virus sincitial de pollo, virus de la leucemia felina, virus del sarcoma murino de Finkel-biskis-jenkins, virus del sarcoma felino de Gardner-Arnstein, virus de la leucemia del simio gibbon, oncovirus de tipo c del conejillo de indias, virus del sarcoma felino de Hardy-Zuckerman, virus del sarcoma murino de Harvey, virus del sarcoma murino de Kirsten, retrovirus de koala, virus del sarcoma murino de Moloney, virus de la leucemia murina, oncovirus tipo c porcino, virus de la reticuloendoteliosis, virus del sarcoma felino de Snyder-Theilen, virus de la necrosis del bazo del pato Trager, retrovirus de la víbora y virus del sarcoma del mono lanudo.

[0200] En determinadas modalidades, la estructura principal del vector viral se deriva de un lentivirus (LV). En determinadas modalidades, la estructura principal del vector viral deriva de un vector lentiviral (LV) de autoinactivación (SIN) de tercera generación (*p. ej.*, VIH, SIV o EIAV). En determinadas modalidades, la estructura principal del vector viral deriva de un LV (*p. ej.*) que no se autoinactiva.

[0201] Otros vectores retrovirales (*p. ej.*, estructuras principales retrovirales) que se pueden usar junto con las composiciones y métodos descritos en la presente incluyen vectores alfaretrovirales. Los vectores alfarretrovirales son, o derivan del, virus del carcinoma aviar de Mill Hill 2, virus de leucosis aviar, virus de mieloblastosis aviar, virus de mielocitomatosis aviar 29, virus del sarcoma aviar ct10, virus del sarcoma de Fujinami, virus del sarcoma de Rous, virus del sarcoma ur2 y virus del sarcoma y73.

[0202] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH- CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 16 , una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 18 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 19; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente

98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la célula T γδ modificada no comprende un polipéptido IL-15Rα o un polipéptido IL-15.

[0203] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:14, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 16, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 17, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 18 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 19; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2Rβ que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al

menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0204] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 20 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 21; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente

90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

5 aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos

10 aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos

15 aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-

20 15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en

25 SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con

30 la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0205] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14, una VH-CDR2 que comprende la

35 secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15, una VH-CDR3 que comprende la

- secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 16, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 18 y una VL-CDR3 que comprende la secuencias de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 19; (ii) una región bisagra que comprende
- 5 la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que
- 10 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α anclado a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.
- 15 [0206] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 20, y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 21; (ii) una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos
- 20 establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende la secuencia de
- 25 aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.
- 30 [0207] En algunos aspectos, la porción del polinucleótido que codifica (A) el CAR y la porción del polinucleótido que codifica (B) la proteína de blindaje están conectadas por una porción del polinucleótido que codifica un enlazador. En algunos aspectos, el enlazador comprende un enlace peptídico. En algunos aspectos, el enlazador comprende uno o más aminoácidos. En algunos aspectos, el enlazador es un enlazador escindible. En algunos aspectos, el enlazador comprende
- 35 un enlazador T2A. En algunos aspectos, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos

que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5.

[0208] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH- CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 16 , una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 18 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 19; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente

98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la célula T γδ modificada no comprende un polipéptido IL-15Rα o un polipéptido IL-15.

[0209] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:14, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 16, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 17, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 18 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 19; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2Rβ que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al

menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0210] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 20 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 21; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente

90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

5 aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos

10 aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos

15 aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-

20 15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en

25 SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con

30 la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0211] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14, una VH-CDR2 que comprende la

35 secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15, una VH-CDR3 que comprende la

- secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 16, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 18 y una VL-CDR3 que comprende la secuencias de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 19; (ii) una región bisagra que comprende
- 5 la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que
- 10 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α anclado a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.
- 15 [0212] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 20, y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 21; (ii) una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos
- 20 establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende la secuencia de
- 25 aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.
- 30 [0213] En algunos aspectos, la porción del polinucleótido que codifica (A) el CAR y la porción del polinucleótido que codifica (B) la proteína de blindaje están conectadas por una porción del polinucleótido que codifica un enlazador. En algunos aspectos, el enlazador comprende un enlace peptídico. En algunos aspectos, el enlazador comprende uno o más aminoácidos. En algunos aspectos, el enlazador es un enlazador escindible. En algunos aspectos, el enlazador comprende
- 35 un enlazador T2A. En algunos aspectos, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos

que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia

5 con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5

[0214] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH- CDR1 que comprende la

10 secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 23, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24 , una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26 y una VL-CDR3 que comprende la

15 secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 27; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende una

20 secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente

25 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al

30 menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95

35 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente

98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada no comprende un polipéptido IL-15R α o un polipéptido IL-15.

[0215] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 23, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 24, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 25, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 26 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 27; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al

menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0216] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 28 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 29; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente

90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

5 aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos

10 aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos

15 aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-

20 15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en

25 SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con

30 la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0217] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22, una VH-CDR2 que comprende la

35 secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 23, una VH-CDR3 que comprende la

- secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26 y una VL-CDR3 que comprende la secuencias de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 27; (ii) una región bisagra que comprende
- 5 la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que
- 10 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α anclado a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.
- 15 [0218] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 28, y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 29; (ii) una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos
- 20 establecida en SEQ ID NO: 30; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 31; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende la secuencia de
- 25 aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.
- 30 [0219] En algunos aspectos, la porción del polinucleótido que codifica (A) el CAR y la porción del polinucleótido que codifica (B) la proteína de blindaje están conectadas por una porción del polinucleótido que codifica un enlazador. En algunos aspectos, el enlazador comprende un enlace peptídico. En algunos aspectos, el enlazador comprende uno o más aminoácidos. En algunos aspectos, el enlazador es un enlazador escindible. En algunos aspectos, el enlazador comprende
- 35 un enlazador T2A. En algunos aspectos, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos

que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5.

[0220] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH- CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 23, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24 , una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 27; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente

98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la célula T $\gamma\delta$ modificada no comprende un polipéptido IL-15R α o un polipéptido IL-15.

[0221] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 23, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 24, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 25, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 26 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 27; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al

menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0222] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 28 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 29; (ii) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente

90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

5 aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % identidad de secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos

10 aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos

15 aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-

20 15R α comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en

25 SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con

30 la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.

[0223] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22, una VH-CDR2 que comprende la

35 secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 23, una VH-CDR3 que comprende la

- secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 25, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26 y una VL-CDR3 que comprende la secuencias de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 27; (ii) una región bisagra que comprende
- 5 la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que
- 10 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α anclado a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.
- 15 [0224] En algunos aspectos, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica (A) un CAR, que comprende (i) un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la mesotelina humana, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 28, y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 29; (ii) una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos
- 20 establecida en SEQ ID NO: 32; (iii) un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33; (iv) un dominio coestimulador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34; y (v) un dominio de señalización intracelular que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35; y (B) una proteína de blindaje, que comprende (i) un polipéptido IL-2R β que comprende la secuencia de
- 25 aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (ii) un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4; y (iii) un polipéptido IL-15R α unido a un polipéptido IL-15; en donde el polipéptido IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3; y en donde el polipéptido IL-15 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2.
- 30 [0225] En algunos aspectos, la porción del polinucleótido que codifica (A) el CAR y la porción del polinucleótido que codifica (B) la proteína de blindaje están conectadas por una porción del polinucleótido que codifica un enlazador. En algunos aspectos, el enlazador comprende un enlace peptídico. En algunos aspectos, el enlazador comprende uno o más aminoácidos. En algunos aspectos, el enlazador es un enlazador escindible. En algunos aspectos, el enlazador comprende
- 35 un enlazador T2A. En algunos aspectos, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos

que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5.

V. Métodos de recolección y expansión de células T γδ

[0226] Las células T γδ modificadas pueden expandirse en presencia de una citocina, tal como IL-15, IL-2, o en ausencia de IL-2 o IL-15 exógenas. En algunas modalidades, las células se expanden en presencia de IL-15 exógena. En algunas modalidades, las células expresan IL-15 secretada y no requieren IL-15 exógena para la expansión. En algunas modalidades, el método incluye expandir la población de células T γδ en presencia de IL-2 exógena.

[0227] En un aspecto, la invención presenta un método para expandir las células T γδ al proporcionar una población de células T γδ que expresan una IL-15Rβ; y cultivar la población de células T γδ en presencia de IL-2 y/o IL-15 exógena o una variante de estas.

[0228] En otro aspecto, la invención presenta un método para expandir las células T γδ al proporcionar una población de células T γδ que expresan una IL-15Rβ e IL-15 o una variante de estas; y cultivar las células T γδ, en donde la IL-15 o variante de esta expande la población de células T γδ.

[0229] Las células T γδ modificadas de la invención pueden derivar de cualquier célula T γδ autóloga o alogénica adecuada o de una población de estas. En algunas modalidades, las células T γδ adecuadas para usar como fuente de las células T γδ modificadas descritas en la presente incluyen células Vδ1, células Vδ2, células Vδ3, células Vδ5 y células Vδ8. En algunas modalidades, la población de células T γδ modificados deriva de una población de células Vδ1 o células Vδ2.

[0230] Por ejemplo, en la presente se proporcionan métodos para separar y expandir células Vδ1 de un tejido no hematopoyético, tal como la piel o el intestino. En otras modalidades, las células T γδ adecuadas pueden derivar de la sangre (*p.ej.*, la sangre periférica). Los métodos para aislar y expandir células Vδ1 de la sangre incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 9.499.788, la publicación de patente internacional n.º WO 2016/198480 y la solicitud de patente británica n.º 2204926.6, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad a la presente mediante referencia. En algunas modalidades, las células T γδ adecuadas pueden derivar de tejido tumoral (*p. ej.*, células T γδ infiltrantes de tumores). De manera alternativa, las células T γδ adecuadas que se pueden modificar para expresar un transgén pueden derivar de tejido no hematopoyético de acuerdo con los métodos que se describen a continuación.

V.A. Aislamiento y expansión de células T $\gamma\delta$ de la sangre

[0231] En algunas modalidades, las células T $\gamma\delta$ modificadas de la presente invención derivan de la sangre (*p. ej.*, sangre periférica) de un sujeto. Por ejemplo, las células T $\gamma\delta$ modificadas pueden derivar de células V δ 2 derivadas de sangre o células V δ 1 derivadas de sangre.

5 [0232] En algunas modalidades, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se pueden obtener de un sujeto de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Las PBMC se pueden cultivar en presencia de aminobisfosfonatos (*p. ej.*, ácido zoledrónico), fosfoantígenos sintéticos (*p. ej.*, pirofosfato de bromohidrina; BrHPP), 2M3B1PP o 2-metil-3-butenil-1-pirofosfato en presencia de IL-2 durante una o dos semanas para generar una población enriquecida de células

10 V δ 2. De manera alternativa, el anti-TCR $\gamma\delta$ inmovilizado (*p. ej.*, pan TCR $\gamma\delta$) puede inducir la expansión preferencial de células V δ 2 de una población de PBMC en presencia de IL-2, *p. ej.*, durante aproximadamente 14 días. En algunas modalidades, la expansión preferencial de células V δ 2 de PBMC puede lograrse con el cultivo de anticuerpos anti-CD3 inmovilizados (*p. ej.*, OKT3) en presencia de IL-2 e IL-4. En algunas modalidades, el cultivo antes mencionado se mantiene durante

15 alrededor de siete días antes del subcultivo en anti-CD3, IL-2 e IL-4 solubles. De manera alternativa, se pueden usar células presentadoras de antígenos artificiales para promover la expansión preferencial de las células T $\gamma\delta$, tales como las células V δ 2. Por ejemplo, las células T $\gamma\delta$ derivados de las PBMC cultivados en presencia de aAPC irradiados, IL-2 y/o IL-21 pueden expandirse para generar una población de células T $\gamma\delta$ que incluya una alta proporción de células V δ 2, una

20 proporción moderada de células V δ 1 y algunas células doblemente negativas. En algunas modalidades de los métodos mencionados anteriormente, las PBMC se pueden enriquecer previamente o enriquecer posteriormente (*p. ej.*, mediante selección positiva con agentes específicos de TCR $\gamma\delta$ o selección negativa de agentes específicos de TCR $\alpha\beta$). Tales métodos y otros métodos adecuados para la expansión de las células T $\gamma\delta$, tales como las células V δ 2, se

25 describen en detalle por Deniger et al., *Frontiers in Immunology* 5, 636: 1-10, 2014, que se incorpora en la presente en su totalidad mediante referencia.

[0233] En algunas modalidades, las células T V δ 1 se pueden modificar para expresar un transgén (*p. ej.*, una construcción dirigida heteróloga). Se puede usar cualquier método adecuado para obtener una población de células T V δ 1. Por ejemplo, Almeida et al. (*Clinical Cancer Research*, 22, 23; 5795-5805, 2016), incorporado en la presente mediante referencia en su totalidad, proporciona

30 métodos adecuados para obtener una población de células T V δ 1 que pueden modificarse para expresar una construcción de direccionamiento heterólogo descrito en la presente. Por ejemplo, en algunas modalidades, las PBMC se enriquecen previamente mediante la clasificación con microesferas magnéticas, lo que puede producir más de 90 % de células T $\gamma\delta$. Estas células se

35 pueden cultivar en presencia de uno o más factores (*p. ej.*, agonistas de TCR, agonistas de co-

receptores, y/o citocinas, *p. ej.*, IL-4, IL-15, y/o IFN- γ) en bolsas de biorreactores permeables al gas por hasta 21 días o más. Las variaciones de este método y otros métodos para obtener células T V δ 1 son adecuadas como parte de la presente invención. Por ejemplo, las células T V δ 1 derivadas de la sangre se pueden obtener alternativamente mediante el uso de métodos descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 9.499.788 y la publicación de patente internacional n.º WO 2016/198480, cada uno de los cuales se incorpora en la presente mediante referencia en su totalidad.

V.B. Separación y expansión de células T $\gamma\delta$ residentes en tejidos no hematopoyéticos provenientes de tejidos no hematopoyéticos

[0234] Las células T $\gamma\delta$ residentes en tejidos no hematopoyéticos obtenidos tal como se describe a continuación pueden ser vehículos adecuados para los transgenes descritos en la presente, ya que pueden exhibir buenas capacidades de retención y penetración tumoral. Se pueden encontrar métodos más detallados para el aislamiento y la expansión de células T $\gamma\delta$ residentes en tejidos no hematopoyéticos, por ejemplo, en la publicación PCT n.º WO 2020/095058, WO 2020/095059, WO 2017/072367, y la solicitud de GB n.º 2006989.4, cada uno de los cuales se incorpora en la presente mediante referencia en su totalidad.

[0235] Las células T $\gamma\delta$ residentes en tejidos no hematopoyéticos (*p. ej.*, células T $\gamma\delta$ derivadas de la piel y/o células T no V δ 2, *p. ej.*, células T V δ 1 y/o células T DN) se pueden aislar de cualquier tejido no hematopoyético humano o de un animal no humano que se pueda extraer de un paciente para obtener células adecuadas para la modificación de acuerdo con los métodos de la presente invención. En algunas modalidades, el tejido no hematopoyético del que se derivan y expanden las células T $\gamma\delta$ es piel (*p. ej.*, piel humana), que puede obtenerse mediante métodos conocidos en la técnica. En algunas modalidades, la piel se obtiene mediante biopsia por punción. De manera alternativa, los métodos de aislamiento y expansión de células T $\gamma\delta$ proporcionados en la presente se pueden aplicar al tracto gastrointestinal (*p. ej.*, colon), glándula mamaria, pulmón, próstata, hígado, bazo y páncreas. Las células T $\gamma\delta$ también pueden residir en tejidos cancerosos humanos, *p. ej.*, tumores mamarios o de próstata. En algunas modalidades, las células T $\gamma\delta$ pueden ser de tejidos cancerosos humanos (*p. ej.*, tejidos de tumores sólidos). En otras modalidades, las células T $\gamma\delta$ pueden ser de tejido no hematopoyético distinto del tejido canceroso humano (*p. ej.*, un tejido sin un número sustancial de células tumorales). Por ejemplo, las células T $\gamma\delta$ pueden ser de una región de la piel (*p. ej.*, piel sana) separada de un tejido canceroso cercano o adyacente.

[0236] Las células T $\gamma\delta$ dominantes en la sangre son principalmente células T V δ 2, mientras que las células T $\gamma\delta$ que dominan en los tejidos no hematopoyéticos son principalmente células T V δ 1, de forma tal que las células T V δ 1 incluyan alrededor del 70-80 % de la población de células T $\gamma\delta$ residentes en tejidos no hematopoyéticos. Sin embargo, algunos células T V δ 2 también se

encuentran en tejidos no hematopoyéticos, *p. ej.*, en el intestino, donde pueden incluir alrededor del 10-20 % de las células T $\gamma\delta$. Algunas células T $\gamma\delta$ que residen en tejidos no hematopoyéticos no expresan TCR V δ 1 ni V δ 2 y han sido denominadas células T $\gamma\delta$ doble negativas (DN). Es probable que estas células T $\gamma\delta$ DN expresen principalmente V δ 3 con una minoría de células T que expresen V δ 5. Por lo tanto, las células T $\gamma\delta$ que normalmente residen en tejidos no hematopoyéticos y que se expanden mediante el método de la invención son preferentemente células T no V δ 2, *p. ej.*, células T V δ 1, con la inclusión de una cantidad menor de células T $\gamma\delta$ DN.

[0237] En algunas modalidades, una etapa crítica es la separación deliberada, *p. ej.*, después de algunos días o semanas de cultivo, de células T residentes en tejidos no hematopoyéticos (*p. ej.*, dentro de una población mixta de células, que puede incluir, *p. ej.*, células $\alpha\beta$, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos B y células T $\gamma\delta$ 2 y no $\gamma\delta$ 2) lejos de las células no hematopoyéticas (*p. ej.*, células estromales, particularmente fibroblastos) del tejido del que se obtuvieron las células T. Esto permite la expansión preferencial y rápida durante los siguientes días y semanas de células T $\gamma\delta$ DN y células T V δ 1 derivados de tejido no hematopoyético.

[0238] En general, las células T $\gamma\delta$ residentes en tejidos no hematopoyéticos son capaces de expandirse espontáneamente tras la eliminación del contacto físico con las células estromales (*p. ej.*, fibroblastos de la piel). Por lo tanto, los métodos de cultivo basados en andamios descritos anteriormente pueden usarse para inducir tal separación, lo que da como resultado la desrepresión de las células T $\gamma\delta$ para desencadenar la expansión. Por consiguiente, en algunas modalidades, no está presente ninguna activación sustancial de la vía de los TCR durante la etapa de expansión (*p. ej.*, no se incluyen activadores de la vía de los TCR exógenos en el cultivo). Además, la invención proporciona métodos para expandir células T $\gamma\delta$ residentes en tejidos no hematopoyéticos, donde los métodos no implican el contacto con células alimentadoras, células tumorales, y/o células presentadoras de antígenos.

[0239] Los protocolos de expansión implican el cultivo de células T $\gamma\delta$ residentes en tejidos no hematopoyéticos en presencia de cócteles efectivos de factores biológicos para apoyar la expansión eficiente de las células T $\gamma\delta$. En una modalidad, el método de expansión de células T $\gamma\delta$ incluye proporcionar una población de células T $\gamma\delta$ obtenidas de un tejido no hematopoyético (*p. ej.*, una población separada de células T $\gamma\delta$ derivados de tejido no hematopoyético, *p. ej.*, una población separada de acuerdo con los métodos descritos en la presente) y cultivar las células T $\gamma\delta$ en presencia de IL-2 e IL-15, y opcionalmente IL-1 β , IL-4, y/o IL-21. Estas citocinas o análogos de estas se pueden cultivar con las células durante un tiempo (*p. ej.*, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 7 días, al menos 8 días, al menos 9 días, al menos 10 días, al menos 11 días, al menos 12 días, al menos 13 días, al menos 14 días, al menos 21 días, al menos 28 días, o más, *p. ej.*, de 5 días a 40 días, de 7 días a 35 días, de 14 días a 28 días, o alrededor de 21 días) en una cantidad

eficaz para producir una población expandida de células T $\gamma\delta$.

[0240] Numerosos medios de cultivo basal adecuados para su uso en el cebado y/o la expansión de células T $\gamma\delta$ están disponibles, tal como medios completos, OPTIMIZERTM, AIM-V, medio Iscoves y RPMI-1640 (Life Technologies) y TEXMACS™ (Miltenyi Biotec). El medio puede complementarse con otros factores del medio, tal como suero, proteínas séricas y agentes selectivos, tal como antibióticos. Por ejemplo, en algunas modalidades, un medio incluye RPMI-1640 que contiene glutamina 2 mM, FBS al 10 %, HEPES 10 mM, pH 7,2, 1 % penicilina-estreptomicina, piruvato de sodio (1 mM; Life Technologies), aminoácidos no esenciales (*p. ej.*, 100 μ M Gly, Ala, Asn, Asp, Glu, Pro y Ser; aminoácidos no esenciales 1X MEM de Life Technologies), y β -mercaptoetanol 10 μ L/L. Convenientemente, las células se cultivan a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene CO₂ al 5 % en un medio de cultivo adecuado.

[0241] Las células T $\gamma\delta$ se pueden cultivar como se describe en la presente en cualquier sistema adecuado, que incluye fermentadores de tanque agitado, fermentadores de aire, botellas giratorias, bolsas o platos de cultivo y otros biorreactores, tales como biorreactores de fibra hueca. El uso de tales sistemas es bien conocido en la técnica. Los métodos y técnicas generales para el cultivo de linfocitos son bien conocidos en la técnica.

[0242] Los métodos descritos en la presente pueden incluir más de una etapa de selección, *p. ej.*, más de una etapa de agotamiento. El enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa se puede lograr, *p. ej.*, con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie exclusivos de las células seleccionadas de forma negativa. Un método es la clasificación y/o selección celular mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que usa un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a los marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas de forma negativa.

VI. Transgenes

[0243] Las células T $\gamma\delta$ modificadas de la presente invención se modifican para expresar un transgén deseado. Las células T $\gamma\delta$ modificadas para expresar un transgén son adecuados para su uso en el tratamiento del cáncer (*p. ej.*, inmunoterapia). Los vectores virales descritos en la presente codifican el transgén, que luego se expresa de manera estable o transitoria en las células T $\gamma\delta$ transducidas. Los transgenes que se pueden usar en conjunto con las composiciones y métodos descritos en la presente incluyen IL-15R β , IL-15R α , IL-15 o cualquier variante biológicamente activa, muteínas o fragmentos truncados de estas. Otros transgenes incluyen, por ejemplo, receptores de antígenos quiméricos (CAR). El transgén puede incluir un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) conectado operativamente al transgén.

[0244] En algunas modalidades, las células T $\gamma\delta$ expresan dos o más (*p. ej.*, dos, tres, cuatro o más) transgenes. Cada uno de los transgenes puede expresarse en un único polinucleótido, de modo que

se expresen en tándem. Cada transgén puede incluir un enlazador entre ellos. El enlazador puede codificar un péptido escindible o incluir un IRES. El péptido escindible puede ser, por ejemplo, un péptido autoescindible, tal como un péptido 2A. En algunas modalidades, el péptido 2A es un péptido F2A, un péptido E2A, un péptido P2A o un péptido T2A. En algunas modalidades, el polinucleótido incluye un IRES distinto conectado operativamente a cada transgén en un único polinucleótido. En algunas modalidades, el polinucleótido incluye un IRES único conectado operativamente a todos los transgenes en un único polinucleótido.

[0245] En algunos casos, un transgén que va a ser expresado por las células T $\gamma\delta$ modificadas de la presente invención incluye un marcador seleccionable (*p. ej.*, un gen indicador) o un gen suicida.

Por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) truncado, que carece del dominio de señalización intracelular, puede usarse como un transgén para el agotamiento in vivo en caso de, *p. ej.*, toxicidad, mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-EGFR. De manera similar, CD20 se puede usar como un transgén para el agotamiento in vivo mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD20. Otro transgén de ejemplo es un gen suicida para facilitar el control mediado por fármacos de las células T $\gamma\delta$ modificadas administradas. Mediante el uso de un gen suicida, las células modificadas se pueden eliminar del paciente en caso de un evento adverso. En un ejemplo, un dominio de unión a fármacos se fusiona con la molécula proapoptótica de caspasa9. En algunos casos, el transgén es citosina desaminasa. En algunos casos, el transgén es timidina cinasa.

[0246] De manera adicional o alternativa, los transgenes para la expresión por las células T $\gamma\delta$ modificadas de la presente invención codifican a las proteínas unidas a la membrana, tal como un receptor unido a la membrana (*p. ej.*, TCR $\alpha\beta$, un receptor de citotoxicidad natural (*p. ej.*, NKp30, NKp44 o NKp46), un receptor de citocinas (*p. ej.*, receptor IL-12), y/o un receptor de quimiocinas (*p. ej.*, receptor CCR2) y/o un ligando o citocina unido a la membrana (*p. ej.*, IL-15 unido a la membrana, IL-7 unido a la membrana, CD40L unido a la membrana, 4-1BB unido a la membrana, 4-1BBL unido a la membrana, CCL19 unido a la membrana). Los ligandos y citocinas unidos a la membrana incluyen ligandos y citocinas unidos a la membrana de forma natural (*p. ej.*, IL-15 y 4-1BBL presentados de forma trans) y configuraciones unidas a la membrana sintéticas (*p. ej.*, ligandos que se han fusionado artificialmente con una proteína transmembrana). De manera adicional o alternativa, los transgenes que van a ser expresados por las células T $\gamma\delta$ modificadas de la presente invención codifican proteínas solubles, tales como ligandos solubles o citocinas (*p. ej.*, IL-15 soluble, IL-7 soluble, IL-12 soluble, CD40L soluble, 4-1BBL soluble, y/o CCL19 soluble).

[0247] En algunos casos, las células T $\gamma\delta$ modificadas que tienen un transgén que codifica un CAR pueden protegerse con un transgén adicional que contribuye a la inmunogenicidad. Dichas células

T CAR con blindaje expresan una proteína con blindaje, tal como cualquiera de las proteínas unidas

a la membrana o solubles descritas en la presente. Por ejemplo, las proteínas con blindaje incluyen proteínas unidas a la membrana, tal como un receptor unido a la membrana (*p. ej.*, TCR $\alpha\beta$, un receptor de citotoxicidad natural (*p. ej.*, NKp30, NKp44 o NKp46), un receptor de citocinas (*p. ej.*, receptor IL-12), y/o un receptor de quimiocinas (*p. ej.*, receptor CCR2) y/o un ligando o citocina unido a la membrana (*p. ej.*, IL-15 unido a la membrana, IL-7 unido a la membrana, CD40L unido a la membrana, 4-1BB unido a la membrana, 4-1BBL unido a la membrana, CCL19 unido a la membrana). De manera adicional o alternativa, las proteínas con blindaje que van a ser expresadas por las células T CAR $\gamma\delta$ modificadas de la presente invención incluyen proteínas solubles, tales como ligandos solubles o citocinas (*p. ej.*, IL-15 soluble, IL-7 soluble, IL-12 soluble, CD40L soluble, 4-1BBL soluble, y/o CCL19 soluble).

[0248] En algunas modalidades, las células T $\gamma\delta$ modificadas genéticamente de la presente invención se modifican para expresar uno o más transgenes (*p. ej.*, uno o más de cualquiera de los transgenes descritos en la presente) para blindar las células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, como una células T CAR con blindaje), tal como se describe en Yeku y Brentjens Biochem. Soc. Trans. 2016, 15: 44, 2, 412-418, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia).

[0249] En algunas modalidades, el transgén tiene codones optimizados.

[0250] En algunas modalidades, al menos 3 % (*p. ej.*, al menos 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, o sustancialmente la totalidad) de la población manipulada de células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, células V δ 1 o V δ 2) expresa el transgén, *p. ej.*, IL-15R β , un CAR u otra proteína soluble o unida a la membrana. En algunas modalidades, al menos 10 % (*p. ej.*, al menos 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, o sustancialmente la totalidad) de la población manipulada de células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, células V δ 1 o V δ 2) expresa el transgén, *p. ej.*, IL-15R β , un CAR u otra proteína soluble o unida a la membrana. En algunas modalidades, al menos 50 % (*p. ej.*, al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, o sustancialmente la totalidad) de la población manipulada de células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, células V δ 1 o V δ 2) expresa el transgén, *p. ej.*, IL-15R β , el CAR u otra proteína soluble o unida a la membrana. En algunas modalidades, 3 % - 95 % (*p. ej.*, 5 % - 95 %, 10 % - 95 %, 20 % - 95 %, 25 % - 95 % o 50 % - 95 %) de la población manipulada de células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, células V δ 1 o V δ 2) expresa el transgén, *p. ej.*, IL-15R β , el CAR u otra proteína soluble o unida a la membrana. En algunas modalidades, 3 % - 90 % (*p. ej.*, 5 % - 90 %, 10 % - 90 %, 20 % - 90 %, 25 % - 90 % o 50 % - 90 %) de la población manipulada de células T $\gamma\delta$ (*p. ej.*, células V δ 1 o V δ 2) expresa el transgén, *p. ej.*, IL-15R β , el CAR u otra proteína soluble o unida a la membrana.

VII. Métodos de tratamiento

[0251] Algunos aspectos de la descripción están dirigidos a un método para tratar a un paciente que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una célula T y/o modificada descrita en la presente. En algunos aspectos, el sujeto padece un cáncer. Generalmente, el crecimiento y/o la vida útil de una célula cancerosa excede, y no está coordinada con, la de las células y tejidos normales que la rodean. Los cánceres pueden ser benignos, premalignos o malignos. El cáncer ocurre en una variedad de células y tejidos, incluida la cavidad oral (*p. ej.*, boca, lengua, faringe, etc.), sistema digestivo (*p. ej.*, esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, hígado, conducto biliar, vesícula biliar, páncreas, etc.), sistema respiratorio (*p. ej.*, laringe, pulmón, bronquios, etc.), huesos, articulaciones, piel (*p. ej.*, de células basales, de células escamosas, meningioma, etc.), mama, sistema genital (*p. ej.*, útero, ovario, próstata, testículos, etc.), sistema urinario (*p. ej.*, vejiga, riñón, uréter, etc.), ojo, sistema nervioso (*p. ej.*, cerebro, etc.), sistema endocrino (*p. ej.*, tiroides, etc.) y sistema hematopoyético (*p. ej.*, linfoma, mieloma, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, etc.).

[0252] En algunos aspectos, la enfermedad o afección comprende un cáncer, *p. ej.*, el sujeto padece un cáncer. En algunos aspectos, el cáncer comprende cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de vías respiratorias y digestivas altas, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de pulmón (*p. ej.*, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) o cáncer de pulmón microcítico (SCLC)), cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkiniano, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de glándula tiroides, cáncer de glándula paratiroides, cáncer de glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide aguda (AML) (*p. ej.*, AML recidivante o refractaria), leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica (LLA), leucemia mielógena crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o de uréter, carcinoma de pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma de tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres inducidos por el medio ambiente, incluidos los inducidos por asbesto, o cualquier combinación de estos. En algunos aspectos, el cáncer presenta un avance local. En algunos aspectos, el cáncer es metastásico. En algunos aspectos, el cáncer es refractario. En algunos aspectos, el cáncer es recidivante. En algunos aspectos, el cáncer es refractario o recidivante después de una o más terapias anticancerígenas anteriores. En algunos aspectos, una o más terapias anticancerígenas anteriores comprenden una terapia de atención estándar.

[0253] En algunos aspectos, las composiciones descritas en la presente se administran en combinación con una terapia anticancerígena adicional. En algunos aspectos, la terapia anticancerígena adicional comprende quimioterapia, inmunoterapia, radioterapia, cirugía o cualquier combinación de estas. En algunos aspectos, la terapia anticancerígena adicional comprende una quimioterapia. En algunos aspectos, la terapia anticancerígena adicional comprende un inhibidor del punto de control inmunitario. En algunos aspectos, la terapia anticancerígena adicional comprende un antagonista de PD-1, un antagonista de PD-L1, un antagonista de CTLA-4, un antagonista de LAG-3, un antagonista de GITR o cualquier combinación de estos. En algunos aspectos, la terapia anticancerígena comprende un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de este que se une e inhibe específicamente a PD-1 (*p. ej.*, pembrolizumab o nivolumab). En algunos aspectos, la terapia anticancerígena comprende un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de este que se une e inhibe específicamente a PD-L1 (*p. ej.*, atezolizumab, avelumab, o durvalumab).

[0254] En algunos aspectos, el método comprende además el pretratamiento del sujeto antes de administrar la población de células inmunitarias. En algunos aspectos, al sujeto se le administra una quimioterapia antes de administrar la población de células inmunitarias. En algunos aspectos, al sujeto se le administra una quimioterapia inmunodepresora antes de administrar la población de células inmunitarias. En algunos aspectos, la quimioterapia inmunodepresora comprende ciclofosfamida, fludarabina o ambas.

[0255] En algunos aspectos, el método comprende administrar al sujeto (i) una célula linfoide innata modificada descrita en la presente y (ii) una citocina. En algunos aspectos, la citocina comprende IL-2, un análogo de esta, una variante de esta o un fragmento de esta.

[0256] En algunos aspectos, las células de la presente descripción se administran a un sujeto a una dosis de al menos aproximadamente 1×10^6 células, al menos aproximadamente 2×10^6 células, al menos aproximadamente 3×10^6 células, al menos aproximadamente 4×10^6 células, al menos aproximadamente 5×10^6 células, 1×10^7 células, al menos aproximadamente 2×10^7 células, al menos aproximadamente 3×10^7 células, al menos aproximadamente 4×10^7 células, al menos aproximadamente 5×10^7 células, 1×10^8 células, al menos aproximadamente 2×10^8 células, al menos aproximadamente 3×10^8 células, al menos aproximadamente 4×10^8 células, al menos aproximadamente 5×10^8 células, 1×10^9 células, al menos aproximadamente 2×10^9 células, al menos aproximadamente 3×10^9 células, al menos aproximadamente 4×10^9 células, o al menos aproximadamente 5×10^9 células.

[0257] La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que se encuentran comprendidos en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*,

- ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* La patente estadounidense Nº 4.683.195; Hames y Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller y Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 y 155; Mayer y Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, Londres); Weir y Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986)); Crooke, *Antisense drug Technology: Principles, Strategies and Applications*, 2ª ed. CRC Press (2007) y en Ausubel *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

[0258] Todas las referencias mencionadas anteriormente, así como todas las referencias mencionadas en la presente, se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad.

[0259] Los siguientes ejemplos se presentan únicamente a modo ilustrativo y no de manera limitante.

20 EJEMPLOS

Materiales y métodos

Aislamiento y expansión de células T Vδ1

- [0260] El producto enriquecido con células T Vδ1 γδ (GDX012) se produjo mediante el uso de un protocolo modificado basado en Almeida *et al.* (2016) *Clin. Cancer Res.* 22: 5795–804. Brevemente, las células mononucleares de sangre periférica con agotamiento de células T αβ se expandieron en recipientes de cultivo G-Rex (Wilson Wolf) mediante el uso de un medio de cultivo sin suero (CTS OpTmizer, Thermo Fisher) complementado con plasma autólogo al 2,5 % y Glutamax (ThermoFisher). Las células aisladas se cultivaron en presencia de IL-4 recombinante [rIL4] (100 ng/mL), interferón-γ recombinante [rIFNγ] (70 ng/mL), IL-21 recombinante [rIL21] (7 ng/mL), IL-1β recombinante [rIL1β] (15 ng/mL), y anticuerpo monoclonal OKT-3 soluble (42 ng/mL). Las células se incubaron a 37 °C y CO2 al 5 % en una incubadora humidificada. Las células en expansión se alimentaron regularmente con medio fresco que contenía IL-15 recombinante [rIL15] ("alto": día 5: 21 ng/mL y día 7: 100 ng/mL O "bajo": día 5: 2,1 ng/mL y día 7: 10 ng/mL).

Transducción retroviral

- [0261] Las células T γδ en expansión se transdujeron con vectores retrovirales en bolsas de

expansión celular recubiertas con retronectina (20 mg/ml) (bolsas PermaLife, OriGen Biomedical) con una multiplicidad de infección (MOI) definida. MOI se refiere al número de partículas infecciosas (medidas por citometría de flujo) que se agregaron por célula durante la transducción. Los vectores virales se diluyeron en medio CTS OpTmizer. La eficacia de la transducción se determinó mediante citometría de flujo después de tres días después de la transducción a intervalos regulares.

Producción y titulación de vectores retrovirales

[0262] Los vectores gammaretrovirales se produjeron mediante transfección transitoria de células renales embrionarias humanas (HEK) con plásmidos del genoma del virus de la leucemia murina. Los vectores se recolectaron 96 horas después de la transfección, se filtraron a través de filtros de polietersulfona (PES) de tamaño de poro de 0,45 µm y se concentraron mediante filtración de fibra hueca.

[0263] La titulación del vector se determinó por transducción de línea celular SupT1 (leucemia linfoblástica aguda) con dilución en serie de material de vector concentrado en presencia de retronectina (20 µg/mL). La eficacia de la transducción se determinó tres días después de la transducción mediante el uso de un citómetro de flujo BD FACS Lyric. La titulación infecciosa (TU/mL) se calculó mediante la siguiente fórmula: $TU/mL = ((\text{número de células transducidas}) \times \text{dilución del vector} \times (\% \text{ de eficiencia de transducción}/100))/\text{volumen del vector (mL)}$.

Citometría de flujo

[0264] La inmunofenotipificación se realizó mediante el uso de un citómetro de flujo BD FACS Lyric.

Se analizó la expresión de marcadores de superficie en las células usando los anticuerpos de la Tabla 5 a continuación:

fluoróforo	Marcador	Fuente
BV421	CD27	BioLegend
BV510	L/D AQUA	ThermoFisher Scientific
BV605	TCRαβ	BioLegend
FITC	CAR	AcroBiosystems
PE	NKG2D	BioLegend
PE-Cy7	CD56	BioLegend
APC	TCRγδ	BioLegend
APC-Cy7	Vδ1	Miltenyi BioTec
BV421	DNAM-1	BioLegend
BV605	PD-1	BioLegend

PE	NKp30	BioLegend
PE-Cy7	TIGIT	BioLegend
PE	IL-15R α	BioLegend
PE-Cy7	IL-15R β	Beckman Coulter
APC	IL-15	R&D Systems
APC	Cadena gamma común	BioLegend

Evaluación de citotoxicidad

[0265] Las células expandidas se cocultivaron con dianas tumorales en suspensión (*p. ej.*, NALM-6) que expresan luciferasa de luciérnaga, en diversas proporciones de efector a diana. Las células diana en ausencia de efectores sirvieron como control (Ctrl). La lisis máxima se determinó utilizando células diana tratadas con estaurosporina. Después de 20 horas, se evaluó la cuantificación de la viabilidad de la diana mediante el kit del sistema de ensayo de luciferasa ONE-Glo™ (Promega) o el kit de tinción de células muertas SYTOX AADvanced (ThermoFisher). La luminiscencia se midió en un lector de placas Biotek Synergy H4 (sistema de luciferasa) y la tinción de células muertas con SYTOX AADvanced se midió mediante citometría de flujo en MACSQuant (Miltenyi).

ELISA IL-15

[0266] La producción de IL-15 se midió mediante el kit ELISA de cuantiquina humana IL-15 disponible comercialmente (Bio-Techne) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La producción de IL-15 se midió 72 horas después de la incubación.

Ensayo de estimulación de antígeno repetido

[0267] Modelo CD19

[0268] Para evaluar la expansión de células T V δ 1 modificadas con CAR y el enriquecimiento de células T-CAR, se realizaron ensayos de estimulación repetida de antígenos (RAS). Los productos farmacéuticos recién descongelados se resuspendieron en medios RPMI10 (RPMI, FBS al 10 %) en presencia (10 ng/ml o 70 pg/ml) o ausencia de IL-15. Las líneas celulares tumorales diana se contaron mediante un contador de células automatizado (NC250) y la concentración se ajustó a 1E+06 células por ml. Se añadió una concentración de citocinas 2X a las células diana y se transfirieron 100 μ l (células 1E+05) a cada pocillo de placas de fondo redondo de 96 pocillos. La concentración de células efectoras se ajustó a 2E+06 células viables por ml y se colocaron 100 μ l (2E+05 células) en pocillos que contenían las células diana. Se colocaron pocillos replicados para cada condición, dependiendo del número de células efectoras. Los cocultivos se mantuvieron durante 14 días a 37 °C, CO₂ al 5 %. En los días 4, 7 y 10, los pocillos replicados se agruparon, contaron y fenotiparon mediante un citómetro de flujo BD FACSLyric. Las células restantes se

centrifugaron posteriormente y se resuspendieron en medios frescos a una densidad de $2E+06$ células viables/ml y se colocaron en otra ronda de células diana, preparadas como en el día 0.

[0269] Modelo A549-Meso

[0270] El producto farmacéutico se descongeló y cocultivó con o sin 1 ng/ml de IL-15 con células A549-MLSN-fluc-gfp en una relación E:T de 2:1 en placas de 24 pocillos (300 000 efectores a 150 000 dianas) en un Incucyte para rastrear la fluorescencia de GFP a lo largo del tiempo, como sustituto de la lisis de células tumorales. En los días 2 y 9 de cultivo, las células se alimentaron con medios frescos más o menos 1 ng/mL de IL-15, reemplazando el 50 % del volumen del pocillo mediante aspiración cuidadosa después de la centrifugación. En los días 4 y 11 de cultivo, las células se alimentaron con medios frescos que contenían dianas (150 000 por pocillo) más o menos 1 ng/ml de IL-15, reemplazando el 50 % del volumen del pocillo mediante aspiración cuidadosa después de la centrifugación. En el día 7 se recolectaron todos los pocillos, se contaron y se volvieron a sembrar a una E:T de 2:1 como en el día 0. La confluencia tumoral se midió mediante el seguimiento de la fluorescencia de GFP a lo largo del tiempo.

Ensayo de supervivencia

[0271] Los productos farmacéuticos crioconservados se descongelaron y la concentración de células vivas se ajustó a $2E+06$ células por ml en RPMI10. Se sembraron múltiples pocillos con $2E+05$ células por pocillo. En los días 0, 3, 7, 10 y 14 se tiñeron pocillos duplicados mediante la adición directa de colorante SytoxAADvanced al medio de cultivo durante 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se analizaron cuarenta microlitros de muestra en el citómetro de flujo MACSQuant sin procesamiento adicional para la cuantificación celular y la evaluación de viabilidad. Para determinar la supervivencia de las células T CAR⁺ Vδ1⁺, se tiñó una placa replicada para marcadores de células T CAR, Vδ1 y pan-γδ y se analizó mediante citometría de flujo.

Modelo de eficacia in vivo

[0272] Modelo CD19

[0273] Se implantaron ratones NSG y NOG-IL-15 que expresan IL-15 transgénicos de 8 a 10 semanas de edad con 5×10^5 células NALM6-fluc-GFP mediante inyección intravenosa (IV). En el día 7, a los ratones se les inyectó vehículo (n = 5 ratones NSG, Cryostor CS5, grupo 1) o uno de los tres productos farmacéuticos, muCAR19.b, muCAR19.a.b o muCAR19.a.15.b en 3 condiciones experimentales: ratones NSG + 1 µg de IL-15 dosificados diariamente mediante inyección IP (N=9, grupos 2-4), ratones NSG sin dosificación de IL-15 (N=4-9, grupos 5-7) y ratones NOG-hIL15 sin dosificación de IL -15 (N=6, grupos 8-10). La Figura 13 incluye una tabla de agrupación. Se tomaron imágenes de los ratones dos veces por semana mediante una cámara IVIS después de la inyección

intraperitoneal (IP) de 150 mg/kg de d-luciferina. En el día 10 (3 días después de la administración del producto farmacológico) se sacrificaron N = 4 ratones de los grupos 2, 3, 4 y 7 y se recolectaron aspirados de médula ósea de ambos fémures, bazos y sangre periférica (recolectados en tubos de heparina de litio). Las muestras se procesaron en suspensiones de células individuales y se tiñeron para el análisis de citometría de flujo. Las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo BD FACSLytic.

[0274] Modelo A549-Meso

[0275] Se implantaron ratones NSG de 6 a 8 semanas de edad con 1×10^6 células A549-MSLN-fluc-GFP mediante inyección intravenosa (IV). En el día 19 después de la implantación, a los ratones se les inyectaron vehículo (n=7, Cryostor CS5, grupo 1), células T CAR P4 $\gamma\delta$ a 10 millones de células totales por ratón (n=7, grupo 2), Células T CAR P4 $\alpha.15.\beta$ $\gamma\delta$ a 10 millones de células totales por ratón (n=7, grupo 3), o células T CAR P4. β $\gamma\delta$ a 10 millones de células totales por ratón (n=7, grupo 4). Se tomaron imágenes de los ratones dos veces por semana mediante una cámara IVIS después de la inyección intraperitoneal (IP) de 150 mg/kg de d-luciferina. A los ratones del grupo 4 se les dosificó 1 μ g de IL-15 diariamente mediante inyección IP. En el día 19 después de la administración del producto farmacológico, se sacrificaron todos los ratones y se recolectaron aspirados de médula ósea de ambos fémures, bazos, pulmones y sangre periférica (recolectados en tubos de heparina de litio).

EJEMPLO 1: Resumen esquemático de construcciones de blindaje de IL-15 'convencionales' y novedosas

[0276] Las estrategias de blindaje usadas actualmente utilizan construcciones secretadas (sIL-15) o unidas a la membrana de IL-15 (mbIL-15). Se ha demostrado que estas estrategias mejoran la supervivencia y la proliferación de células T $\alpha\beta$ (Hurton LV. et al, PNAS, 113, E7788–E7797, (2016)), células NK (Liu et al. Leukemia 32, 520–531 (2018)) y células iNK-T (Xu et al, Clin Cancer Res., 25, 7126-7138 (2019)).

[0277] Como parte de esta invención, se diseñó y evaluó un conjunto de construcciones novedosas en células T V δ 1 $\gamma\delta$ (Figura 1A). Se generaron vectores gammaretrovirales multicistronicos en los que las secuencias que codifican el receptor de antígeno quimérico (CAR) se fusionaron en el mismo marco con componentes individuales de la cadena del receptor de IL-15 que codifican las variantes de cadena sin mutaciones o fusionadas con IL-15 (unida). Las Figuras 1B y 1C muestran el esquema de los vectores gammaretrovirales usados para coexpresar el CAR y el (los) resto(s) de blindaje.

EJEMPLO 2: Las estrategias de blindaje de IL-15 'convencionales' son subóptimas para la expansión de las células T V δ 1 derivadas de la sangre

[0278] Para determinar si las estrategias de blindaje de IL-15 utilizadas actualmente

(convencionales) pueden impulsar la expansión de las células T V δ 1 modificadas, las células T V δ 1 aisladas se transdujeron con IL-15 secretada sin blindaje (sIL-15) o construcciones CAR de IL-15 unida a la membrana (mbIL -15). Después de la transducción, las células se expandieron en presencia de IL-15 como se describe en la sección de método (alimentación 'alta' de IL-15). La expresión de CAR se controló mediante citometría de flujo a intervalos regulares durante la fase de expansión y el número total de células se enumeró mediante el recuento celular automatizado. El número absoluto de células CAR+ V δ 1+ viables (número total de células viables multiplicado por el porcentaje de CAR+ V δ 1+ T) se representó gráficamente frente al día de expansión para determinar el efecto del blindaje en el factor de expansión de las células T V δ 1 (Figura 2A).

[0279] La Figura 2A muestra que, en presencia de IL-15, las células T V δ 1 modificadas con CAR sin blindaje se enriquecieron continuamente durante el transcurso del período de cultivo. Por el contrario, las células T V δ 1 con blindaje con IL-15 convencionales demostraron una proliferación limitada durante el procedimiento de expansión, lo que sugiere que las células con blindaje se desensibilizan a la IL-15 exógena. El análisis del producto farmacológico reveló que, de hecho, las células con blindaje expresan mbIL-15 en su superficie (muCAR19.mbIL-15) y secretan IL-15 (muCAR19.sIL-15). La Figura 2B muestra la expresión superficial de la cadena IL-15 e IL-15R α en las células T CAR+ V δ 1+ blindadas con mbIL-15. La Figura 2C demuestra la funcionalidad del CAR+ V δ 1+ T blindadas con sIL-15 medido por un ELISA de IL-15 durante la noche.

EJEMPLO 3: Las estrategias de blindaje de IL-15 'convencionales' proporcionan una supervivencia y una señal de proliferación para las células T V δ 1 derivadas de la sangre limitadas

[0280] A continuación, se probaron estrategias de blindaje convencionales para mejorar la citotoxicidad, la supervivencia y la proliferación de las células T V δ 1 modificadas con CAR blindadas. Con este fin, se realizó un ensayo de citotoxicidad durante la noche, un ensayo de supervivencia y un ensayo de estimulación de antígeno repetido (utilizando células diana NALM-6) mediante productos farmacéuticos recién descongelados.

[0281] En el ensayo de citotoxicidad durante la noche, las células T CAR+ V δ 1+ blindadas convencionalmente demostraron una actividad lítica comparable a las células T V δ 1 modificadas con CAR sin blindaje (Figura 3A). La Figura 3B muestra que, en ausencia de IL-15 exógena, las células sin blindaje y blindadas con sIL-15 no sobrevivieron. Por el contrario, blindar las células con mbIL-15 dio como resultado una mejora marginal en la supervivencia celular, evaluada mediante citometría de flujo (población de linfocitos viables).

[0282] Sorprendentemente, en el ensayo de estimulación de antígeno repetido, en presencia de IL-15, ninguna de las células T CAR+ V δ 1+ blindadas con IL-15 convencionales se enriqueció (Figura 3C). Fuera de nota, se observó el mismo fenómeno en ausencia de IL-15 en el ensayo RAS (datos

no mostrados). Esto contrastó notablemente con las células no blindadas, que se enriquecieron continuamente en células T V δ 1 modificadas con CAR tras repetidas exposiciones con NALM-6. En general, los resultados sugieren que las células blindadas con construcciones de blindaje de IL-15 convencionales retienen su capacidad de matar pero pierden la capacidad de expandirse y enriquecerse al captar la célula objetivo. Los datos también demuestran que las estrategias convencionales (sIL-15) no mejoran o solo mejoran marginalmente (mbIL-15) la supervivencia de las células T V δ 1.

EJEMPLO 4: Reducir la concentración de IL-15 durante la etapa de expansión no rescata la proliferación de células T V δ 1 modificadas con CAR blindadas con mbIL-15

[0283] Para examinar con más detalle el efecto de la estrategia de blindaje de mbIL-15, se expandieron células T V δ 1 transducidas con CAR sin blindar y blindadas con mbIL-15 en presencia de concentraciones altas y bajas de IL-15 y se controló el factor de expansión de las células (Figura 4). De acuerdo con los resultados anteriores, tanto las concentraciones altas como las bajas de IL-15 apoyaron la expansión de las células T V δ 1+ no blindadas. Por el contrario, las células T CAR+ V δ 1+ blindadas con mbIL-15 no lograron enriquecerse incluso con una dosis de IL-15 10 veces menor. En general, los resultados sugieren que las células blindadas con mbIL-15 pierden la capacidad de responder a la IL-15 exógena y la proliferación de las células blindadas no puede rescatarse mediante la reducción de la dosis de IL-15 durante el proceso de expansión.

EJEMPLO 5: la transferencia de cadena de IL-15R β restaura la proliferación de células T V δ 1 modificadas con CAR blindadas con mbIL-15

[0284] Para simplificar el contexto, IL-2R β se denominará IL-15R β en todo el documento.

[0285] Como las células mbIL-15 blindadas demostraron una proliferación insignificante tanto en presencia de IL-15 exógena (Figura 2A y 4) como durante la exposición repetida al antígeno (Figura 3C), planteamos la hipótesis de que la sobreexpresión de la cadena β común podría restaurar la proliferación de las células transducidas.

[0286] Primero, probamos si las células T V δ 1 derivadas de sangre expandidas expresaban niveles detectables de la cadena β de IL-15R en su superficie. El análisis de citometría de flujo de alto rendimiento (LEGENDScreen) reveló que las células T V δ 1 no modificadas no expresaban las cadenas IL-15R α o IL-15R β . (Figura 5). Por el contrario, las células T V δ 1 demostraron un nivel alto y una expresión uniforme de la cadena γ común.

[0287] Habiendo demostrado que las células T V δ 1 expresan una cantidad insignificante de la cadena β de IL-15R en su superficie, pasamos a establecer el efecto de la coexpresión de IL-15R β y la cadena α de IL-15R unida a IL-15 o sin mutaciones (Figura 1B y C). Con este fin, las células T V δ 1 en expansión se transdujeron con construcciones CAR blindadas con IL-15 unida a la membrana (mbIL-15 = α .IL-15), IL-15 unida a la membrana e IL-15R β (α .IL-15. β) y las cadenas IL-

15R α y β (IL-15. α . β). Las células transducidas se expandieron posteriormente en presencia de IL-15 exógena y se controló continuamente el factor de expansión durante el proceso de expansión. La Figura 6A demuestra el factor de expansión de las células T CAR+ V δ 1+ blindadas a lo largo del tiempo. Los datos revelaron que la transducción de las células con la cadena β de IL-15R restaura la proliferación de células T CAR+ V δ 1+ blindadas con cadena de IL-15R α (tanto unidas a IL-15 como sin mutaciones). Sorprendentemente, en presencia de IL-15 exógena, las células que coexpresan la cadena α y β de IL-15R demostraron un factor de expansión significativamente mayor que las células que expresan la cadena β y IL-15 unidas. De manera significativa, las células que coexpresan la cadena β y la IL-15 unidas mostraron un factor de expansión comparable a las células no blindadas (Figura 6A, triángulos frente a círculos). Este fenómeno se observó sistemáticamente a través de dos dosis diferentes de IL-15 (Figura 6B), demostrando claramente que la coexpresión de la cadena de IL-15R β rescata la expansión de células modificadas con mbIL-15 en respuesta a IL15 exógena.

EJEMPLO 6: Las cadenas α y β de IL-15R que coexpresan las células T V δ 1 modificadas con CAR son citotóxicas y proliferan durante la exposición repetida al antígeno

[0288] Habiendo establecido que la coexpresión de las cadenas α y β de IL-15R podría restaurar la proliferación de células T V δ 1+ modificadas con CAR inducida por IL-15 exógena, a continuación investigamos la funcionalidad de las células modificadas. La Figura 7A muestra resultados representativos de citotoxicidad a corto plazo (durante la noche) de dos donantes. El blindaje de las células T V δ 1 con los componentes adicionales de la cadena IL-15R no provocó ningún efecto perjudicial sobre la actividad citotóxica de las células. De manera significativa, las células que coexpresan la cadena β demostraron una citotoxicidad comparable a las células blindadas mbIL-15. [0289] La siguiente etapa estableció si las células T V δ 1 que coexpresan las cadenas α y β de IL-15R transducidas con CAR podrían enriquecerse tras la estimulación de antígeno repetida con células de leucemia linfoblástica aguda CD19+ NALM-6. Con este fin, se cocultivaron productos farmacéuticos blindados recién descongelados con células diana NALM-6 en presencia (10 ng/mL) o ausencia de IL-15 exógena como se describe en la sección de métodos. Las células efectoras se volvieron a estimular con células diana frescas cada 3-4 días. Se controló el factor de expansión y enriquecimiento de los efectores CAR+ V δ 1+, así como la eliminación de células diana, durante el transcurso del ensayo.

[0290] Como se demostró antes (Figura 3C), las células T CAR+ V δ 1+ blindadas con mbIL-15 convencionales no proliferaron en ninguna de las condiciones examinadas (Figura 7B y 7C, panel izquierdo, cuadrados vacíos). Esto se reflejó en la rápida disminución del número de células T CAR+ V δ 1+. En comparación con las células blindadas mbIL-15, el número de células que coexpresan las cadenas α y β de IL-15R disminuyó aún más rápidamente en ausencia de IL-15 exógena (Figura 7B,

panel izquierdo, cuadrados negros). Por el contrario, en ausencia de IL-15, las células que coexpresan la cadena β y la IL-15 unidas (α .IL-15) se enriquecieron durante el transcurso del ensayo (Figura 7B, paneles izquierdo y central, triángulos). Estos resultados demuestran que en ausencia de IL-15 exógena, la IL-15 unida sirve como una señal inductora de proliferación y supervivencia para las células que coexpresan IL-15R α y β . La enumeración de los números de células diana restantes en el transcurso del ensayo reveló que solo las células que coexpresaban la cadena β de IL-15 e IL-15R unidas pudieron demostrar un control tumoral a largo plazo (Figura 7B, panel derecho, triángulos).

[0291] Sorprendentemente, en presencia de niveles suprafisiológicos de IL-15 (10 ng/ml), las células que coexpresan IL-15R α y β demostraron una mayor expansión en comparación con las células que coexpresan IL-15 y cadena β unidas (Figura 7C, panel izquierdo). Estos datos sugieren que la disponibilidad de IL-15 exógena podría estar ajustando la actividad de las células que coexpresan la cadena β y la IL-15 unida. En general, la coexpresión de la cadena β de IL-15R no afectó negativamente a la citotoxicidad celular y, lo que es más importante, demostró que, en el contexto de la IL-15 anclada, se podía lograr el control del tumor durante un período prolongado en ausencia de IL-15 exógena.

EJEMPLO 7: Las células T V δ 1 que coexpresan las cadenas α y β de IL-15R demuestran una mayor expansión en presencia de IL-15 exógena que las células que expresan la cadena β sola

[0292] Habiendo demostrado que la presencia de la cadena β de IL-15R es necesaria para restaurar la proliferación de las células T V δ 1 transducidas, el siguiente objetivo fue determinar si proteger las células con la cadena β sola podría impulsar la proliferación de las células. Para interrogar la función de la cadena β , las células T V δ 1 se transdujeron con una construcción CAR blindada con la cadena β de IL15R sola o en combinación con las cadenas IL-15R α o IL-15 unida a IL-15R α . La Figura 8A muestra el porcentaje de poblaciones de células T CAR+ V δ 1+ dos días después de la transducción (N=2 donantes representativos). Como se esperaba, la eficiencia de transferencia del gen CAR se correlacionó negativamente con el tamaño de la construcción del vector viral. En una multiplicidad fija de infección, la construcción de blindaje IL-15R β más pequeña (3150 pb) resultó sistemáticamente en mayores eficiencias de transducción de CAR que las construcciones de mayor (IL15R α . β o IL-15R α .15. β) tamaño (3993 pb y 4413 pb, respectivamente). La Figura 8B demuestra la expresión de los componentes de cadena individuales y la expresión de IL-15 dentro de la población de células T V δ 1 transducidas con CAR. De manera significativa, estos diagramas de flujo representativos demuestran que las células T V δ 1 modificadas con CAR expresan niveles equimolares de CAR y componentes de blindaje en su superficie.

[0293] Después de la transducción con las construcciones que coexpresan la cadena β de IL-15R

5 mencionadas anteriormente, se controló el número de células T CAR+ V δ 1+ durante el procedimiento de expansión celular. En línea con los experimentos previos (Figura 6A), las células que coexpresan la cadena α y β de IL-15R mostraron el mayor nivel de expansión seguidas por las células blindadas de la cadena β de IL-15R (sola) (Figura 9A). Para probar si la expansión de las células que expresan la cadena β dependía de la disponibilidad de IL-15 exógena, se repitió el procedimiento de expansión en presencia de concentraciones altas y bajas de IL-15. La Figura 9B muestra el factor de expansión de las células T CAR+ V δ 1+ blindadas con las tres construcciones diferentes que coexpresan la cadena β . Los datos demuestran que las células que coexpresan la cadena α y la cadena β de IL-15R se sensibilizaron más a la IL-15 exógena que las células que coexpresan la cadena β sola o la IL-15 unida.

EJEMPLO 8: Las células blindadas se enriquecen selectivamente durante el período de cultivo y muestran una expresión mejorada de DNAM-1 y NKp30

[0294] Después de la expansión, las sustancias farmacológicas transducidas se recolectaron, formularon y crioconservaron. Las eficiencias de transducción se determinaron tras la descongelación (Figura 10A). El análisis de citometría de flujo no reveló diferencias significativas en las eficiencias de transducción de CAR entre las diferentes condiciones de blindaje. En general, la expansión de las células mediante una dosis baja de IL-15 dio como resultado un ligero aumento en la proporción de células transducidas.

[0295] A continuación, se evaluó la expresión superficial de CAR y moléculas de blindaje individuales. La Figura 10B muestra que las células recién descongeladas conservaron una expresión superficial equimolar de moléculas de blindaje CAR e IL-15R.

[0296] La comparación de las eficiencias de transducción de CAR 3 días después de la transducción y al final del proceso de expansión reveló que las células blindadas se enriquecieron selectivamente durante el período de cultivo (Figura 10C). En particular, las células que coexpresan las cadenas α y β mostraron el mayor nivel de enriquecimiento entre el día 7 y el día 14 del período de cultivo. Este efecto fue aún más prominente en las condiciones de cultivo de alimentación bajas en IL-15. Por el contrario, las células modificadas con CAR sin blindaje no se enriquecieron durante el procedimiento de expansión. Las células en expansión demostraron una expresión de CAR en estado estacionario durante el proceso de cultivo. Esto respalda aún más el hallazgo de que las células blindadas con cadenas α y β de IL-15R se enriquecieron selectivamente durante el período de cultivo.

[0297] A continuación, pasamos a determinar la composición celular de las células. El análisis FACS no reveló diferencias cualitativas o cuantitativas significativas en términos de poblaciones de células T pan- $\gamma\delta$, V δ 1 $\gamma\delta$ y células T no $\gamma\delta$ (datos no mostrados).

[0298] La caracterización fenotípica de poblaciones de células T V δ 1 transducidas y no transducidas con CAR blindado reveló diferencias marginales en la expresión de NKG2D, NKp30, DNAM-1, PD-

1 y TIGIT (FIG. 10D).

[0299] En comparación con la población de células T V δ 1 no transducidas, la proporción del receptor de citotoxicidad natural, las células que expresan NKp30 se duplicó en la población que expresa CAR de todas las células blindadas, excepto las células que coexpresan la cadena β y la IL-15 unida a la membrana. De manera similar, se observó una mayor frecuencia de células activadoras que expresan el receptor DNAM-1 en la población de células blindadas que expresan CAR. Por el contrario, se observó la tendencia opuesta en el caso de las células T V δ 1 que expresan NKG2D: la proporción de células T V δ 1 que expresan NKG2D disminuyó marginalmente en la fracción celular que expresa CAR en comparación con la fracción no transducida. Estos datos sugieren que la coexpresión de la cadena β (en el contexto sin mutaciones y la cadena α de IL-15) podría preparar a las células hacia un fenotipo más citotóxico.

EJEMPLO 9: Las células T V δ 1 modificadas con construcciones de blindaje de IL-15 novedosas muestran una potencia comparable o mejorada

[0300] La actividad citotóxica de las nuevas células T V δ 1 modificadas con CAR blindadas con cadena β se evaluó en un ensayo de destrucción durante la noche en presencia y ausencia de IL-15 exógena. En el contexto de CAR dirigidas a CD19, cuando se dirigen a dianas tumorales que expresan CD19 (NALM-6), en ausencia de IL-15 (Figura 11A), las células blindadas no demostraron ninguna diferencia significativa en términos de potencia; sin embargo, en presencia de IL-15, hubo una tendencia hacia una actividad citotóxica mejorada en las células que coexpresan IL-15R α y β (Figura 11B).

[0301] Por el contrario, en ausencia de IL-15 exógena, IL-15 unida e IL-15R β que coexpresan, las células T CAR V δ 1 anti-CD123 (Figura 11D) o anti-mesotelina dirigida (Figura 11E) demostraron una citotoxicidad mejorada, en comparación con las células sin blindaje. Para comprobar más a fondo si el blindaje tuvo un impacto en la potencia de las células T V δ 1 en ausencia de la participación de CAR, se comparó la citotoxicidad a corto plazo de las células T V δ 1 modificadas con CAR CD19 sin blindaje y blindadas frente a dianas CD19 negativas (pero sensibles a las células T V δ 1) (MV4-11 o MOLM-13) (Figura 11C). Como se esperaba, la actividad citolítica de las células que coexpresan IL-15 e IL-15R β unidas mejoró significativamente.

EJEMPLO 10: Las células T V δ 1 modificadas con CAR que coexpresan la cadena β de IL-15 e IL-15R unidas sobreviven en ausencia de IL-15 exógena

[0302] La siguiente pregunta abordó si estas nuevas estrategias de blindaje podrían apoyar la supervivencia de las células T V δ 1 modificadas con CAR blindadas. Los productos farmacéuticos recién descongelados (n = 2 donantes) se colocaron en placas a 2E+06 células por ml en una placa de 96 pocillos en ausencia de soporte de citocinas exógenas. El número total de células viables y el

porcentaje de células T CAR+ V δ 1+ se controlaron en intervalos regulares durante dos semanas. La Figura 12A y 12C muestra que sólo las células que coexpresan IL-15 e IL-15R β unidas sobrevivieron y proliferaron. Las células que coexpresan IL-15R β sola y IL15R α y β murieron rápidamente en ausencia de soporte de IL-15 exógena. Esto se refleja en la rápida disminución del número total de células T CAR+ V δ 1+ y el porcentaje de linfocitos viables durante el ensayo (Figura 12A y 12D). La Figura 12C demuestra el porcentaje de células T CAR+ V δ 1+ a lo largo del tiempo. En este ensayo sólo se enriquecieron las células que coexpresaban la cadena β de IL-15 e IL-15R unidas. El análisis de citometría de flujo reveló que esto era una consecuencia de la rápida pérdida de la población de células T V δ 1 no transducidas, ya que en ausencia de IL-15 exógena las células no transducidas no podían sobrevivir (Figura 12B). Curiosamente, las células que coexpresan la cadena β de IL-15 e IL-15R unidas parecen ser capaces de soportar la supervivencia no transducida desde el día 3 hasta el final del ensayo (Figura 12B).

[0303] Para demostrar que el efecto del blindaje era independiente de la molécula CAR de elección, los experimentos anteriores se repitieron con células T V δ 1 blindadas modificadas con CAR dirigidas a la mesotelina (Figura 15A). De hecho, las células CAR dirigidas a la mesotelina que coexpresan IL-15 e IL-15R β sobrevivieron 14 días después de la crioconservación, mientras que las células no blindadas disminuyeron rápidamente. Es importante destacar que el beneficio de supervivencia de las células blindadas siguió siendo el mismo, independientemente del tipo de aglutinante dirigido a la mesotelina (YP218 o P4) utilizado en la construcción CAR (Figura 15A). Estos resultados demuestran que los atributos funcionales proporcionados por la coexpresión de la cadena β de IL-15 e IL-15R unidas son independientes del CAR y/o los aglutinantes utilizados.

[0304] En general, los resultados demuestran que, en ausencia de IL-15 exógena, la coexpresión de IL-15R α y β es necesaria pero no suficiente para apoyar la supervivencia de las células T V δ 1 modificadas con CAR. Para lograr una supervivencia duradera de las células, la IL-15 debe estar unida a la cadena α de IL-15R.

EJEMPLO 11: La cadena β de IL-15 e IL-15R unidas que coexpresa las células T V δ 1 modificadas con CAR se enriquece tras la estimulación de antígeno repetido en presencia de niveles fisiológicos de IL-15

[0305] A continuación, se evaluó si la transferencia de la cadena β de IL-15R sola o en combinación con la cadena α de IL-15R era suficiente para impulsar el enriquecimiento selectivo de las células T V δ 1 modificadas con CAR durante la exposición repetida al tumor. Además, también se investigó si las concentraciones fisiológicas (pg/mL) de IL-15 podrían apoyar el crecimiento de células blindadas. Para ello, el ensayo de estimulación de antígeno repetido se realizó en presencia de dos concentraciones de IL-15: suprafisiológica (10 ng/mL) y fisiológica (70 pg/mL).

[0306] La Figura 13A-13C (panel izquierdo) muestra que a concentraciones suprafisiológicas de IL-15, las construcciones de blindaje pudieron apoyar la proliferación y el enriquecimiento de células T V δ 1 modificadas con CAR, siendo IL-15R α . β e IL15-R β las más efectivas. De acuerdo con esto, las células modificadas con CAR blindadas pudieron eliminar las exposiciones repetidas de las células NALM-6 durante la duración del ensayo (Figura 11C).

[0307] Esto contrastaba notablemente con los resultados mediante una concentración fisiológica (pg/mL) de IL-15 (Figura 13D-13F, panel derecho). En presencia de una concentración baja de IL-15, solo las células que coexpresaban la cadena IL-15 e IL-15R. β unida a la membrana pudieron proliferar y enriquecerse continuamente (Figura 11D y 11E). No obstante, en presencia de una concentración fisiológica de IL-15, estas células demostraron una expansión global menor que la observada en presencia de una concentración suprafisiológica de IL-15.

[0308] Después de tres rondas de exposición al tumor, tanto la cadena β sola como las cadenas α y β que coexpresan el número de células T blindadas V δ 1 disminuyó rápidamente. Esto coincidió con la pérdida del control del tumor y el crecimiento de células diana NALM-6. Sorprendentemente, este no fue el caso con las células que coexpresaban la cadena β de IL-15 e IL-15R unidas a la membrana que mantuvieron la capacidad de eliminar exposiciones repetidas de células NALM-6.

[0309] Para demostrar que el efecto del blindaje era independiente de la molécula CAR de elección, los experimentos anteriores se repitieron con CAR anti-mesotelina que expresaban células T V δ 1 blindadas con cadenas IL-15 e IL-15R unidas β sin blindaje (Figura 15B-15E). La Figura 15B demuestra que, en ausencia de IL-15 exógena, las células T Meso-CAR blindadas con cadena β de IL-15 e IL-15R unidas fueron capaces de controlar exposiciones repetidas de células A549 que expresan mesotelina. Es importante destacar que los hallazgos anteriores no se vieron influenciados por la elección del aglutinante de mesotelina (YP218 o P4). Además, el control tumoral mejorado exhibido por las células T CAR blindadas con cadena β de IL-15 e IL-15R unidas no se correlacionó con la proliferación de las células. En cambio, el potencial de proliferación parecía estar impulsado por la propia molécula CAR y fue específico del aglutinante utilizado. Se observó proliferación cuando se usó el aglutinante YP218 pero no con el aglutinante P4 (Figura 15C). Las células T CAR P4 blindadas con cadena IL-15R β también fueron capaces de proporcionar un control tumoral superior en el transcurso de exposiciones tumorales repetidas en presencia de niveles bajos de IL-15 (1 ng/ml) (Figura 15D). La funcionalidad mejorada se correlacionó significativamente con una mayor sensibilidad a la IL-15 exógena y una mayor proliferación en el transcurso de exposiciones tumorales repetidas (Figura 15E).

[0310] Estos resultados demuestran claramente que, a una concentración fisiológica de IL-15, las células que expresan la cadena β de IL-15 e IL-15R unidas a la membrana pueden proliferar, sobrevivir y demostrar un control tumoral productivo.

EJEMPLO 12: Estudio de eficacia *in vivo* de NALM-6 mediante ratones NSG y NOG-IL15

[0311] Para confirmar los hallazgos *in vitro*, se evaluó la eficacia *in vivo* de los productos farmacológicos en un modelo de tumor sistémico NALM6-FLuc, donde se realizó un seguimiento de la carga tumoral mediante imágenes de bioluminiscencia no invasivas (BLI) dos veces por semana (Figura 14A). Cada producto farmacológico se evaluó en tres condiciones: ratones NSG que recibieron una dosis diaria de 1 µg de IL-15 (Figura 14B), ratones NSG sin IL-15 exógena (Figura 14C) o ratones transgénicos NOG IL-15 (Taconic, hIL-15 NOG (modelo #13683), Figura 14D). En presencia de IL-15 exógena, las tres construcciones proporcionaron un control tumoral equivalente, demostrando todos los grupos un BLI equivalente al antecedente a los 6 días después de la dosificación (día 13 del estudio) (Figura 14B). En el ratón NOG transgénico, donde las concentraciones de IL-15 en sangre periférica están cerca de los niveles fisiológicos humanos (~50 pg/mL), todos los grupos demostraron nuevamente un control tumoral equivalente (Figura 14D). Sin embargo, en ausencia de IL-15 exógena, mientras que todas las construcciones pudieron controlar el crecimiento tumoral hasta cierto punto, solo la construcción blindada muCAR19.α.15.β pudo reducir la carga tumoral por debajo de niveles detectables a los 10 días después de la dosificación (día 17 del estudio) (Figura 14C).

[0312] Los ratones satélite también se sacrificaron 3 días después de la dosificación (día 10 del estudio) para evaluar las cantidades relativas de células Vδ1+ y CAR+. En presencia de IL-15 exógena, todas las construcciones fueron comparables, tanto en términos de cantidad total de células (Figura 14E) como en el porcentaje de células que expresan CAR en comparación con el producto farmacológico antes de la inyección (Figura 14F). En ausencia de IL-15 exógena, los ratones dosificados con muCAR19.α.15.β tenían cantidades equivalentes de células Vδ1+, CAR+, pero con una pérdida de células CAR- no transducidas, observada como una pérdida de cantidades absolutas de células CAR-, y un aumento en Vδ1+ CAR%, lo que demuestra una ventaja de supervivencia en el compartimento blindado. Esta ventaja de supervivencia en ausencia de IL-15 se mejoró aún más al final del estudio, 13/14 días después de la dosificación (Figura 14J), con los ratones dosificados con muCAR19.α.15.β demostrando un exceso de supervivencia de más de 100 veces de células T CAR+ Vδ1 en comparación con los ratones dosificados con muCAR19.α.β y muCAR19.β (Figura 14L). Este aumento de la supervivencia también se asoció con una ausencia total de células tumorales NALM-6 residuales detectables en la médula ósea de ratones que recibieron dosis de muCAR19.α.15.β, mientras que muCAR19.α.β y muCAR19.β tuvieron una media de cientos, o miles de células NALM6 residuales (respectivamente) en la médula ósea recolectadas de los fémures posteriores (Figura 14M). En presencia de IL-15 exógena, los 3 grupos de tratamiento mostraron un aumento en las células T CAR+ y CAR-Vδ1 desde el día 3 posterior a la dosificación (Figura 14K frente a Figura 14E). La mayor proporción de células CAR+ al final del estudio se

observó en los ratones dosificados con muCAR19.β (Figura 14J), mientras que otros grupos mostraron una proporción de CAR relativa sin cambios (muCAR19.α.β) o reducida (muCAR19.α.15.β). Las tendencias observadas en el control de tumores NALM6 en función de datos de imágenes de todo el cuerpo no cambiaron con la adquisición de un punto de tiempo adicional (10 frente a 12 días después de la dosificación): ratones NSG dosificados diariamente con 1 μg de IL-15 (Figura 14B frente a Figura 14G), ratones NSG sin IL-15 exógena (Figura 14C frente a Figura 14H) o ratones transgénicos NOG IL-15 (Taconic, hIL-15 NOG (modelo n.º 13683), Figura 14D frente a Figura 14I).

[0313] En general, estos resultados demuestran que todas las construcciones son potentes y capaces de controlar la enfermedad en el modelo NALM6 en presencia de IL-15 exógena o expresada transgénicamente, pero en su ausencia, el muCAR19.α.15.β es el único capaz de reducir el tumor residual por debajo de los niveles detectables.

EJEMPLO 13: Estudio de eficacia in vivo de A549-MSLN mediante ratones NSG

[0314] Para confirmar los hallazgos *in vitro* obtenidos con las células T CAR Vδ1 blindadas dirigidas a la mesotelina, se evaluó la eficacia in vivo de los productos farmacéuticos en un modelo de tumor diseminado A549-Meso-FLuc. Se implantaron ratones NSG de 6-8 semanas de edad con 1×10^6 células A549-MSLN-fluc-GFP mediante inyección intravenosa (IV). En el día 19 después de la implantación, a los ratones se les inyectó vehículo (n = 7, Cryostor CS5, grupo 1), células T CAR γδ P4 no blindadas a 10 millones de células totales por ratón (n = 7, grupo 2), células T CAR P4 α.15.β γδ a 10 millones de células totales por ratón (n = 7, grupo 3) o células T CAR P4β γδ a 10 millones de células totales por ratón (n=7, grupo 4). La carga tumoral se rastreó mediante formación de imágenes por bioluminiscencia no invasiva (BLI) dos veces por semana (Figura 16A). La Figura 16B muestra que, en ausencia de IL-15 exógena, las células T CAR Vδ 1 P4 α.15.β blindadas demostraron un mayor control tumoral que las células T CAR V δ1 P4 sin blindaje, con ratones tratados con P4 α.15.β que tenían una Señal BLI más de 10 veces más baja en promedio que los ratones que recibieron dosis de células sin blindaje al final del estudio (día 19 después de la dosificación). De acuerdo con los experimentos in vitro, en presencia de IL-15, las células T CAR γδ blindadas β demuestran una cinética inicial de eliminación del tumor más rápida, pero un control tumoral comparable en general al del brazo tratado con las células γδ CAR T blindadas α.15.β (sin soporte de IL-15).

Otras modalidades

[0315] Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan en la presente mediante referencia en la misma medida que si cada publicación o solicitud de patente independiente se indicara de forma individual y específica

como incorporada mediante referencia.

[0316] Si bien la invención se ha descrito en conexión con modalidades específicas de esta, se comprenderá que pueden realizarse modificaciones adicionales y que se pretende que la presente solicitud abarque cualquier variación, uso o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo desviaciones con respecto a la presente descripción que se encuentran dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y pueda aplicarse a las características esenciales establecidas anteriormente en la presente y a continuación dentro del alcance de las reivindicaciones.

[0317] Otras modalidades se encuentran en las reivindicaciones.