

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 217**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

A61K 35/14 (2015.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2013 PCT/NL2013/050235**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13147606**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2013 E 13716461 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2831109**

54 Título: **Intercambio combinatorio de cadena receptora de célula T y 9 ̢2**

30 Prioridad:

28.03.2012 US 201261616440 P
21.09.2012 US 201261703788 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2018

73 Titular/es:

GADETA B.V. (100.0%)
Yalelaan 46
3584 CM Utrecht, NL

72 Inventor/es:

KUBALL, JÜRGEN HERBERT ERNST y
GRÜNDER, ELSA-CORDULA

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 659 217 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Intercambio combinatorio de cadena receptora de célula T y $\gamma\delta 2$.

5 Campo de la invención

[0001] La invención es del campo de la medicina.

Se refiere a inmunología y a terapia celular para el tratamiento contra el cáncer.

10 La invención se refiere además a los métodos de identificación de receptores de célula T, en particular receptores de célula T que pueden mediar respuestas antitumorales.

La invención se refiere además a receptores de células T específicos que median respuestas antitumorales y usos de los mismos, en el tratamiento contra el cáncer.

Estado de la técnica

15

[0002] Hasta el momento, el trasplante de células madre alogeneica (allo-SCT) es la única terapia celular curativa bien establecida y probada para pacientes que padecen de cáncer.

Esto se demuestra por la observación de que se pueden conseguir remisiones a largo plazo, en particular, en pacientes allo-SCT con un "riesgo pobre" de leucemia.

20 Sin embargo, la polimerización tiene un precio de toxicidad severa, dando como resultado una mortalidad en general de aproximadamente 30% de pacientes tratados.

Esto impide una implementación clínica extensa, ya que en particular pacientes con bajo riesgo de cánceres pueden tener una supervivencia buena en general que no justifica tales terapias agresivas.

Por lo tanto, permanece el objetivo definitivo de desarrollar un método de trasplante no agresivo.

25 Esto significa la generación de productos celulares equipados con características moleculares que permiten actuar sobre la célula cancerosa de forma selectiva mientras se preservan los tejidos sanos.

Esto permitiría un tratamiento curativo a un gran número de pacientes con necesidad médica, sin tener en cuenta la edad.

30 [0003] Para diseñar un trasplante, que puede ser alogénico o autólogo, para facilitar la generación rápida de por ejemplo células $T\alpha\beta$ reactivas al tumor, se ha propuesto reprogramar células $T\alpha\beta$ con genes que codifican un receptor de células $T\alpha\beta$ específicas del tumor (TCR) o un receptor antígeno quimérico.

Varios de tales receptores ya se están usando para redirigir las células $T\alpha\beta$ en las pruebas clínicas de fase I.

35 Sin embargo, la reprogramación de las células $T\alpha\beta$ con TCR $\alpha\beta$ definidos se impide sustancialmente por su restricción a tipos HLA y así se limita el número de pacientes que pueden estar tratados con un TCR $\alpha\beta$.

Además, el par de cadenas TCR $\alpha\beta$ introducidos con cadenas TCR $\alpha\beta$ endógenas puede inducir a la auto-reactividad que amenaza a la vida.

40 [0004] Se ha propuesto mediar una reactividad antitumoral selectiva con una alta afinidad TCR utilizando la capacidad de células T $\gamma\delta 2$ de mediar la reactividad antitumoral mientras se ignora el ambiente sano (Fisch et al., 1990, Science 250,1269-1273).

Las células T $\gamma\delta 2$ aisladas pueden matar eficazmente células tumorales de neoplasias hematológicas y tumores sólidos (Kabelitz et al., 2007, Cancer Res. 67,5-8).

45 Sin embargo, la función y capacidad de proliferación de células T $\gamma\delta 2$ se ha dañado frecuentemente fuertemente en pacientes con cáncer, de forma que se han hecho las células T $\gamma\delta 2$ autólogas menos atractivas para intervenciones inmunitarias.

Las células T con un TCR $\gamma\delta$ con una mutación en el residuo de aminoácido 97 puede enlazar células tumorales en concreto ováricas (Xi et al., 2010, Internacional Immunology, 22, 299-306).

50 Se ha propuesto transferir un TCR $\gamma\delta 2$ definido en células $T\alpha\beta$, que media una proliferación específica del tumor de células $T\alpha\beta$ y redirige subconjuntos de células $T\alpha\beta$ efector CD8+ y auxiliar CD4+ contra un panel ancho de líneas celulares tumorales mientras se pueden ignorar células normales *in vitro* e *in vivo* (Marcu-Malina et al., 2011, Blood 118, 50-59).

55 Sin embargo, un pequeño conocimiento está disponible acerca de cómo TCR $\gamma\delta 2$ median la actividad diferente contra las células tumorales y qué estrategia se necesita usar para aislar TCR $\gamma\delta 2$ con actividad alta frente a las células cancerosas.

[0005] Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de proveer TCR $\gamma\delta 2$ con actividad alta contra las células cancerosas y hay una necesidad en la técnica de proporcionar métodos mejorados para la selección de tales altamente activos TCR $\gamma\delta 2$.

60

Resumen de la invención

[0006] La divulgación actual proporciona métodos para identificar receptores celulares T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta 2$) que median respuestas antitumorales.

Como se ha dicho, se sabe poco sobre los requisitos moleculares de un TCR $\gamma\delta 2$ para mediar la reactividad antitumoral.

Especialmente, la aportación de la variabilidad en las regiones de determinación complementaria (CDR) del TCR $\gamma\delta 2$ para mediar respuestas antitumorales se consideró como insignificante en la técnica. Sorprendentemente, se descubrió que las CDR3 regiones de la cadena receptora de célula T $\gamma 9T$ (cadena TCR $\gamma 9$) y la cadena receptora de célula T $\delta 2$ (cadena TCR $\delta 2$) son de importancia.

Basado en estas conclusiones, el intercambio combinatorio de cadena $\gamma\delta CR$ (CTE) se propone como un método eficaz para la identificación de TCR $\gamma\delta 2$ que median respuestas antitumorales.

En los métodos de la divulgación, las regiones CDR3 de la cadena receptora de célula T $\gamma 9T$ y la cadena receptora de la célula T $\delta 2$ se modifican y se combinan de forma aleatoria para formar un nuevo TCR $\gamma\delta 2$. El recién diseñado TCR $\gamma\delta 2$ se proporciona y preferiblemente se integra en células T, que se expresa posteriormente un TCR $\gamma\delta 2$ en la superficie celular.

Por consiguiente, se determina la respuesta antitumoral de las células T diseñadas de CTE.

De esta manera, se pueden evaluar combinaciones múltiples y para cada combinación se puede determinar la respuesta antitumoral.

Después de la determinación de la respuesta antitumoral, los receptores celulares T $\gamma\delta 2$ que median respuestas antitumorales altamente activas se pueden identificar.

Utilizando el método de la divulgación, tal como se describe en los ejemplos, ya se identificaron diferentes TCR $\gamma\delta 2$ sensibles que median respuestas antitumorales aumentadas en comparación con la referencia TCR $\gamma\delta 2$ G115wt.

Por lo tanto, la invención proporciona además TCR $\gamma\delta 2$ o fragmentos de los mismos, que se pueden utilizar por ejemplo en diagnósticos o el tratamiento contra el cáncer.

La invención proporciona además secuencias de ácidos nucleicos, constructos genéticos y vectores retrovíricos que pueden utilizarse para expresar los TCR $\gamma\delta 2$ en células, preferiblemente células T, según la invención.

Figuras

[0007]

Figura 1: reactividad antitumoral mediada por TCR $\gamma\delta 2$.

Las células T de sangre periféricas fueron transducidas de forma vírica con TCR $\gamma\delta 2$ indicados tipo salvaje o CTE TCR $\gamma\delta 2$ diseñados y evaluados frente a Daudi (A; C) en un ensayo de liberación ^{51}Cr (E:T 3:1).

La lisis específica se indica como cambio múltiplo de liberación ^{51}Cr medida en el sobrenadante después de 5h.

El cambio múltiplo fue calculado cuando se compara con reactividad de $\gamma 9$ -G115wt/ $\delta 2$ -G115wt células T diseñadas. (B; D) en un IFN γ ELISA en presencia de cantidades indicadas de pamidronato o proporciones (E) diferentes E:T. (F) Los porcentajes de conjugados de célula-célula de Daudi y células T diseñadas con TCR $\gamma\delta 2$ indicado se determinaron por citometría de flujo.

Los datos representan el medio \pm SD. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 por 1-vía ANOVA.

Figura 2: expresión TCR $\gamma\delta 2$ y avidéz funcional de células T transducidas que expresan cadena L2 única de alanina de clon G115.

Las células T de sangre periférica fueron transducidas de forma vírica con cadenas indicadas TCR $\gamma 9$ y $\delta 2$ y (A) analizadas por citometría de flujo utilizando un anticuerpo de cadena $\delta 2$ específica.

Se muestra el cambio múltiplo en el medio de intensidad fluorescente (MFI) en comparación con la expresión de control de tipo salvaje $\delta 2$ -G115wt. (C) La actividad lítica de transductantes fue evaluada en un ensayo de liberación ^{51}Cr contra el tumor diana Daudi (E:T 10:1).

La lisis específica se indica como liberación de cambio múltiplo ^{51}Cr medida en el sobrenadante después de 5h.

El cambio múltiplo se calculó en comparación con la reactividad de tipo salvaje no mutada ($\delta 2$ -G115wt). Las flechas indican mutaciones en $\delta 2$ -G115 que alteraron la expresión receptora (flechas discontinuas) o avidéz funcional (flechas sólidas). (B; D) Estructura de cristal de TCR $\gamma\delta 2$ G115 indica los aminoácidos pertinentes (flechas).

Figura 3: expresión TCR $\gamma\delta 2$ y avidéz funcional de células T transducidas que expresan TCR $\gamma\delta 2$ G115 con mutaciones de longitud $\delta 2$ -CDR3.

La expresión (A) TCR $\gamma\delta 2$ de transductantes indicados fue analizada por citometría de flujo utilizando un anticuerpo pan TCR $\gamma\delta$.

Se muestra el cambio múltiplo en la intensidad fluorescente media (MFI) en comparación con la expresión de control de tipo salvaje $\delta 2$ -G115wt. (B) La secreción IFN γ de células T transducidas $\delta 2$ -G115_{LM} contra el tumor diana Daudi (E:T 1:1) se midió por ELISA después de 24h de incubación en presencia de pamidronato de 100 μ M.

Se muestra el cambio múltiplo en producción IFN γ cuando se compara con la reactividad de expresión de transductantes peso $\delta 2$ -G115wt. (C) Los transductantes que expresan $\delta 2$ -G115_{LM0,1,4,12} fueron evaluados en un ensayo de titulación frente al tumor diana Daudi con cantidades en aumento de pamidronato como se ha indicado.

La producción IFN γ se midió después de 24h por ELISA. (D) $\delta 2$ -G115_{LM} generados se unieron en una búsqueda BLAST con TCR $\gamma\delta 2$ descritos en la base de datos IMGT.

Mostrado está el número de citas en comparación con $\delta 2$ -G115_{LM} de longitud δ CDR3 similar. (E) Transductantes con $\delta 2$ -G115_{LM2,4,6} fueron comparados uno junto a otro con transductantes que expresan TCR $\gamma\delta 2$ individuales de la misma longitud δ CDR3.

La secreción de células T transducidas IFN γ contra el el tumor diana Daudi (E:T 1:1) se midió por ELISA después de 24h en presencia al pamidronato de 100 μ M.

Se muestra el cambio múltiplo en la producción IFN γ y en comparación con la reactividad de transductantes que expresan wt $\delta 2$ -G115_{wt}.

Los datos representan el medio \pm SD. **p<0,01; ***p<0,001 por 1-vía ANOVA. (F) estructura cristalina de TCR $\gamma\delta 2$ G115; la región que fue usada para extensiones de alanina dentro de δ CDR3 se muestra en blanco, δ CDR3 residual en verde, cadena δ en azul, cadena γ en marrón.

Figura 4: avidéz funcional de células T transducidas de expresión TCR $\gamma\delta 2$ G115 con mutaciones de longitud CDR3 $\gamma 9$.

(A) células T de sangre periférica fueron de forma vírica transducidas con cadenas TCR $\gamma 9$ y $\delta 2$ indicadas.

La actividad lítica de transductantes fue comparada una con otra para células T que expresan TCR $\gamma\delta 2$ individual de la misma longitud $\gamma 9$ CDR3.

La lisis específica se indica como cambio múltiplo liberación ^{51}Cr medida en el sobrenadante después de 5h.

Los datos representan el medio \pm SD. **p<0,01 por 1-vía ANOVA. (B) Estructura cristalina de TCR $\gamma\delta 2$ G115 indica $\gamma 9$ CDR3 en gris incluyendo los aminoácidos $\gamma 9$ -G115_{A109}; $\gamma 9$ -G115_{Q110} y $\gamma 9$ -G115_{Q111} (flechas rojas), δ CDR3 se muestra en verde; cadena δ en azul; cadena γ en marrón.

Figura 5: reactividad antitumoral de células T transducidas con TCR $\gamma\delta 2$ diseñados CTE *in vitro*.

Las células T de sangre periféricas fueron transducidas de forma vírica con TCR $\gamma\delta 2$ indicados y evaluados contra las líneas celulares tumorales indicadas y tejido de control sano. (A) Los transductantes fueron incubados con células diana (E:T 1:1) en presencia de pamidronato de 10 μ M.

La producción IFN γ se midió después de 24h por ELISA. Los datos representan el medio \pm SD. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 por 1-vía ANOVA. (B) Los transductantes fueron incubados con dianas marcadas como tumores llenadas con ^{51}Cr (E:T 10:1).

El porcentaje de lisis específica se determinó por liberación ^{51}Cr medida en el sobrenadante después de 5h. (C) Las células T diseñadas CTE fueron evaluadas contra los blastos AML primarios y células originales sanas en un ensayo de ELISPOT IFN γ (E:T 3:1) en presencia de pamidronato de 10 μ M.

Los datos representan el medio \pm SD. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 por 1-vía ANOVA.

Figura 6: la reactividad antitumoral de las células T transducidas con TCR $\gamma\delta 2$ diseñados CTE *in vivo*.

La avidéz funcional de células T que expresan TCR $\gamma\delta 2$ CTE $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt} o control TCR $\gamma\delta 2$ ($\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt}) fue estudiada en Rag2^{-/-} $\gamma\text{c}^{-/-}$ doble ratones noqueados (4-7 ratones por grupo).

Después de la irradiación del cuerpo total (2Gy) en el día 0, los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con 0.5x10⁶ Daudi-luciferasa o 5x10⁶ células RPMI8226/S-luciferasa y 10⁷ células T transducidas $\gamma\delta 2$ TCR CTE a día 1. Adicionalmente, 6x10⁵ UI IL2 en el IFA y pamidronato (10mg/kg de peso corporal) fueron inyectados a día 1 y cada 3 semanas hasta que el fin del experimento. (A,B) El crecimiento tumoral fue evaluado *in vivo* por formación de imágenes de bioluminiscencia (BLI) por medición de toda el área de ratones en ambos lados.

Los datos representan el medio de todos los animales medidos (Daudi: n=4, RPMI8226/S: n=7). *p<0,05; **p<0,01 por 1-vía ANOVA (Daudi: día 42; RPMI8226/S: día 35). (C) En general la supervivencia de ratones Daudi tratados fue monitoreada durante 72 días. *p<0,05; **p<0,01 por prueba de rango logarítmico.

La Figura 7. Intercambio combinatorio de cadena TCR $\gamma\delta$ (CTE)

Los clones celulares T $\gamma\delta 2$ individuales están aislados (A) y la secuencia de la cadena TCR $\gamma 9$ y TCR $\delta 2$ está determinada (B). Por el nuevo intercambio de cadena combinatorial TCR $\gamma\delta$, TCR $\gamma\delta 2$ están diseñados donde regiones $\gamma 9$ y $\delta 2$ CDR3 están modificadas de forma aleatoria (por ejemplo vía sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones y/o encogimiento o extensión de la CDR3 longitud) (C) y recién combinado (D). Posteriormente, nuevos TCR $\gamma\delta 2$ se introducen en células, preferiblemente, células T tales como células T $\alpha\beta$ (por ejemplo vía transducción utilizando un vector retrovírico que codifica las cadenas TCR $\gamma 9$ y TCR $\delta 2$) y células T diseñadas CTE se proporcionan (E). Finalmente, las células T diseñadas CTE se evalúan contra las células tumorales en ensayos funcionales para determinar TCR $\gamma\delta 2$ que median altas respuestas antitumorales. Por lo tanto, TCR $\gamma\delta 2$ por ejemplo con la respuesta antitumoral máxima y/o efectos secundarios mínimos se pueden seleccionar (F).

Definiciones:

[0008] En la siguiente descripción y se usan ejemplos de un número de términos.

Para proporcionar una comprensión clara y consistente de las especificaciones y reivindicaciones, con el alcance que se le da a tales términos, se proporcionan las definiciones siguientes.

A menos que se defina aquí de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados tienen el mismo sentido como se ha entendido comúnmente por un técnico en la materia a la que pertenece esta invención.

[0009] Los métodos de realización de las técnicas convencionales usados en métodos de la invención serán evidentes para el experto.

La práctica de técnicas convencionales en la biología molecular, bioquímica, química computacional, cultivo celular, ADN recombinante, bioinformática, genómicos, secuenciación y campos relativos son bien conocidos para los expertos en la técnica y se exponen, por ejemplo, en las siguientes referencias bibliográficas: Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, New York, 1987 and periodic updates; and the series *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego.

[0010] En este documento y en sus reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus conjugaciones se usan en un sentido no limitativo para indicar que los aspectos que siguen a la palabra están incluidos, pero los aspectos no mencionados en concreto no están excluidos.

Abarca las estructuras "consiste esencialmente en" al igual que "consiste en".

[0011] Como se utiliza en este caso, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Por ejemplo, un método para aislamiento "una" molécula de ADN, como se ha usado arriba, incluye el aislamiento de una pluralidad de moléculas (por ejemplo 10, 100, 1000, decenas de miles, 100 de miles, millones o más moléculas).

[0012] Alineación y alineamiento: el término "alineación" y "alineamiento" significa la comparación de dos o más secuencias de nucleótidos basadas en la presencia de extensiones cortas o largas de nucleótidos idénticos o similares.

Diferentes métodos para el alineamiento de secuencias de nucleótidos se conocen en la técnica, como serán adicionalmente explicados abajo.

El término "alineación" y "alineamiento" también significa la comparación de dos o más secuencias de aminoácidos basadas en la presencia de extensiones cortas o largas de aminoácidos idénticos o similares.

Diferentes métodos para el alineamiento de secuencias de aminoácidos se conocen en la técnica, como serán adicionalmente explicadas abajo.

[0013] "Expression de un gen" se refiere al proceso donde una región de ADN, que está operativamente enlazada a regiones reguladoras apropiadas, particularmente un promotor, se transcribe en un ARN, que es activo biológicamente, es decir, que es capaz de ser traducido en una proteína activa biológicamente o péptido (o fragmento de péptido activo) o que es activo por sí mismo (por ejemplo en el silenciamiento de gen postranscripcional o ARNi).

Una proteína activa en ciertos ejemplos de realización se refiere a una proteína que es constitutivamente activa.

La secuencia codificante es preferiblemente en la orientación de sentido y codifica una proteína activa deseada biológicamente o péptido, o un fragmento de péptido activo.

[0014] Como se utiliza en este caso, el término "operativamente enlazado" se refiere a una conexión de elementos de polinucleótido en una relación funcional.

Un ácido nucleico es "operativamente enlazado" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos.

Por ejemplo, un promotor o más bien una secuencia reguladora de transcripción está operativamente enlazada a una secuencia codificante si esta afecta a la transcripción de la secuencia codificante.

Operativamente enlazado significa que las secuencias de ADN que son enlazadas son contiguas típicamente y, donde es necesario unir dos o más regiones de codificación de proteína, contiguos y en el marco de lectura.

[0015] El término "construcción genética" significa una secuencia de ADN que comprende una región (región transcrita), que es transcrita en una molécula de ARN (por ejemplo un ARNm) en una célula, operativamente enlazada a regiones reguladoras adecuadas (por ejemplo, un promotor).

Así, una construcción genética puede comprender diferentes secuencias operativamente enlazadas, tal como un promotor, una secuencia líder 5' que comprende por ejemplo secuencias implicadas en la iniciación de traducción, una región de codificación de (proteína), donador de empalme y sitios aceptores, secuencias intrónicas y exónicas, y una secuencia no traducida 3' (conocida también como secuencia 3' no traducida o 3'UTR) que comprende por ejemplo sitios de secuencia de terminación de transcripción.

[0016] La "identidad" es una medida de la identidad de secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos. En general, las secuencias se alinean de modo que se obtiene la correspondencia de orden de máximo. "Identidad" de por sí tiene un significado reconocido en la técnica y se puede calcular utilizando técnicas publicadas.

Ver, por ejemplo: (COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; BIOCUMPETING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and SEQUENCE ANALYSIS PRIMER; Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991).

Mientras un número de métodos existen para medir la identidad entre dos polinucleótidos o secuencias polipeptídicas, el término "identidad" lo conocen bien los expertos (Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math (1988) 48:1073).

Los métodos empleados comúnmente para determinar la identidad o similitud entre dos secuencias incluyen, pero de forma no limitativa, aquellos descritos en la GUIDE TO HUGE COMPUTERS, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math (1988) 48:1073.

Los métodos para determinar la identidad y similitud se codifican en programas informáticos.

Los métodos de programa informático preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero de forma no limitativa, paquete de programa GCS (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research (1984) 12(1):387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. (1990) 215:403).

[0017] Como una ilustración, por un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que tiene al menos, por ejemplo, 95% de "identidad" a una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica un polipéptido de una secuencia determinada se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia polipeptídica de referencia.

Por lo tanto, el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos a una secuencia de nucleótidos de referencia se debe calcular sobre la longitud total de la secuencia de nucleótidos de referencia.

En otras palabras, para obtener un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos al menos 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia se pueden eliminar y/o sustituir con otro nucleótido, y/o un número de nucleótidos hasta 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia se pueden insertar en la secuencia de referencia.

Estas mutaciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier sitio entre aquellas posiciones terminales, dispersadas bien individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia.

[0018] De forma similar, por un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos, por ejemplo, 95% de "identidad" a una secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID N.º: 1 o 2 se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia de polipéptido puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácido por cada 100 aminoácidos del aminoácido de referencia de la SEQ ID N.º: 1 o 2. Por lo tanto, el porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos de referencia se debe calcular sobre la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia.

En otras palabras, para obtener un polipéptido con una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta 5% de los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia se puede eliminar o sustituir con otro aminoácido, o un número de aminoácidos hasta 5% de los residuos de aminoácidos totales en la secuencia de referencia se pueden insertar en la secuencia de referencia.

Estas alteraciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones de amino o carboxilo terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier sitio entre aquellas posiciones terminales, dispersadas bien individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia.

[0019] Un "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" según la presente invención puede incluir cualquier polímero u oligómero de pirimidina y bases de purina, preferiblemente citosina, timina, y uracilo, y adenina y guanina, respectivamente (ver Alberto L. Lehninger, Principles of Biochemistry, a 793-800 (Worth Pub. 1982).

La presente invención contempla cualquier desoxirribonucleótido, ribonucleótido o componente de ácido nucleico de péptido, y cualquier variante química de los mismos, tal como, formas metiladas, hidroximetiladas o glicosiladas de estas bases, y similar.

Los polímeros u oligómeros pueden ser heterogéneos u homogéneos en la composición, y se pueden aislar de fuentes de origen natural o se pueden producir artificialmente o sintéticamente.

Además, los ácidos nucleicos pueden ser de ADN o de ARN, o una mezcla de los mismos, y pueden existir permanentemente o transicionalmente en forma monocatenaria o bicatenaria, con homodúplex, heterodúplex y estados híbridos.

[0020] Como se utiliza en este caso, el término "promotor" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que funciona para controlar la transcripción de uno o más genes, arriba situados con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de transcripción del gen, y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para ARN polimerasa dependiente del ADN, sitios de iniciación de transcripción y cualquiera de las otras secuencias de ADN, que incluyen, pero no están limitadas a sitios de unión de factor de transcripción, represor y sitios de unión a proteínas activadoras, y cualquiera de las otras secuencias de nucleótidos conocidas por un experto en la técnica para actuar directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor.

Opcionalmente, el término "promotor" incluye aquí también la región 5' UTR (5' región no codificante) (por ejemplo, el promotor puede aquí incluir una o más partes aguas arriba (5') del codón iniciador de traducción de un gen, ya que esta región puede tener un papel en transcripción de reglaje y/o traducción).

Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en más tejidos con muchas condiciones fisiológicas y de desarrollo.

Un promotor "inducible" es un promotor que se regula fisiológicamente (por ejemplo por aplicación externa de ciertos compuestos) o de desarrollo.

5 Un promotor de "tejido específico" solo es activo en tipos específicos de tejidos o células.

Un "promotor activo in a particular tipo célula, por ejemplo, en células T" se refiere a la capacidad general del promotor para dirigir la transcripción dentro de tal tipo celular.

No tiene ninguna implicación sobre la actividad espaciotemporal del promotor.

10 [0021] Los términos "secuencia de aminoácido" o "proteína" o "péptido" se refieren a moléculas que consisten en una cadena de aminoácidos, sin referencia a un modo específico de acción, tamaño, estructura de 3 dimensiones u origen.

Un "fragmento" o "porción" del mismo se puede referir todavía como una "secuencia de aminoácido" o "proteína" o "péptido". En el contexto de la invención, un fragmento de un receptor de célula T $\gamma\delta 2$ como se reivindica es

15 capaz de enlazar con una célula tumoral.

Una "secuencia de aminoácido aislada" se utiliza para referirse a una secuencia de aminoácidos que ya no está en su ambiente natural, por ejemplo in vitro o en una célula bacteriana recombinante o huésped humana.

20 [0022] "Células diseñadas" se refiere aquí a células que han sido diseñadas, por ejemplo, por la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos exógena o alteración específica de una secuencia de gen endógeno.

Tal célula ha sido genéticamente modificada por ejemplo por la introducción de por ejemplo una o más mutaciones, inserciones y/o deleciones en el gen endógeno y/o inserción de una construcción genética en el genoma.

Una célula diseñada puede referirse a una célula en el aislamiento o en el cultivo.

25 Las células diseñadas pueden ser "células transducidas" donde las células han sido infectadas con por ejemplo un virus modificado, por ejemplo, se puede utilizar un retrovirus, tal como se describe en los ejemplos, pero otros virus adecuados también se pueden contemplar como tales lentivirus.

Los métodos no víricos también pueden ser usados, tales como transfecciones.

30 Así, las células diseñadas también pueden ser "células transfectadas de forma estable" o "células transfectadas de forma transitoria". La transfección se refiere a métodos no víricos para transferir ADN (o ARN) a células de manera que un gen sea expresado.

Los métodos de transfección son ampliamente conocidos en la técnica, tal como transfección de fosfato cálcico, transfección PEG y transfección liposómica o lipoplex de ácidos nucleicos.

35 Tal transfección puede ser transitoria, pero también pueden ser una transfección estable donde se pueden seleccionar células que tienen la construcción de gen integrada en su genoma.

40 [0023] "Modificación aleatoria" incluye secuencias aleatorias generadoras y también incluye la selección de regiones de codificación CDR3 $\delta 2$ y/o regiones de codificación $\gamma 9$ -CDR-3 que se producen en la naturaleza y pueden derivar de secuencias de receptor de célula T $\gamma\delta 2$ derivadas de sujetos, por ejemplo de seres humanos, tal como las descritas en la sección de ejemplo donde tales secuencias CDR3 $\gamma 9$ y CDR3 $\delta 2$ fueron seleccionadas a partir de una base de datos. La generación de secuencias aleatorias incluye la modificación uno o más aminoácidos en un inicio de secuencia CDR-3 $\gamma 9$ y CDR3 $\delta 2$, hasta el punto donde todos los aminoácidos de las secuencias de inicio pueden ser modificados.

45 La modificación de secuencias de aminoácidos se puede realizar por el cambio de secuencias de nucleótidos de un codón de manera que el aminoácido codificado por ese codón se altera.

50 [0024] El término "corresponde a" con respecto a secuencias de aminoácidos significa que cuando una secuencia se alinea con una secuencia de referencia que comprende una secuencia correspondiente, por ejemplo residuos de aminoácidos 50-70, los aminoácidos en alineación con los residuos de aminoácidos de ejemplo 50-70 son los residuos de aminoácidos de la una secuencia que corresponden.

Un ejemplo de un alineamiento donde aminoácidos correspondientes se alinean de regiones CDR3 $\gamma 9$ y CDR3 $\delta 2$ se representa en la tabla 3.

55 [0025] El término "marcador seleccionable" es un término familiar para un experto en la materia y se utiliza en este caso para describir cualquier entidad genética que, cuando se ha expresado, puede utilizarse para seleccionar una célula o células que contienen el marcador seleccionable.

Los productos de gen marcador seleccionable confieren por ejemplo resistencia antibiótica u otra característica seleccionable o un requisito nutricional.

60 Los marcadores seleccionables tal como se conocen bien en la técnica incluyen proteína verde fluorescente (GFP), eGFP, luciferasa, GUS y similar.

Descripción detallada de la invención

65 [0026] En un primer aspecto, la divulgación se refiere a un método para identificar receptores celulares T $\gamma\delta 2$ que median respuestas antitumorales que incluyen las etapas de:

- a) provisión de células T;
- b) proporción de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ que comprende una región de codificación CDR3 $\gamma 9$, donde la región de codificación CDR3 $\gamma 9$ se modifica de forma aleatoria y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica de una cadena receptora de célula T $\delta 2$ que comprende una región de codificación CDR3 $\delta 2$, donde la región de codificación CDR3 $\delta 2$ se modifica de forma aleatoria;
- c) introducción de las secuencias de ácidos nucleicos de la etapa b) en las células T para proveer unas células T diseñadas con un receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ que comprende la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ de la etapa b) y la cadena receptora de célula T $\delta 2$ de la etapa b);
- d) opcionalmente, repetición de las etapas b) y c);
- e) determinación de la respuesta antitumoral de las células T diseñadas previstas en las etapas c) y d);
- f) identificación de los receptores de célula T $\gamma 9\delta 2$ de las células T diseñadas que median respuestas antitumorales.

Las células T o linfocitos T pertenecen a un grupo de células blancas llamadas linfocitos, que juegan un papel en la inmunidad mediada de célula.

Las células T se originan de células madre hematopoyéticas en la médula ósea, maduras en el timo (que es de donde T se deriva) y ganan su función completa en tejidos linfoides periféricos.

Durante el desarrollo de células T, células T CD4-CD8-(negativas para el correceptor CD4 y CD8) son cometidas bien a un destino $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ como resultado de un reordenamiento de gen TCR β o δ inicial.

Las células que padecen un reordenamiento de cadena temprano β expresan una estructura pre-TCR compuesta por una cadena completa β y una cadena pre-TCR α en la superficie celular.

Tales células cambian a un estado CD4⁺CD8⁻, reordenan el locus de cadena TCR α y expresan un TCR $\alpha\beta$ maduro en la superficie.

Las células T CD4⁺CD8⁻ que exitosamente completan el reordenamiento de gen γ y antes de que el reordenamiento de gen β exprese un TCR $\gamma\delta$ funcional y permanezca CD4⁺CD8⁻. (Claudio Tripodo et al. Gamm delta T cell lymphomas Nature Reviews Clinical Oncology 6, 707-717 (December 2009).

El receptor de célula T se asocia con el complejo de proteína CD3.

Las células T maduras, es decir, la expresión de un TCR $\alpha\beta$ o un TCR $\gamma\delta$, expresan el complejo de receptor de célula T en la superficie celular.

Las células T $\gamma\delta$, que constituyen aproximadamente 1-5% de la población total de células T, se puede dividir en subpoblaciones adicionales.

Una sub-población de células T $\gamma\delta$ constituye células T $\gamma 9\delta 2$, que expresan un TCR $\gamma 9\delta 2$. En el dominio extracelular de un receptor de célula T se localizan tres regiones determinantes complementarias (CDR1, CDR2; CDR3).

Estas regiones son en general los dominios más variables y contribuyen significativamente a la diversidad entre TCR.

Las regiones CDR están compuestas durante el desarrollo de una célula T donde los denominados segmentos de gen Variables-(V), Diversos-(D) y de unión-(J) se combinan de forma aleatoria para generar diversos TCR.

[0027] Las células T $\alpha\beta$ se pueden definir con respecto a la función como linfocitos T que expresan un TCR $\alpha\beta$, que reconoce péptidos limitados a moléculas MHC (complejo mayor de histocompatibilidad), que se expresan en la superficie de varias células.

Los MHC presentan péptidos derivados de las proteínas de una célula.

Cuando por ejemplo una célula se infecta con un virus, el MHC presentará péptidos víricos y la interacción entre el complejo TCR $\alpha\beta$ y MHC activa tipos específicos de células T que inician respuestas inmunológicas para eliminar la célula infectada.

Por lo tanto, las células T $\alpha\beta$ se pueden definir funcionalmente como que son células capaces del reconocimiento de péptidos unidos a moléculas MHC. Las células T $\alpha\beta$ se pueden seleccionar de sangre periférica por ejemplo vía el antígeno CD3 como se describe abajo y en los ejemplos, ya que la mayoría de células T tienen el TCR $\alpha\beta$.

Las células T $\alpha\beta$ también se pueden seleccionar con un anticuerpo específico para el TCR $\alpha\beta$, tal como se ha descrito abajo.

De tales células seleccionadas, la secuencia de ácido nucleico (o aminoácido) que corresponde con la cadena de receptor de célula T α y la cadena de receptor de célula T β se puede determinar.

Por lo tanto, las células T $\alpha\beta$ también se pueden definir como que son células que comprenden una secuencia de ácido nucleico (o aminoácido) que corresponde a la cadena de receptor de célula T α y/o la cadena de receptor de célula T β .

[0028] Las células T $\gamma 9\delta 2$ pueden ser funcionalmente definidas en que estas se activan en concreto y rápidamente por un conjunto de precursores de isoprenoide fosforilado no peptídicos, nombrados colectivamente fosfoantígenos.

Los fosfoantígenos se producen por prácticamente todas las células vivas.

El fosfoantígeno más común encontrado en células animales y humanas (con células cancerosas) es pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). La activación de células T $\gamma 9\delta 2$ comprende expansión clonal, actividad citóxica y expresión de citocina. Las células T $\gamma 9\delta 2$ se definen también por expresión del receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$.

Por ejemplo, las células se pueden seleccionar utilizando un anticuerpo específico para el receptor de célula T $\gamma\delta 2$ tal como descritas abajo.

De tales células seleccionadas, se puede determinar la secuencia de ácido nucleico (o secuencia de aminoácidos) que corresponde con el receptor de cadena celular T $\gamma 9$ y/o el receptor de cadena celular T $\delta 2$.

5 Por lo tanto, las células T $\gamma\delta 2$ también se pueden definir como que son células que comprenden una secuencia de ácido nucleico (o aminoácido) que corresponde a un receptor de cadena celular T $\gamma 9$ y/o un receptor de cadena celular T $\delta 2$.

10 [0029] El experto en la técnica es bien capaz de seleccionar y/o identificar poblaciones celulares caracterizadas por el hecho de que la expresión de un antígeno o receptor en la superficie de la célula tal como se ha descrito en todo el documento.

Se entiende que con respecto a la expresión en la superficie de las células, tal como CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$ y TCR $\gamma\delta 2$, se hace típicamente en una población de células de las cuales una porción de células tiene un nivel mucho más alto de expresión del antígeno cuando se compara con células con un nivel inferior de expresión.

15 Por lo tanto, los términos positivo o negativo se deben entender como que son relativos, es decir, las células positivas tienen un nivel de expresión mucho más alto en comparación con células que son negativas.

Las células que son negativas en este sentido pueden así todavía tener un nivel de expresión que se puede detectar.

20 La expresión en la superficie de las células se puede analizar usando la selección de célula activada por fluorescencia (FACS) y muchos anticuerpos específicos están disponibles comercialmente, por ejemplo tal como para CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$ y TCR $\gamma\delta 2$, que se adecuan a este tipo de análisis FACS, tal como se ha descrito en los ejemplos y como está disponible. Las células T $\gamma\delta 2$ pueden por lo tanto también ser definidas y seleccionadas como que son positivas para TCR $\gamma\delta 2$ en FACS. Los anticuerpos adecuados para FACS o técnicas de separación similares (tal como por ejemplo anticuerpos conjugados para perlas magnéticas) están ampliamente disponibles.

25 Las condiciones son seleccionadas, tal como se proporciona por el fabricante de anticuerpos que permite la selección de células negativas y/o positivas.

30 Los ejemplos de anticuerpos que se pueden adecuar para selección de células T $\gamma\delta 2$ o células diseñadas T $\gamma\delta 2$ tales como están disponibles de BD Pharmingen (BD, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, NJ USA) son V $\gamma 9$ -PE (clon B3; #555733), V $\delta 2$ -FITC (clon B6, # 555738), $\gamma\delta$ TCR-APC (clon B1; #555718) o tal como disponible de Beckman Coulter es pan- $\gamma\delta$ TCR-PE (clon IMM510, # IM1418U). De forma similar, los anticuerpos adecuados para la selección celular T BD, tal como anticuerpos de anti-CD3 pueden ser tales como están disponibles en BD Pharmingen es CD3-FITC (#345763) o tal como anti-TCR $\alpha\beta$ anticuerpos tal como los disponibles en Beckman Coulter is pan-TCR $\alpha\beta$ -PE (#A39499) o pan-TCR $\alpha\beta$ -PC5 (#A39500).

[0030] Por consiguiente, en el método de la divulgación, se proporcionan primeras células T.

Las células T pueden ser células primarias, por ejemplo a partir de un sujeto, tal como se describe en los ejemplos para un sujeto humano.

40 Las células T pueden ser células T $\alpha\beta$.

Las células T también pueden ser líneas celulares, tales como SupT-1, Jurkat o células Raji o cualquier otra línea celular ampliamente disponible.

45 Cualquier tipo celular, siendo una célula primaria o cualquier otra línea celular bastará, siempre y cuando la población celular o una parte sustancial de la misma exprese el receptor de células T, es decir, tal como que es positivo para el receptor de célula T $\alpha\beta$ en una selección FACS o similar como se ha descrito anteriormente, tal población celular se puede contemplar.

También, cualquier célula o población celular se puede contemplar que, cuando está provista de un receptor TCR $\gamma\delta 2$ según la invención es capaz de formar un complejo TCR funcional y ejercer por ejemplo una respuesta citotóxica funcional y/o producción de citocina.

50 La célula que está provista también puede ser una célula original, preferiblemente, una célula original sanguínea tal como un timocito o una célula madre sanguínea, que después se ha provisto con los estímulos adecuados puede desarrollar en células T o células T diseñadas.

55 Por lo tanto, se entiende que la provisión de células T y provisión de estas con el receptor TCR $\gamma\delta 2$ según la invención también puede comprender la provisión de células originales, provisión de estas con el receptor TCR $\gamma\delta 2$ y estimular estas células originales de manera que estas se desarrollen en células T diseñadas.

[0031] También, se proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ donde la región de codificación CDR3 $\gamma 9$ es de forma aleatoria modificada y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica de una cadena receptora de célula T $\delta 2$ donde la región de codificación CDR3 $\delta 2$ se modifica de forma aleatoria.

60 Preferiblemente, la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ y la cadena receptora de célula T $\delta 2$ son de origen humano. Las regiones humanas CDR3 $\gamma 9$ y $\delta 2$ son bien definidas.

65 Por ejemplo, la región humana CDR3 de la TCR $\gamma 9$ cadena de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.1 corresponde a residuos de aminoácidos 118-132, que corresponde a residuos de aminoácidos $\gamma 105$ - $\gamma 117$ según el sistema de información internacional Immunogenetics (IMGT). La región humana CDR3 de la cadena TCR $\delta 2$ de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.2 corresponde a residuos de aminoácidos 112-127 que corresponde a

residuos de aminoácidos δ 105- δ 117 según el IMGT. Según el sistema de información internacional Immunogenetics (IMGT) (Lefranc MP. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. Nucleic Acids Res. 2003,31:307-310) la región humana CDR3 se puede delimitar por, pero no incluye, las posiciones de anclaje C104 y F118, ver también la tabla 3, que se refieren para cada cadena como γ C104 y γ F118 y γ C104 y γ F118.

5 La posición de anclaje γ C104 corresponde a C117 en la SEQ ID NO.1 y γ F118 corresponde a F133 en la SEQ ID NO.1.

La posición de anclaje δ C104 corresponde a C111 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.2 y la posición de anclaje δ F118 corresponde a F128 de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.2.

10 El IMGT proporciona un acceso común para secuencia, genoma y estructura por ejemplo de receptores de célula T de diferentes especies con receptores de célula humana T y permite la identificación de una cadena receptora de célula T γ 9 y una cadena receptora de célula T δ 2 con las regiones CDR3, por ejemplo vía las posiciones de anclaje.

15 [0032] Según el IMGT, el CDR3 se delimita por (pero no incluye) las posiciones de anclaje segunda-CYS 104 y Phe de J o Trp de J 118.

La juntura incluye segunda CYS 104 y Phe de J o Trp de J 118 y es por lo tanto dos aminoácidos más larga que el CDR3.

La CDR3 numeración va de 105 a 117 y, si es necesario, se agregan espacios o posiciones adicionales en la parte superior del bucle.

20 Cabe destacar que, el J-Phe o J-Trp pertenece al motivo de J-REGION característico 'F/W-G-X-G' a posiciones 118-121 y que la CDR3 se delimita por las mismas posiciones de anclaje (segunda-CYS 104 y J-Phe o J-Trp 118), sea el tipo receptor (IG o TR), el tipo de cadena (pesada o ligera para IG; alfa, beta gamma o delta para TR) o las especies.

25 Ver también <http://www.imgt.ORG/IMGTScientificChart/Numbering/IMGTIGVLSuperfamily.html> para una explicación de la numeración IMGT.

Esta numeración IMGT también se usa en los ejemplos.

[0033] Por lo tanto, usando las posiciones de anclaje, según los estándares IMGT, las regiones CDR3 pueden fácilmente ser identificadas.

30 Por ejemplo, entrando una secuencia de aminoácidos (o secuencia de ácidos nucleicos) usando herramientas disponibles en línea tales como las proporcionadas por IMGT (por ejemplo IMGT/V-QUEST) una secuencia de cadena receptora de célula T γ 9 o una secuencia de cadena receptora de célula T δ 2 pueden fácilmente ser identificadas como las regiones CDR3 exactas.

35 Alternativamente, las secuencias de cadena receptora de célula T γ 9 o secuencias de cadena receptora de célula T δ 2 ya disponibles públicamente pueden encontrarse en el IMGT y por lo tanto, las regiones CDR3 se pueden identificar fácilmente de ahí.

Alternativamente, usando la SEQ ID NO.1 y SEQ ID No.2 como una secuencia de referencia y las posiciones de residuo de aminoácido de anclaje en estas, las regiones CDR3 de otras cadenas receptoras celulares T γ 9 y celulares T δ 2 se identifican fácilmente vía un alineamiento, tal como se ha representado para diferente región CDR3 en la tabla 3. Por lo tanto, la persona experta puede fácilmente identificar cualquier región CDR3 de cualquier secuencia de cadena receptora T γ 9 que corresponde con la región CDR3 de SEQ ID NO.1 y también la persona experta puede fácilmente identificar cualquier región CDR3 de cualquier secuencia de cadena receptora de célula T δ 2 que corresponde con las regiones CDR3 de la SEQ ID NO.2.

45 Por lo tanto, la persona experta sabe que secuencia de aminoácidos de cualquier cadena receptora de célula T γ 9 y/o T δ 2 necesita modificar de forma aleatoria.

[0034] Por lo tanto, modificando la región de codificación CDR3 δ 2 en una secuencia de ácidos nucleicos de cadena receptora de célula T δ 2 puede comprender el alineamiento de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO.4 a la secuencia de ácidos nucleicos de cadena receptora de célula T δ 2 de interés, identificando los codones en la secuencia de ácidos nucleicos de cadena receptora de célula T δ 2 que corresponde con los codones que codifican las posiciones de anclaje en la SEQ ID NO.4, y de forma aleatoria modifican la secuencia de ácidos nucleicos entre los codones de posiciones de anclaje identificados en la secuencia de ácidos nucleicos de cadena receptora de célula T δ 2 de interés.

50 También, modificando la región de codificación CDR3 γ 9 en una secuencia de ácidos nucleicos de cadena receptora de célula T γ 9 puede comprender el alineamiento de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO.4 a la secuencia de ácidos nucleicos de cadena receptora de célula T γ 9 de interés, identificando los codones en la secuencia de ácidos nucleicos de cadena receptora de célula T γ 9 que corresponde con los codones que codifican las posiciones de anclaje en la SEQ ID NO.3, y de forma aleatoria modifican la secuencia de ácidos nucleicos entre los codones de posiciones de anclaje identificados en el secuencia de ácidos nucleicos de cadena receptora de célula T γ 9 de interés.

60 La modificación aleatoria de la secuencia de ácidos nucleicos de las regiones de codificación CDR3 es de manera que la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácidos nucleicos se modifica, es decir, al menos un residuo de aminoácido se cambia a otro residuo de aminoácido o al menos un residuo de aminoácido está insertado o eliminado.

65

[0035] Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ y la cadena receptora de célula T $\delta 2$ se pueden introducir en células T para proveer a unas células T diseñadas con un receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ que comprende la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ y la cadena receptora T $\delta 2$.

Por expresión de la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ y la cadena receptora de célula T $\delta 2$ de la cual las regiones CDR3 han sido modificadas de forma aleatoria, un receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ específico se expresa en la célula.

Opcionalmente, los pasos de proporcionar una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ modificada de forma aleatoria CDR3 y la cadena receptora de célula T $\delta 2$ e introducción posterior en células T se pueden repetir.

Por ejemplo, cada vez que se ha hecho, se usa una combinación diferente de regiones modificadas de forma aleatoria CD3.

También está previsto que las etapas de repetición de los pasos, por ejemplo con combinaciones diferentes de regiones CD3 modificadas de forma aleatoria se puedan realizar, al menos en parte, simultáneamente.

Por ejemplo, una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ donde la región de codificación CDR3 $\gamma 9$ se modifica de forma aleatoria y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\delta 2$ donde la región de codificación CDR3 $\delta 2$ se modifica de forma

aleatoria, puede estar prevista y esta pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos se puede introducir en células T proporcionando así una pluralidad de células T diseñadas.

[0036] Se identifica la respuesta antitumoral de la expresión de células T diseñadas previstas de un receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ o un receptor de célula diseñado T $\gamma 9\delta 2$ que median respuestas antitumorales.

En el caso de que los pasos de provisión de las secuencias de ácidos nucleicos e introducción en las células T se realicen en pasos separados, el paso de determinación de las respuestas antitumorales e identificación del receptor de célula diseñada T $\gamma 9\delta 2$ se pueden combinar porque se sabe qué secuencias de ácidos nucleicos fueron introducidas en cada una de la célula diseñada T $\gamma 9\delta 2$.

Determinar las respuestas antitumorales puede por lo tanto realizarse para cada célula T $\gamma 9\delta 2$ diseñada separadamente.

Alternativamente, por ejemplo cuando las células T $\gamma 9\delta 2$ están diseñadas se combinan, por ejemplo cuando la repetición de los pasos tal como anteriormente descritos se realiza simultáneamente, y se proporciona una pluralidad de células T diseñadas, las células T diseñadas se pueden separar y la respuesta antitumoral se determina para cada una de las células T diseñadas separadas.

Las células T diseñadas se pueden separar sobre compartimentos diferentes y en cada uno de los compartimentos se puede determinar la respuesta antitumoral.

En tal escenario, la etapa de identificar las células T diseñadas que median respuestas antitumorales puede implicar la determinación de la secuencia, por ejemplo vía secuenciación de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica cada una de las regiones CDR3 del TCR $\gamma 9\delta 2$. Por lo tanto, opcionalmente como un paso final, identificación de células T diseñadas que median respuestas antitumorales implica la determinación de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ que comprende la región de codificación CDR3 $\gamma 9$ y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena receptora de células T $\delta 2$ que comprende la región de codificación CDR3 $\delta 2$.

También puede estar previsto solo para determinar la secuencia de ácidos nucleicos de ambas regiones de codificación CDR3 $\gamma 9$ y CDR3 $\delta 2$, es decir, no se requiere para determinar las secuencias de ácidos nucleicos completas de la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ y/o la cadena receptora de célula T $\delta 2$.

Como una alternativa para determinar la secuencia de ácidos nucleicos, las secuencias de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ y CDR3 $\delta 2$ también se pueden determinar.

[0037] Preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1 y donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\delta 2$ codifica una secuencia de aminoácidos con al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2.

La secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ comprende preferiblemente una secuencia de ácidos nucleicos que codifica de una secuencia de aminoácidos con al menos 70, 80, 90,95 o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1.

La secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\delta 2$ comprende preferiblemente una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos con al menos 70, 80, 90,95 o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2.

La persona experta es capaz de definir un receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ respecto a la función.

Preferiblemente, el porcentaje de identidad de secuencia se calcula sobre toda la longitud de la SEQ ID NO.1 o la SEQ ID NO.2.

[0038] La modificación aleatoria de las regiones CDR3 del CDR3 $\gamma 9$ y CDR3 $\delta 2$ pueden comprender la selección arbitraria de residuos de aminoácidos.

Tal selección arbitraria se puede realizar generando secuencias aleatorias in vitro, por ejemplo por síntesis química aleatoria, tal como se ha previsto por Sloning Biotechnology usando síntesis química (Sloning Biotechnology GmbH - A Division of MorphoSys, Zeppelinstrasse 4, 82178 Puchheim, Germany).

La modificación aleatoria de las regiones CDR3 de las CDR3 $\gamma 9$ y CDR3 $\delta 2$ también puede comprender la selección arbitraria de secuencias encontradas en regiones naturales CDR3.

Tales secuencias de aminoácidos naturales CDR3 se generan de forma aleatoria, es decir seleccionadas de forma arbitraria, por naturaleza.

5 [0039] Con respecto a la modificación aleatoria, la región de codificación modificada de forma aleatoria CDR3 γ 9 puede preferiblemente ser modificada en la secuencia de aminoácidos que corresponde con residuos de aminoácidos 118-132 de la SEQ ID N.º 1. Con respecto a la modificación aleatoria, la región de codificación modificada de forma aleatoria CDR3 γ 9 puede preferiblemente ser modificada en la secuencia de aminoácidos que corresponde con residuos de aminoácidos 122-124 de la SEQ ID N.º 1. Como se ha dicho, una CDR3 γ 9 región de codificación se ha identificado fácilmente, por ejemplo, vía alineamiento y/o información como se ha proporcionado por IMGT y, por lo tanto, los residuos de aminoácidos a partir de una región de codificación CDR3 γ 9 que corresponde también a los residuos de aminoácidos 118-132 de la SEQ ID NO.1.

10 Opcionalmente, los residuos de aminoácidos C117 y F133 de la SEQ ID NO.1 se pueden usar además para identificar los residuos de aminoácidos correspondientes.

15 En un alineamiento, tal como en la tabla representada 3, los residuos de aminoácidos de una región de codificación CDR3 γ 9 que corresponde con residuos de aminoácidos 118-132 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.1 pueden fácilmente ser identificados y así también los residuos de aminoácidos que corresponden a residuos de aminoácidos 122-124 de la SEQ ID N.º 1.

20 Por lo tanto, una secuencia correspondiente puede ser fácilmente identificada alineando la secuencia de aminoácidos de interés a la secuencia de aminoácidos de referencia (SEQ ID NO.1) e identificando los residuos de aminoácidos de anclaje C117 y F133, de modo que se identifica la región CDR3.

Después, las regiones CDR3 se alinean y los residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos que corresponden a 118-132 de SEQ ID NO.1 se identifican.

25 Con respecto a la modificación aleatoria, la región de codificación modificada de forma aleatoria CDR3 δ 2 se puede modificar en la secuencia de aminoácidos que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de la SEQ ID NO.2.

Con respecto a la modificación aleatoria, la región de codificación modificada de forma aleatoria CDR3 δ 2 se puede modificar en la secuencia de aminoácidos que corresponde con residuos de aminoácidos 112-127 de la SEQ ID NO.2.

30 Una región de codificación CDR3 δ 2 puede ser fácilmente identificada, por ejemplo vía alineamiento y/o de información como se ha proporcionado por IMGT y, por lo tanto, también los residuos de aminoácidos a partir de una región de codificación CDR3 δ 2 que corresponde a los residuos de aminoácidos 112-127 de SEQ ID NO.2.

Opcionalmente, los residuos de aminoácidos C111 y F128 de la SEQ ID NO.2 pueden ser además usados para identificar los residuos de aminoácidos correspondientes.

35 En un alineamiento, tal como en la tabla representada 3, los residuos de aminoácidos de una región de codificación CDR3 δ 2 que corresponde con residuos de aminoácidos 112-127 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.2 se pueden identificar fácilmente.

Por lo tanto, una secuencia correspondiente se puede identificar fácilmente vía alineando la secuencia de aminoácidos de interés a la secuencia de aminoácidos de referencia (SEQ ID NO.2) e identificando los residuos de aminoácidos de anclaje C111 y F128, de manera que la región CDR3 se identifique.

40 Después, las regiones CDR3 se alinean y los residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos que corresponden a 112-127 de la SEQ ID NO.2 se pueden identificar y así también la secuencia de aminoácidos que corresponde a residuos de aminoácidos 115-122.

45 [0040] En una forma de realización, la modificación de forma aleatoria de la secuencia de aminoácidos que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de la SEQ ID NO.2 comprende una modificación en la longitud.

50 [0041] En una forma de realización, la modificación de forma aleatoria de la secuencia de aminoácidos que corresponde con residuos de aminoácidos 112-127 de la SEQ ID NO.2 comprende una modificación en la longitud.

[0042] En una forma de realización, la modificación de forma aleatoria de la secuencia de aminoácidos comprende la introducción de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones.

55 [0043] Con respecto a la modificación aleatoria, esta puede incluir cualquier modificación tal como sustitución de aminoácido, deleción y/o inserción.

Por lo tanto, la modificación aleatoria puede incluir una modificación en la secuencia y/o longitud. Así, las regiones CDR3 pueden variar en longitud que varía de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,21 o 22 residuos de aminoácido.

60 Preferiblemente, la región de codificación CDR3 δ 2 puede variar en la longitud que varía de 5-7 aminoácidos entre posiciones δ L109 y δ T113 según la anotación IGMT.

Por lo tanto, preferiblemente la región de codificación CDR3 δ 2 que corresponde con la secuencia de aminoácidos 112-127 de la SEQ ID NO.2 se modifica de forma aleatoria entre L116 y T123 de la SEQ ID NO.2 de manera que esta contiene 5-7 aminoácidos en esta región.

65 Por lo tanto, toda la región de codificación CDR3 δ 2 varía preferiblemente en la longitud que varía de 15-17 residuos de aminoácidos.

La sustitución de aminoácidos puede incluir cualquier sustitución tal como sustituciones conservadas donde un aminoácido a partir de un grupo se cambia por otro residuo de aminoácido del grupo, por ejemplo un residuo de aminoácido alifático se intercambia por otro residuo de aminoácido alifático, o una sustitución no conservada donde un aminoácido a partir de un grupo se cambia por otro residuo de aminoácido de un grupo diferente, por ejemplo un residuo de aminoácido alifático se intercambia por un residuo de aminoácido básico.

[0044] Con respecto a la provisión de un ácido nucleico, se entiende que el ácido nucleico se proporciona de manera que cuando se introduce en una célula que se puede expresar, de manera que la secuencia de aminoácidos que codifica se exprese en la superficie de la célula.

Preferiblemente, esto se ha hecho por integración del ácido nucleico o ácidos nucleicos en el genoma de la célula.

Preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ se proporciona en una construcción genética y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\delta 2$ se proporciona en una construcción genética.

Los constructos genéticos pueden estar previstos en vectores separados.

Los constructos genéticos también pueden estar previstos en un vector único.

La secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica de una cadena receptora de célula T $\delta 2$ también puede estar prevista en una única construcción genética.

Por ejemplo, una única construcción genética puede expresar un ARNm único que incluye un sitio interno de entrada ribosomal, tal como se ha descrito en el ejemplo, de manera que cada cadena receptora pueda ser transcrita del mismo ARNm.

[0045] La construcción genética y/o vectores también pueden comprender marcadores seleccionables.

Un marcador seleccionable se puede definir como cualquier secuencia de ácidos nucleicos y/o secuencia de aminoácidos que permita seleccionar las células que se proporcionan con ellas.

Por ejemplo, los marcadores seleccionables pueden ser genes de resistencia a neomicina o puromicina tal como se describe en los ejemplos.

La selección de células a la que la construcción genética y/o vector ha sido transferida puede ser realizada por incubación en presencia de neomicina o puromicina.

Otros marcadores seleccionables pueden ser por ejemplo cualquier proteína verde, roja y amarilla fluorescente.

La selección se puede realizar usando FACS. No se requiere tener un marcador seleccionable, ya que la célula cuando se expresa el receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ se puede seleccionar basada en esa expresión en sí misma, por ejemplo, vía selección con un anticuerpo dirigido a ella tal como se ha descrito anteriormente.

Se puede prever que la célula huésped no exprese una cantidad sustancial del receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ para permitir la selección de las células T $\gamma 9\delta 2$ diseñadas, es decir, la expresión del receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ endógeno debe ser muy inferior en comparación con el receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ diseñado.

[0046] Preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ se proporciona en un vector retroviral y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\delta 2$ se proporciona en un vector retroviral y los pasos de introducción de las secuencias de ácidos nucleicos en las células T comprende la transducción de vector retroviral de las células T.

La transducción se puede realizar simultáneamente o en pasos posteriores.

Alternativamente, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\delta 2$ se proporciona en un único vector retroviral y los pasos de introducir las secuencias de ácidos nucleicos en las células T comprende la transducción de vector retroviral de las células T.

Los vectores retrovirales tal como están descritos en los ejemplos son altamente eficaces para la transferencia de las secuencias de ácidos nucleicos a las células T de manera que se pueden prever las células T diseñadas.

Muchos vectores retrovirales y lentivirales se conocen o son tal como se describe en los ejemplos.

Los vectores retrovirales tienen un genoma de ARN que, cuando se ha introducido en una célula, está transcrito inverso en el ADN que está posteriormente integrado en el genoma huésped.

La integración es ventajosa, ya que esta permite la proliferación de células transducidas mientras se mantiene el genoma de vector vírico que comprende el construcción genética.

[0047] En una forma de realización, la etapa de determinar la reactividad antitumoral comprende contactar las células con células tumorales.

Las células tumorales pueden ser cualquier tipo de células tumorales.

Por ejemplo, células tumorales primarias de un paciente.

Las células tumorales pueden ser células tumorales de líneas celulares, tales como las líneas celulares enumeradas en los ejemplos nombrados Daudi, RPMI8226/S, OPM2, LME1; K562, Saos2, MZ1851RC, SCC9, Fadu, MDA-MB231, MCF7; BT549; SW480, que son bien conocidos en la técnica. Líneas celulares tumorales pueden fácilmente ser obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, Virginia) y similar.

La etapa de determinación de actividad antitumoral puede incluir cualquier ensayo donde un efecto antitumoral puede ser determinado, tal como con un efecto en el índice de división de la célula tumoral, es decir, la velocidad con la cual las células tumorales se dividen, muerte celular, unión a las células tumorales, etc.

5 [0048] La determinación de las respuestas antitumorales incluye el contacto de las células T diseñadas con una célula tumoral y medición de su capacidad para lisar la célula tumoral y/o inducir la producción IFN- γ . La capacidad para lisar las células tumorales incluye proporcionar una cantidad fija de células tumorales con la cual la célula diseñada T $\gamma\delta 2$, es decir, una célula T diseñada de expresión de TCR $\gamma\delta 2$ se contacta y se cuenta después de un periodo de incubación del número de células tumorales viable.

10 Cuando el número de células viables contado se compara con un control no contactado con la célula diseñada T $\gamma\delta 2$ y el número es inferior, tal célula diseñada T $\gamma\delta 2$ se puede considerar que tiene una respuesta antitumoral. Además de contar las células viables, también se puede realizar un ensayo de liberación de cromó⁵¹ de forma similar a lo que se describe en los ejemplos.

15 La cantidad de liberación de cromó⁵¹ es una medida del número de células que han sido lisadas.

[0049] De forma similar, también se puede determinar la producción IFN- γ , por ejemplo vía coloración de anticuerpo, ELISA y/o PCR cuantitativo para el ARNm expresado. Los ensayos para determinación IFN- γ están muy disponibles comercialmente, tal como los descritos en el ejemplo.

20 Las células T $\gamma\delta 2$ diseñadas se contactan con las células tumorales.

El contacto puede ser en presencia de un fosfoantígeno, tal como pamidronato.

Por lo tanto, cuando la cantidad de IFN- γ producida es más alta en comparación con cuando las células no se contactan con la célula T $\gamma\delta 2$ diseñada, tal célula T $\gamma\delta 2$ diseñada se puede considerar como que tiene una respuesta antitumoral.

25 Además de la comparación con un control, es decir, con células no contactadas con la célula T $\gamma\delta 2$ diseñada, también se puede comparar con un valor de referencia.

En cualquier caso, se puede contemplar cualquier ensayo donde se puede determinar un efecto en las células tumorales que implique contactar la célula T $\gamma\delta 2$ con la célula tumoral.

En tanto que se puede determinar un efecto antitumoral, tal como inducción de muerte celular, viabilidad celular, unión a la célula tumoral y/o producción IFN- γ .

30 [0050] Además, con respecto a los métodos anteriormente descritos, las células T se pueden expandir antes o después de la transferencia de los ácidos nucleicos que codifican el receptor de células T $\gamma\delta 2$ diseñadas, es decir con las regiones CDR3 modificadas de forma aleatoria.

35 Preferiblemente, la expansión después de la transferencia es de tal manera que relativamente pocos ácidos nucleicos necesitan ser transferidos.

Esta expansión de las células T se puede realizar por estimulación con α -CD3/CD28 Dynabeads en presencia de IL-2.

Un protocolo de expansión rápida tal como se ha descrito en los ejemplos también se puede usar.

40 Las células expandidas que comprenden el receptor de célula T $\gamma\delta 2$ diseñada, que se puede seleccionar por ejemplo, vía un marcador seleccionable tal como anteriormente se ha descrito, puede ser adicionalmente seleccionado para la presencia del antígeno CD4 y el antígeno CD8, por ejemplo utilizando el sistema de separación MACS como se describe en los ejemplos.

45 Las células T diseñadas se pueden expandir además posteriormente utilizando el protocolo REP como se describe por Riddell y Greenberg, 1990 J Immunol Methods. 128(2):189-201 o usando métodos de expansión adicionales similares a ellos.

Brevemente, el método de expansión implica el uso de anticuerpos dirigidos contra las moléculas de activación de célula T, tal como TCR, CD3 y CD28 y/o células alimentadoras y/o citocinas estimulantes.

50 [0051] En otra forma de realización, un receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o un fragmento del mismo se proporciona que comprende una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ que comprende una región CDR3 $\gamma 9$, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 122-124 de la SEQ ID NO.1 se modifica y una cadena receptora de célula T $\delta 2$ que comprende una región CDR3 $\delta 2$ donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de SEQ ID NO.2 se modifica, donde las combinaciones de las modificaciones de aminoácido en el receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o un

55 fragmento del mismo, son enumeradas como en la tabla 1. Las sustituciones pueden comprender las combinaciones tal como se enumeran en la tabla 1. Las secuencias de aminoácidos de las regiones respectivas CDR3 $\gamma 9$ y CDR3 $\delta 2$ se sustituyen con secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en combinaciones de secuencias de aminoácidos AQQ ($\gamma 9$) y ALKRTD ($\delta 2$); AQQ ($\gamma 9$) y LLGY($\delta 2$); CI ($\gamma 9$) y ALKRTD ($\delta 2$); y; CI ($\gamma 9$) y TLGMGGEY($\delta 2$).

60 Estos receptores de célula T $\gamma\delta 2$ o fragmentos de los mismos, que comprenden estas combinaciones particulares de regiones CDR3 fueron identificados utilizando los métodos según la invención tal como anteriormente descritos y como se describe en los ejemplos.

65 [0052] Las combinaciones de secuencias de aminoácidos de regiones CDR3 $\gamma 9$ y CDR3 $\delta 2$ que pueden ser preferiblemente combinadas se enumeran en la tabla de abajo 1, ya que muestran un efecto antitumoral. Tabla 1. Combinaciones de secuencias de aminoácidos de regiones CDR3 $\gamma 9$ y CDR3 $\delta 2$.

La región que corresponde con residuos de aminoácidos de la región CDR3 γ9 que corresponde con número 122-124 de la SEQ ID NO.1 que ha sido sustituida, es decir, ha sido modificada, enumerada y la región que corresponde con residuos de aminoácidos de la región CDR3 δ2 que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de la SEQ ID NO.2 que ha sido sustituida también se enumeran.

5 Las combinaciones diferentes de CDR3 γ9 y CDR3 δ2 se numeran de 1-4.

Por ejemplo, el número 2 corresponde a un TCR γ9δ2 con una cadena receptora de célula T γ9 donde la región CDR3 γ9 que corresponde con el número 122-124 de la SEQ ID NO.1 ha sido sustituida por AQQ y una cadena receptora de célula T δ2 donde la región CDR3 δ2 que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de la SEQ ID NO.2 ha sido sustituida con ALKRTD.

10

Tabla 1: combinaciones de secuencias de aminoácidos modificadas de regiones CDR3 γ9 y CDR3 δ2, donde las secuencias de aminoácidos enumeradas sustituyen los residuos de aminoácidos CDR3 γ9 correspondientes a 122-124 de la SEQ ID NO.1 y sustituyen residuos de aminoácidos CDR3 δ2 correspondientes a 115-122 de la SEQ ID NO.2.

15

Nº	combinación	CDR3 γ9	CDR3 δ2
1	γ9-cl5/δ2-cl5	IQ	ALKRTD (SEQ ID NO.15)
2	γ9-G115/δ2-cl5	AQQ	ALKRTD (SEQ ID NO.15)
3	γ9-cl5/δ2-G115	IQ	TLGMGGEI (SEQ ID NO.19)
4	γ9-G115/δ2-cl3	AQQ	LLGY

[0053] En otra forma de realización, se proporciona un receptor de célula T γ962 o un fragmento del mismo, que comprende una cadena receptora de célula T γ9 que comprende una región CDR3 γ9, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 γ9 que corresponde con residuos de aminoácidos 118-132 de la SEQ ID NO.1 se modifica y una cadena receptora de célula δ2 que comprende una región CDR3 δ2 donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 δ2 que corresponde con residuos de aminoácidos 112-127 de la SEQ ID NO.2 se modifica, donde las combinaciones de las modificaciones de aminoácido en el receptor de célula T γ9δ2 o un fragmento del mismo se enumeran como en la tabla 2. Las sustituciones pueden comprender las combinaciones tal como se enumeran en la tabla 2. Las secuencias de aminoácidos de las respectivas CDR3 γ9 y CDR3 δ2 regiones se sustituyen con secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en combinaciones de secuencias de aminoácidos ALWEIQELGKKIKV (γ9) y ACDALKRTDSDKLI (δ2); ALWEAQQELGKKIKV (γ9) y ACDALKRTDSDKLI (δ2); ALWEIQELGKKIKV (γ9) y ACDTLGMGGEYTDKLI (δ2); ALWEAQQELGKKIKV (γ9) y ACDLLGYTDKLI (δ2). Estos receptores de célula T γ9δ2 o fragmentos de los mismos, que comprenden estas combinaciones particulares de regiones CDR3 fueron identificados utilizando los métodos según la invención tal como anteriormente se han descrito y como se describen en los ejemplos.

20

25

30

[0054] Las combinaciones de secuencias de aminoácidos de regiones CDR3 γ9 y CDR3 δ2 que pueden ser preferiblemente combinadas se enumeran debajo en la tabla 2, ya que muestran un efecto fuerte antitumoral. Tabla 2. Combinaciones de secuencias de aminoácidos de las regiones CDR3 γ9 y CDR3 δ2.

35

La región que corresponde con residuos de aminoácidos de la región CDR3 γ9 que corresponde con el número 118-132 de la SEQ ID NO.1 que ha sido sustituida, es decir, se ha modificado, enumerado y la región que corresponde con residuos de aminoácidos de la región CDR3 δ2 que corresponde con residuos de aminoácidos 112-127 de la SEQ ID NO.2 que se ha sustituido, es decir, modificado, también se ha enumerado.

40

Las combinaciones diferentes de CDR3 γ9 y CDR3 δ2 son numeradas de 1-4 en la tabla 2. Por ejemplo, el número 2 corresponde a un TCR γ9δ2 con una cadena receptora de célula T γ9 donde la región CDR3 γ9 que corresponde con el número 118-132 de la SEQ ID NO.1 se ha modificado para (sustituido con) ALWEAQQELGKKIKV y una cadena receptora de célula T δ2 donde la región CDR3 δ2 que corresponde con residuos de aminoácidos 112-127 de la SEQ ID NO.2 ha sido modificado para (sustituido con) ACDALKRTDSDKLI.

45

Tabla 2: combinaciones de secuencias de aminoácidos modificadas completas de regiones CDR3 γ9 y CDR3 δ2

Nº	combinación	CDR3 γ9	CDR3 δ2
1	γ9-cl5/δ2-cll5	ALWEIQELGKKIKV (SEC. ID NO.16)	ACDALKRTDSDKLI (SEC. ID NO.17)
2	γ9-G115/δ2-cl5	ALWEAQQELGKKIKV (SEC. ID NO.3)	ACDALKRTDSDKLI (SEC. ID NO.17)
3	γ9-cl5/δ2-G115	ALWEIQELGKKIKV (SEC. ID NO.16)	ACDTLGMGGEYTDKLI (SEC. ID NO.4)
4	γ9-G115/δ2-cl3	ALWEAQQELGKKIKV (SEC. ID NO.3)	ACDLLGYTDKLI (SEC. ID NO.18)

[0055] En una forma de realización, el receptor de la célula T γ9δ2 o un fragmento del mismo comprende un cadena receptora de célula T γ9 que comprende una región CDR3 γ9, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 γ9 que corresponde con residuos de aminoácidos 122-124 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1 es AQQ y una cadena receptora de célula T δ2 que comprende una región CDR3 δ2 donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 δ2 que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2 es ALKRTD. En otra forma de realización, el receptor de célula T γ9δ2 o un fragmento del mismo comprende una cadena receptora de célula T γ9 que comprende una región

50

55

CDR3 γ 9, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 γ 9 que corresponde con residuos de aminoácidos 118-132 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1 es ALWEAQQELGKKIKV y una cadena receptora de célula T δ 2 que comprende una región CDR3 δ 2 donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 δ 2 que corresponde con residuos de aminoácidos 112-128 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2 es ACDALKRTDTKLI. Esta combinación particular de regiones CDR3 en el receptor de célula T γ δ 2 o fragmento del mismo ha mostrado una actividad antitumoral particularmente alta y, por lo tanto, se puede preferir.

[0056] En una forma de realización, el receptor de célula T γ δ 2 o fragmento del mismo según la invención, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 γ 9 que corresponde con residuos de aminoácidos 118-121 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1 es ALWE y donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 γ 9 que corresponde con residuos de aminoácidos 125-132 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1 es ELGKKIKV y donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 δ 2 que corresponde a residuos de aminoácidos 112-114 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2. es ACD y donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 δ 2 que corresponde con residuos de aminoácidos 123-127 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2 es TDKLI. Se entiende que estas secuencias de aminoácidos corresponden a las secuencias que flanquean las secuencias de aminoácidos que se deben sustituir con las secuencias de aminoácidos como se ha enumerado arriba.

[0057] En otra forma de realización, se proporciona un receptor de célula T γ δ 2 o fragmento del mismo, donde la cadena receptora de célula T γ 9 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 1 y/o donde la cadena receptora de célula T δ 2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2. Se entiende que la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 γ 9 que corresponde con el número de residuos de aminoácidos 122-124 de la SEQ ID NO.1 y la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 δ 2 que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de la SEQ ID NO.2 en esta forma de realización se sustituyen conforme a la tabla 1.

[0058] En una forma de realización, se proporciona un receptor de célula T γ δ 2 o fragmento del mismo, donde la cadena receptora de célula T γ 9 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 1-121 y 125-315 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1 y donde los residuos de aminoácidos modificados 122-124 son tal y como se define en la tabla 1 y donde la cadena receptora de célula T δ 2 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 1-114 y 123-292 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2 y donde los residuos de aminoácidos modificados 115-122 son tal y como se define en la tabla 1. Se entiende que la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 γ 9 que corresponde con número de residuos de aminoácidos 122-124 de la SEQ ID NO.1 y la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 δ 2 que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de SEQ ID NO.2 están en esta forma de realización sustituidas conforme a la tabla 1.

[0059] Se entiende que la SEQ ID de secuencias de aminoácidos NO.1 y SEQ ID NO.2 comprenden cada una una secuencia líder.

La secuencia líder de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.1 es de aminoácido nº 1-20 de la SEQ ID NO.1.

La secuencia líder de la SEQ ID de secuencia de aminoácidos NO.2 es de aminoácido nº 1-19 de la SEQ ID NO.2.

La secuencia líder puede dirigir la cadena de aminoácidos a la superficie de la célula.

La secuencia líder se puede dividir desde la naciente cadena de aminoácidos y no está presente en la proteína final.

Por lo tanto, se proporciona, en una forma de realización, un receptor de célula T γ δ 2 o fragmento del mismo, donde la cadena receptora de célula T γ 9 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 21-121 y 125-315 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1 y donde los residuos de aminoácidos modificados 122-124 son tal y como se define en la tabla 1, y donde la cadena receptora de célula T δ 2 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 20-114 y 123-292 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2 y donde los residuos de aminoácidos modificados 115-122 son tal y como se define en la tabla 1. Se entiende que la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 γ 9 que corresponde con un número de residuos de aminoácidos 122-124 de la SEQ ID NO.1 y la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 δ 2 que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de la SEQ ID NO.2, están en esta forma de realización sustituidos conforme a la tabla 1. También se entiende que puede ser opcional usar secuencias líder alternativas y también se entiende que estas secuencias líder de la SEQ ID NO.1 y la SEQ ID NO.2 pueden ser desatendidas, por ejemplo, cuando se comparan las secuencias y/se determinan las secuencias correspondientes y/o el alineamiento y/o se determinan los porcentajes de identidad.

[0060] En otra forma de realización de la divulgación, un conjugado se proporciona que comprende un fragmento soluble del receptor de célula T γ δ 2 según cualquiera de los receptores de célula T γ δ 2 como se ha descrito anteriormente.

El dominio extracelular del receptor de célula T $\gamma\delta 2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 21-263 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1 y la secuencia de aminoácidos de la cadena receptora de célula T $\delta 2$ que corresponde con residuos de aminoácidos 20-249 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2.

5 El conjugado se puede enlazar a un agente.

Preferiblemente, el agente se selecciona del grupo que consiste en un agente de diagnóstico, un agente terapéutico, un agente de anticancerígeno, una sustancia química, una nanopartícula, un agente quimioterapéutico o un fluorocromo.

10 Tales conjugados que se puede enlazar a sustratos (por ejemplo productos químicos, nanopartículas) se pueden utilizar por ejemplo para dirigir quimioterapia a una diana de interés.

Además, en la expresión de diagnósticos de ligandos definidos se puede evaluar tomando la ventaja de los TCR solubles enlazados a fluorocromos que se usan luego como herramienta de coloración o para el aislamiento bioquímico del ligando.

15 [0061] Además, en esta forma de realización, la invención proporciona para secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican la cadena receptora de célula T $\delta 2$ o fragmento de la misma, según la invención, donde la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde a residuos de aminoácidos 115-122 de la SEQ ID de la secuencia de aminoácidos NO.2 se sustituye por residuos de aminoácidos ALKRTD o LLGY. Por lo tanto, la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde a residuos de aminoácidos 112-127 de la SEQ ID de secuencia de aminoácidos NO.2 se sustituye entre D114 y T123 de la SEQ ID NO.2 con residuos de aminoácidos ALKRTD o LLGY. La invención proporciona además una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ o fragmento de la misma, según la invención, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 122-124 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.1 se sustituye con residuos de aminoácidos IQ. Por tanto, la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 118-132 de la SEQ ID NO.1 de secuencia de aminoácidos se sustituye entre E121 y E 125 de SEQ ID N.º 1 con residuos de aminoácidos IQ.

30 [0062] También se proporcionan constructos genéticos que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos aisladas según la invención y vectores retrovíricos que comprenden la construcción genética.

[0063] Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos aisladas se enumeran como la SEQ ID NO.3 y la SEQ ID NO.4 y corresponden respectivamente para abrir marcos de lectura de la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ (codificación de secuencia de aminoácidos correspondiente SEQ ID NO.1) y la cadena receptora de célula T $\delta 2$ (codificación de secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO.2) del clon G115wt, tal como se describe en los ejemplos.

35 Estas secuencias de ácidos nucleicos aisladas, cuando son parte de un casete de expresión se pueden dispersar por ejemplo por secuencias de codificación intrónica y tienen regiones 5' y 3' no codificantes.

Cuando tales secuencias se expresan, la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ correspondiente y las secuencias de aminoácidos de cadena receptora de célula T $\delta 2$ se hacen en la célula.

40 Por lo tanto, la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO.3 codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1.

La secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO.4 codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2.

Las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID No: 1 y SEQ ID NO.2, ya que estas se forman en la célula cada una comprende una secuencia líder.

45 La secuencia líder de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.1 es de aminoácido nº 1-20 de la SEQ ID NO.1.

La secuencia líder de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.2 es de aminoácido nº 1-19 de la SEQ ID NO.2.

La secuencia líder puede dirigir la cadena de aminoácidos a la superficie de la célula.

La secuencia líder se puede dividir desde la nascente cadena de aminoácidos y no está presente en la proteína final.

50 El dominio constante de un receptor de célula T $\gamma\delta 2$ diseñado puede tener secuencias de conexión corta donde los residuos de cisteína forman un enlace de disulfuro, que forma una conexión entre la cadena TCR $\gamma 9$ y la cadena TCR $\delta 2$. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos C263 SEQ ID NO.1 y la secuencia de aminoácidos C249 SEQ ID NO.2, que corresponde con la cadena TCR $\gamma 9$ y la cadena TCR $\delta 2$ de G115wt puede formar un enlace de disulfuro. Un enlace de disulfuro es un enlace covalente formado por el acoplamiento de dos grupos de tiol de las cisteínas.

60 [0064] En otra forma de realización, se proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o fragmento del mismo, según la invención, al igual que una secuencia de ácidos nucleicos que comprende constructos genéticos o una construcción genética que codifica el receptor de célula T $\gamma\delta 2$ según la invención.

Se entiende que en esta forma de realización, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el receptor de célula T $\gamma\delta 2$ deben estar comprendidas en una única secuencia de ácidos nucleicos.

Preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos que comprende la construcción genética o constructos genéticos está comprendida en un vector retrovívico.

65

[0065] En una forma de realización, está proporcionada una célula que expresa el fragmento soluble del receptor de célula T $\gamma\delta 2$ según la invención.

5 [0066] En una forma de realización, se proporciona una célula T que comprende el receptor de célula T $\gamma\delta 2$ según la invención, es decir, que corresponde con los receptores de célula T $\gamma\delta 2$ específicos de los cuales las regiones CDR3 se sustituyen con las secuencias de aminoácidos específicas, tal como se enumeran e indican arriba.

10 En otra forma de realización, la célula T comprende las secuencias de ácidos nucleicos aisladas como se ha enumerado arriba, el construcción genética o constructos genéticos según se ha enumerado arriba o el vector retrovírico o vectores retrovíricos como se ha enumerado arriba.

[0067] Además, el receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o fragmento del mismo, según la invención, como se ha descrito anteriormente, una secuencia de ácidos nucleicos aislada o un construcción genética o un vector retrovírico, o una célula T, como se ha enumerado arriba, es para uso como un medicamento.

15 Preferiblemente, el receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o fragmento del mismo, según la invención, como se ha descrito anteriormente, una secuencia de ácidos nucleicos aislada o una construcción genética, o un vector retrovírico, o una célula T, como se ha enumerado arriba es para uso como un medicamento en el tratamiento contra el cáncer.

20 [0068] Se entiende que los receptores de célula T $\gamma\delta 2$ específicos o fragmentos de los mismos, según la invención, es decir, que corresponde con los receptores de célula T $\gamma\delta 2$ específicos de los cuales las regiones CDR3 se sustituyen con las secuencias de aminoácidos específicas tal como se enumeran e indican arriba, en particular son útiles en tratamientos médicos y/o en diagnósticos.

25 Por ejemplo, las células inmunes se pueden redirigir contra las células cancerosas por ejemplo por transferencia ex vivo de uno de los receptores de célula T $\gamma\delta 2$ específicos como se ha enumerado en células T $\alpha\beta$ de un paciente seguido de expansión y transferencia adoptiva de estas células T diseñadas de nuevo en el paciente.

Por lo tanto, las células inmunes se pueden redirigir contra las células cancerosas.

30 Esto también se puede hacer en combinación con cualquiera de los otros receptores (por ejemplo NKG2D) en células inmunitarias para aumentar la reactividad anticancerígena.

[0069] Ejemplos de realización de la divulgación

1. Método de identificación de receptores de célula T $\gamma\delta 2$ que median respuestas antitumorales que incluyen las etapas de:

35 a) proporcionar células T;

b) proporcionar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ que comprende una región de codificación CDR3 $\gamma 9$, donde la región de codificación CDR3 $\gamma 9$ se modifica de forma aleatoria y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\delta 2$ que comprende una región de codificación CDR3 $\delta 2$, donde la región de codificación CDR3 $\delta 2$ se modifica de forma aleatoria;

40 c) introducción de las secuencias de ácidos nucleicos de la etapa b) en las células T para proveer una célula T diseñada con un receptor de célula T $\gamma\delta 2$ que comprende la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ de la etapa b) y la cadena receptora de célula T $\delta 2$ de la etapa b);

d) opcionalmente, repetir los pasos b) y c);

45 e) determinar las respuestas antitumorales de las células T diseñadas previstas en los pasos c) y d);

f) identificar los receptores de célula T $\gamma\delta 2$ de las células T diseñadas que median respuestas antitumorales.

2. El método según la forma de realización 1, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena de receptor de célula T $\gamma 9$ codifica una secuencia de aminoácido que tiene al menos un 60% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y/o donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\delta 2$ codifica una secuencia de aminoácidos con al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2.

3. Método, según cualquiera de los ejemplos de realización 1-2, donde la región de codificación CDR3 $\gamma 9$ modificada de forma aleatoria se modifica en la secuencia de aminoácido correspondiente a residuos de aminoácidos 122-124 de la SEQ ID N.º 1.

4. Método, según cualquiera de las formas de realización 1-3, donde la región de codificación CDR3 $\delta 2$ modificada de forma aleatoria se modifica en la secuencia de aminoácido correspondiente a residuos de aminoácidos 115-122 de la SEQ ID NO.2.

5. Método, según la forma de realización 4, donde la modificación de forma aleatoria de la secuencia de aminoácidos que corresponde con la región de codificación CDR3 $\delta 2$ comprende una modificación en la longitud.

65

6. Método, según cualquiera de los ejemplos de realización 1-5, donde la modificación de forma aleatoria de la secuencia de aminoácidos comprende la introducción de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones.

5 7. Método, según cualquiera de los ejemplos de realización 1-6, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ se proporciona en un vector de expresión y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\delta 2$ se proporciona en un vector de expresión o donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\delta 2$ se proporciona en un único vector de expresión.

10 8. Método, según cualquiera de los ejemplos de realización 1-6, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ se proporciona en un vector retrovívico y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\delta 2$ se proporciona en un vector retrovívico o donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena receptora de célula T $\delta 2$ se proporciona en un único vector retrovívico, y donde los pasos de introducir las secuencias de ácido nucleico en las células T comprende la transducción de vector retrovívico de las células T.

15 20 9. Método, según cualquiera de los ejemplos de realización 1-8, donde la etapa de determinación de las respuestas antitumorales comprende el contacto de las células T diseñadas con una célula tumoral y la medición de su capacidad de lisar la célula tumoral y/o inducir IFN- γ .

Ejemplos de realización de la invención

25 [0070]

30 10. Un receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ o un fragmento del mismo, donde dicho receptor o fragmento del mismo es capaz de enlazar con una célula tumoral y donde dicho receptor comprende una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ que comprende una región CDR3 $\gamma 9$, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 122-124 de la SEQ ID NO.1 se modifica y una cadena receptora de célula T $\delta 2$ que comprende una región CDR3 $\delta 2$ donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de la SEQ ID NO.2 se modifica, donde las combinaciones de las modificaciones de aminoácido en el receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ o un fragmento del mismo son como se han enumerado en la tabla 1.

35 11. Un receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ o un fragmento del mismo, donde dicho receptor o fragmento del mismo es capaz de enlazar con una célula tumoral y donde dicho receptor comprende:
una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ que comprende una región CDR3 $\gamma 9$, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 122-124 de la
40 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1 es AQQ, y una cadena receptora de célula T $\delta 2$ que comprende una región CDR3 $\delta 2$ donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde a residuos de aminoácidos 115-122 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2 es ALKRTD.

45 12. Un receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ o fragmento del mismo, según cualquiera de los ejemplos de realización 10-11, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 118-121 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1 es ALWE y donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde a residuos de aminoácidos 125-132 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1 es ELGKKIKV y donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde a residuos de aminoácidos 112-114 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2. es ACD, y donde la secuencia de aminoácidos de la región γ 2-CDR3 que corresponde a residuos de aminoácido 123-127 de la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO.2 es TDKLI.

50 13. Un receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ o fragmento del mismo, según cualquiera de los ejemplos de realización 10-12, donde la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1 y donde la cadena receptora de célula T $\delta 2$ comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2.

55 60 14. Un receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ o fragmento del mismo, según cualquiera de los ejemplos de realización 10-13, donde la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 1-121 y 125-315 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1 y donde los residuos de aminoácidos modificados 122-124 son tal y como se define en cualquiera de los ejemplos de realización 10-13 y donde la cadena receptora de célula T $\delta 2$ comprende una secuencia de aminoácidos que
65 comprende residuos de aminoácidos 1-114 y 123-293 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2 y

donde los residuos de aminoácidos modificados 115-122 son tal y como se define en cualquiera de los ejemplos de realización 10-13.

Ejemplos de realización de la divulgación

5

[0071]

15. Un conjugado que comprende un fragmento soluble del receptor de célula T $\gamma\delta 2$ según los ejemplos de realización 10-14 enlazado a un agente.

10

16. Un conjugado, según la forma de realización 14, donde el agente es seleccionado del grupo que consiste en un agente de diagnóstico, un agente terapéutico, un agente anticancerígeno, una sustancia química, una nanopartícula, un agente quimioterapéutico o un fluorocromo.

Ejemplos de realización de la invención

15

[0072]

17. Una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica la cadena receptora de célula T $\delta 2$ o fragmento de la misma, tal y como se define en cualquiera de los ejemplos de realización 10-14, donde la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2 se sustituye con residuos de aminoácido ALKRTD o LLGY.

20

18. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica aislada de la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ o fragmento de la misma, tal y como se define en cualquiera de los ejemplos de realización 10-14, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 122-124 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1 se sustituye con residuos de aminoácidos IQ.

25

19. Una construcción genética que comprende la secuencia de ácidos nucleicos aislada según cualquiera de los ejemplos de realización 17-18.

30

20. Un vector retroviral que comprende una construcción genética según la forma de realización 19.

21. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el receptor de célula T $\gamma\delta 2$ aislado o fragmento del mismo, tal y como se define en cualquiera de los ejemplos de realización 10-14.

35

22. Una construcción genética que comprende la secuencia de ácidos nucleicos según la forma de realización 21.

23. Un vector retroviral que comprende la construcción genética según la forma de realización 22.

40

Ejemplos de realización de la divulgación

[0073]

24. Una célula que expresa un fragmento soluble del receptor de célula T $\gamma\delta 2$ tal y como se define en la forma de realización 15.

45

Ejemplos de realización de la invención

[0074]

25. Una célula T que comprende el receptor de célula T $\gamma\delta 2$ según cualquiera de los ejemplos de realización 10-14.

50

26. Una célula T según forma de realización 25, donde la célula T comprende las secuencias de ácidos nucleicos aisladas, según ejemplos de realización 17-18, el construcción genética, según la forma de realización 19 o el vector retroviral según la forma de realización 20.

55

27. Un receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o fragmento del mismo, según cualquiera de los ejemplos de realización 10-14, un conjugado según cualquiera de ejemplos de realización 15-16, una secuencia de ácidos nucleicos aislada, según cualquiera de los ejemplos de realización 17-18 y 21 o un construcción genética según la forma de realización 19 o 22, o un vector retroviral según la forma de realización 20 o 23, o una célula T según cualquiera de ejemplos de realización 25-26 para uso como un medicamento.

60

28. Un receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o fragmento del mismo, según cualquiera de los ejemplos de realización 10-14, un conjugado según cualquiera de los ejemplos de realización 15-16, una secuencia de ácidos nucleicos aislada según cualquiera de los ejemplos de realización 17-18 y 21, o una construcción genética según forma de realización 19 o 22, o un vector retroviral según la forma de realización 20 o 23, o una

65

célula T según cualquiera de los ejemplos de realización 25-26 para uso como un medicamento en el tratamiento contra el cáncer.

Ejemplos

5

Materiales y métodos

Células y líneas celulares

10

[0075] PBMC fueron aislados de capas leucocitarias obtenidas de Sanquin Bood Bank (Amsterdam, The Netherlands).

Los blastos AML primarios fueron recibidos después de la obtención del consentimiento informado del biobanco LML Utrecht UMC y una donación en especie de Matthias Teobald (Mainz; Alemania) y fueron recogidos según los reglamentos GCP y Helsinki.

15

Las líneas celulares se describen en Material suplementario y métodos.

Mutagénesis TCR, clonación y secuenciación

20

[0076] Las TCR $\gamma\delta 2$ modificaciones se basan en genes optimizados por codón de cadena TCR $\gamma 9$ o $\delta 2$ G115 flanqueada por sitios de restricción de por NcoI y BamHI (sintetizados por GeneArt, Regensburg, Alemania).

Para generar mutaciones de alanina, mutagénesis dirigida al sitio se realizó por extensión de superposición PCR 21 o mutagénesis de plásmido entero 22,23, utilizando una polimerasa de lectura y corrección (Phusion, Bioké).

Las cadenas TCR $\gamma 9$ o $\delta 2$ digeridas de NcoI-BamHI mutado fueron ligadas en el vector retrovírico pBullet y secuenciadas por BaseClear (Leiden, The Netherlands).

25

Citometría de flujo

30

[0077] La expresión TCR $\gamma\delta 2$ fue analizada por citometría de flujo utilizando un anticuerpo V $\delta 2$ -FITC (clon B6, BD) o un anticuerpo pan TCR $\gamma\delta$ -PE (clon IMMU510, Beckman Coulter).

El cambio múltiplo se calculó en base a valores MFI de células T transducidas $\gamma 9$ -G115wt/ $\delta 2$ -G115wt establecidas en 1 y células T transducidas como control a 0.

Ensayos de células T funcionales

35

[0078] Ensayo de liberación de cromo 51 para citotoxicidad mediada por células se describió previamente.

Las células diana se marcaron durante toda la noche con $100\mu\text{Cu } 51 \text{ Cr}$ ($150\mu\text{Cu}$ para células primarias) y se incubaron durante 5h con células T transducidas en cinco proporciones efector a diana (E:T) entre 30:1 y 0.3:1.

El cambio múltiplo se calculó cuando se comparó con la reactividad células T diseñadas de expresión de TCR $\gamma\delta 2$ no mutado. IFN- γ ELISPOT fue realizado utilizando anti-huIFN- γ mAb1-D1K (I) y mAb7-B6-1 (II) (Mabtech-Hamburg; Alemania) después del procedimiento recomendado del fabricante.

40

Las células diana y efectoras (E:T 3:1) fueron incubadas durante 24h en presencia de pamidronato (Calbiochem; Alemania) donde se ha indicado.

IFN γ ELISA fue realizado utilizando el equipo ELISA-ready-go! (eBioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante.

45

Las células efectoras y diana (E:T 1:1) fueron incubadas durante 24h en presencia de pamidronato como se ha indicado.

Donde se ha especificado, el cambio múltiplo se calculó cuando se comparó con la reactividad de células T diseñadas de expresión de TCR $\gamma\delta 2$ no mutado.

50

Transducción retrovírica de células T

55

[0079] TCR $\gamma\delta 2$ fueron transducidos en células T $\alpha\beta$ tal y como se ha descrito anteriormente (Marcu-Malina et al., 2011).

En resumen, las células empaquetadoras (foenix-amfo) fueron transfectadas con gag-pol (pHIT60), env (pCOLT-GALV) (Stanislawski et al., 2001) y dos constructos retrovíricos (pBullet) que contienen bien $\gamma 9$ -cadena-IRES-neomicina o $\delta 2$ -cadena-IRES-puromicina, usando el reactivo Fugene6 (Takara, Gennevilliers, Francia).

Las PBMC humanas activadas con αCD3 (30ng/ml) (Orthoclone OKT3, Janssen-Cilag, Tilburg, el Países Bajos) e IL2 (50 IU/ml) (Proleukin, Novartis, Arnhem, el Países Bajos) fueron dos veces transducidos con sobrenadante vírico dentro de 48 horas en presencia de 50 IU/ml IL-2 y 4 $\mu\text{g/ml}$ polibreno (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, el Países Bajos).

60

Las células T transducidas fueron expandidas por estimulación con $\alpha\text{CD3/CD28}$ Dynabeads (0.5×10^6 gránulos/ 10^6 células) (Invitrogen) e IL-2 (50 IU/ml) y seleccionadas con 800 $\mu\text{g/ml}$ geneticina (Gibco, Karlsruhe, Alemania) y 5 $\mu\text{g/ml}$ puromicina (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, el Países Bajos) durante una semana.

Donde CD4+ policlonal indicada y CD8+ células T transducidas TCR con las fueron clasificadas en base a la expresión CD4 o CD8 usando sistema de separación CD4 y CD8 MACS (Miltenyi Biothech, Bergish Gladbach, Alemania).

Después de la selección, las células T transducidas TCR fueron expandidas in vitro en base a un protocolo REP previamente descrito (Riddell y Greenberg, 1990).

Ensayos de células T funcionales

[0080] Ensayo de liberación de ⁵¹Cr para citotoxicidad mediada por células fue previamente descrito (Kuball et al., 2004).

Las células diana fueron marcadas durante toda la noche con 100 µCu ⁵¹Cr (150µCu para células primarias) y posteriormente incubadas con células T transducidas en cinco proporciones efector a diana (E:T) entre 30:1 y 0.3:1.

Después de 4-6h la liberación de ⁵¹Cr se midió en el sobrenadante.

El cambio múltiplo fue calculado en base a la liberación ⁵¹Cr de γ9-G115wt/δ9-G115wt células T transducidas normalizadas a 1; para experimentos lado a lado basados en γ9-3wt/δ9-3wt, δ9-5wt/γ9-5wt o γ9-G115wt/δ9-G115wt normalizados a 1.

[0081] El IFNγ ELISPOT fue realizado utilizando anti-hu IFN-γ mAb1-D1 (I) K y mAb7-B6-1 (II) de Mabtech (Hamburgo; Alemania) seguido del procedimiento recomendado por los fabricantes (Besold et al., 2007).

En todos los ensayos, las células diana y efectoras (E:T 3:1) fueron incubadas durante 24h en presencia de pamidronato (Calbiochem; Alemania) donde se ha indicado.

[0082] El IFN- γ ELISA fue realizado utilizando el equipo ELISA-readi-go! (eBioscienc) después de las instrucciones de los fabricantes.

Las células efectoras y diana (E:T 1:1) fueron incubadas durante 24h en presencia de pamidronato como se ha indicado.

Donde se ha especificado, el cambio múltiplo se calculó en base a la secreción IFN-γ γ9-G115wt/δ9-G115wt células T transducidas normalizadas a 1; para los experimentos lado a lado basados en γ9-3wt/δ9-3wt, γ9-5wt/δ9-5wt o γ9-G115wt/δ9-G115wt normalizados a 1.

Modelos animales

[0083] Para inducir xenotransplantes tumorales, el cuerpo total subletal irradiado (2Gy), a ratones de 11- 17 semanas RAG-2-/-/γc-/-BALB/C se les inyectó i.v. con células 0.5x10⁶ Daudi-Luc (una donación en especie de Genmab Utrecht, el Países Bajos) o 5x10⁶ células RPMI8226/S-Luc (Anton Martens, Utrecht, el Países Bajos) junto con 10⁷ TCR γ9δ2+□ células T transducidas.

Los ratones RAG-2-/-/γc-/-BALB/C fueron originalmente obtenidos de AMCAS B.v. (Amsterdam, Países Bajos).

Los ratones fueron criados y alojados en la unidad de cultivo libre de patógenos específica (SPF) de la Instalación Animal Central de la Universidad de Utrecht.

Todos los experimentos animales fueron conducidos según las pautas institucionales después de adquirir permiso del comité ético local para experimentación animal y conforme a las leyes holandesas actuales en la experimentación animal.

Todos los tumores desarrollados de ratones, que principalmente crecen en la médula ósea in vivo visualizada una vez a la semana por formación de imágenes bioluminescente Biospace.

Los ratones fueron anestesiados por inhalación de isoflurano antes de que estos hayan recibido una inyección intraperitoneal de 100µl de 25 mg/ml Beetle Luciferin (Promega, USA).

Las imágenes de bioluminiscencia fueron adquiridas usando una tercera generación de cámara del dispositivo acoplado de carga intensificado, GaAs enfriado, controlado por el software Photo Vision y analizada con software M³Vision (todos de Photon Imager; Biospace Laboratory).

Los ratones recibidos 0.6x10⁶ UI de IL2 (Proleukin®; Novartis) en IFA S.c. en el día 1 (juntos con células tumorales) y cada 21 días hasta el fin del experimento.

El pamidronato (10mg/kg peso corporal) se aplicó en los grupos indicados el día 1 i.v. y cada 21 días i.p.

Los tumores de superación fueron visualizados in vivo por formación de imágenes bioluminescentes Biospace (BLI). Los ratones fueron anestesiados por isoflurano antes de que estos recibieran una inyección intraperitoneal (100µl) de 25mg/ml (Promega) de Beetle Luciferin. Las imágenes de bioluminiscencia fueron adquiridas y analizadas con el software M3Vision (Photon Imager, Biospace Laboratory).

Resultados

60 Reactividad antitumoral de clones individuales de célula T γ9δ2

[0084] Para investigar si los clones individuales de célula T γ9δ2 median la actividad diferencial contra las células tumorales en comparación con la población celular parental T γ9δ2, células T γ9δ2 a partir de un donante sano

fueron clonadas por dilución limitante y evaluadas contra un panel ancho de células tumorales en un IFN γ ELISPOT.

La alta variabilidad en el reconocimiento tumoral en cuanto a especificidad y avidéz funcional fue observada entre clones individuales celulares T $\gamma 9\delta 2$ (cl); en comparación con la población en original de masa, cl5 y cl13 producida doble, ya que muchos puntos IFN γ en respuesta a Daudi y cantidades significativas generadas selectivamente IFN γ cuando se han estimulado con K562; BT549 y MCF-7.

En cambio, cl3 y cel15 reconocieron solamente células Daudi.

La expresión de superficie de TCR $\gamma 9\delta 2$, NKG2D, CD158a, NKAT-2 y NKB-1 fue examinada.

10 Reactividad antitumoral mediada por TCR $\gamma 9\delta 2$ individuales

[0085] Para dilucidar diferencias entre TCR $\gamma 9\delta 2$ de clones reactivos al tumor, secuencias de cadenas (wt) TCR $\gamma 9$ y $\delta 2$ tipo salvaje de cl3 ($\gamma 9$ -cl3_{wt}/ $\delta 2$ -cl3_{wt}) y cl5 ($\gamma 9$ -cl5_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt}) se determinaron y alinearon con TCR $\gamma 9\delta 2$ G115.

15 Los tres TCR $\gamma 9\delta 2$ difirieron en sus CDR3 dominios: 1-3 aminoácidos entre la posición $\gamma 109$ y $\gamma 111$ en γ CDR3 y 4-8 aminoácidos entre $\delta 108$ y $\delta 112$ en δ CDR3.

Para determinar si diferentes TCR $\gamma 9\delta 2$ median la reactividad antitumoral diferencial intermedia, cadenas individuales TCR $\gamma 9\delta 2$ fueron clonadas en el vector retroviral pBullet y enlazadas a un marcador de selección como se describe.

20 Las combinaciones de tipo salvaje $\gamma 9$ -cl3_{wt}/ $\delta 2$ -cl3_{wt}, $\gamma 9$ -cl5_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt} y $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt} fueron transducidas en las células T $\alpha\beta$ de sangre periféricas, seleccionadas por antibióticos y además expandidas. TCR $\gamma 9\delta 2$ G115 ($\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt}) servidas como control, como hicieron las células transducidas con un casete de vector vacío (control). Las células TCR $\gamma 9\delta 2$ transducidas mostraron TCR $\gamma 9\delta 2$ expresión similar y se evaluaron para su actividad lítica contra el tumor diana Daudi en un ensayo de liberación ^{51}Cr (figura 1A).

25 La expresión de células T $\gamma 9$ -cl3_{wt}/ $\delta 2$ -cl3_{wt} tuvo un 50 por ciento reducido de capacidad para lisar células tumorales ($p < 0.01$), mientras que las células T con $\gamma 9$ -cl5_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt} fueron casi dos veces tan potentes ($p < 0.01$) como el control $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt}.

Para determinar si los fenotipos de células TCR $\gamma 9\delta 2$ transducidas con avidéz funcional disminuida o aumentada están también presentes en el nivel de citocina se realizó un ensayo de titulación de pamidronato.

30 El tratamiento de pamidronato de células Daudi bloquea la vía de mevalonato aguas abajo para IPP causando la acumulación de IPP y una secreción de citocina mejorada de células T sensibles.

Para excluir la activación tipo NK CD4+ células T transducidas TCR $\gamma 9\delta 2$, que carecen de la expresión de receptores NK mayores tipo NKG2D, fueron seleccionadas por clasificación MACS.

Los transductantes fueron evaluados a concentraciones diferentes de pamidronato contra el tumor diana Daudi.

35 Las células T transducidas con control que fueron sometidas a estimulación equivalente pero expresan un irrelevante TCR $\alpha\beta$ sirvieron como control.

La IFN γ secreción se midió por ELISA y el medio concentración eficaz máximo (EC50) fue calculado (figura 1B).

40 De acuerdo con los cambios observados para capacidad lítica, las células T transducidas con $\delta 9$ -cl3_{wt}/ $\delta 2$ -cl3_{wt} cantidades inferiores segregadas de IFN (max. 600pg/ml), mientras las células expresan T $\gamma 9$ -cl5_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt} produjeron niveles más altos de IFN γ (max. 1300pg/ml) en todas las concentraciones de pamidronato, con respecto al control $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt} (max. 800pg/ml).

A pesar de los niveles más altos diferentes en la secreción IFN γ , todos los mutantes seleccionados y el control de tipo salvaje tuvo un comparable pamidronato EC50 (< 30 pg/ml). Estos resultados indican que los clones diferentes $\gamma 9\delta 2$ TCR median avidéz funcional diferente y la variabilidad alta entre clones parentales de célula T $\gamma 9\delta 2$ en el reconocimiento tumoral parece ser regulada sustancialmente por los dominios CDR3 de receptores individuales de célula T $\gamma 9\delta 2$.

Intercambio combinatorial de cadena $\gamma\delta$ TCR (CTE) como método rápido para modular la avidéz funcional de células T diseñadas

50 [0086] Para realizar la determinación anterior, concebimos una estrategia nombrada intercambio combinatorio de cadena $\gamma\delta$ TCR (CTE), que produce la expresión de cadenas recién combinadas TCR $\gamma 9$ y $\delta 2$ en células T diseñadas.

Durante este proceso, $\gamma 9$ -G115_{wt} fue combinado con $\delta 2$ -cl3_{wt} o $\delta 2$ -cl5_{wt} y $\delta 2$ -G115_{wt} con $\gamma 9$ -cl3_{wt} o $\gamma 9$ -cl5_{wt}.

55 Estas combinaciones fueron retroviralmente transducidas en células T $\alpha\beta$.

En todos los transductantes equivalentes la expresión TCR $\gamma\delta$ fue detectada mientras el endógeno $\alpha\beta$ TCR fue claramente regulado a la baja.

Esto resultó no solo en una alorreactividad casi abolida de expresión de células T $\alpha\beta$ $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt} pero también de células T $\alpha\beta$ diseñadas de CTE seleccionadas cuando se compara con células transducidas como control.

60 Así, la reactividad de células T diseñadas de CTE principalmente depende de los expresados TCR $\gamma\delta$ y no en endógenos residuales TCR $\alpha\beta$.

Después, los transductantes fueron evaluados funcionalmente contra el tumor diana Daudi en un ensayo de liberación de ^{51}Cr (figura 1C).

65 El intercambio de cadenas $\gamma 9$ - o $\delta 2$ de hecho causó diferencias notables.

En comparación con el TCR original $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt}, la combinación de $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl3_{wt}, $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt} o $\gamma 9$ -cl5_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt} medió 40 a 70 por ciento de lisis específica aumentada de células tumorales (todos $p < 0.05$).

La misma magnitud de reconocimiento se observó cuando la IFN γ producción de células T transducidas CD4⁺ TCR $\gamma\delta$ fue evaluada en un ensayo de titulación de pamidronato (figura 1D).

Además, solo la combinación $\gamma 9$ -cl3_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt} llevada a la IFN γ producción disminuida de células transducidas en todas las concentraciones de pamidronato (max. 100pg/ml), mientras todos los otros TCR $\gamma\delta 2$ CTE mediados una secreción de IFN γ aumentada (max. ≥ 1000 pg/ml) en comparación con el control TCR $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt} (max. 800pg/ml).

Los pamidronatos EC50 iguales de < 30 pg/ml fueron calculados para todas las células TCR $\gamma\delta 2$ transducidas sensibles.

[0087] Para determinar si la interacción célula-célula influye en la respuesta cinética diferentemente de la estimulación de pamidronato, CTE-TCR $\gamma\delta 2$ $\gamma 9$ -G115_{wt} / $\delta 2$ -cl5_{wt} que media la avidéz funcional mejorada y controla TCR $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt} fueron evaluados en el ensayo de titulación a una proporción efector a diana (E:T) (figura 1E) y se calculó un E:T-50.

De manera interesante, las células T con $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt} respondieron diferentemente con un E:T-50 de 0.3:1, en comparación con un E:T-50 de 1:1 calculado para las células de control que expresan $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt}.

Para probar si la interacción entre diferentes TCR y ligandos - así la afinidad - es de hecho aumentada, los conjugados célula-célula entre células Daudi y T que expresan afinidad potencialmente alta ($\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt}) o baja ($\gamma 9$ -cl3_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt}) TCR fueron medidos por citometría de flujo.

Significativamente más interacciones de célula-célula fueron observadas cuando $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt} fue expresado en comparación con $\gamma 9$ -cl3_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt} y células T transducidas como control (figura 1F).

Este efecto no dependió de la presencia de pamidronato.

Por lo tanto, G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt} es una alta afinidad TCR $\gamma\delta 2$. Por lo tanto, CTE es un método eficaz para rápidamente diseñar TCR $\gamma\delta 2$ con afinidad aumentada, mediante avidéz funcional mejorada en células T transducidas.

Los residuos en δ CDR3 y J $\delta 1$ están implicados en estabilidad TCR $\gamma\delta 2$ y en la mediación de avidéz funcional de células T $\alpha\beta$ diseñadas

[0088] Para dilucidar los requisitos moleculares de δ CDR3 para mediar la avidéz funcional óptima, mutagénesis de alanina de un modelo δ CDR3 (clon G115) fue realizada con el segmento entero J $\delta 1$, ya que los residuos importantes también han sido proporcionados dentro de J $\gamma 1$.

Durante un cribado inicial, cinco áreas de secuencia fueron descubiertas para influir la expresión TCR o avidéz funcional de TCR células T $\gamma\delta 2$ transducidas.

Para clarificar el grado al que los únicos residuos son responsables de la expresión perjudicada TCR $\gamma\delta 2$ y avidéz funcional mediada TCR inferior, se generaron mutaciones de alanina únicas.

Las cadenas tipo salvaje y mutadas $\delta 2$ -G115 fueron expresadas en combinación con $\gamma 9$ -G115_{wt} en células T $\alpha\beta$ y evaluadas para TCR $\gamma\delta 2$ expresión utilizando un anticuerpo específico de cadena $\delta 2$ (figura 2A).

Tres mutaciones de alanina únicas provocaron un 70 por ciento de expresión TCR inferior cuando se compara con el $\delta 2$ -G115_{wt} no mutado, es decir $\delta 2$ -G115L116A, $\delta 2$ -G115F118A y $\delta 2$ -G115V124A (tabla 3).

Los resultados comparables fueron observados utilizando anticuerpos dirigidos contra la cadena $\gamma 9$ o el dominio constante del TCR $\gamma\delta$, indicando la importancia de $\delta 2$ -G115L116; $\delta 2$ -G115F118 y $\delta 2$ -G115V124 para expresión TCR estable.

La estructura cristalina de TCR $\gamma\delta 2$ G115 sostiene nuestras conclusiones: $\delta 2$ -G115L116; $\delta 2$ -G115F118 y $\delta 2$ -G115V124 se sitúan en núcleos hidrofóbicos (figura 2B) y podrían ser así cruciales para la estabilidad estructural del TCR $\gamma\delta 2$ G115.

[0089] Para dirigir el impacto de mutaciones de alanina únicas en la avidéz funcional, se realizó un ensayo de liberación ⁵¹Cr (figura 2C).

Los transductantes con baja expresión TCR ($\delta 2$ -G115L116A, $\delta 2$ -G115F118A y $\delta 2$ -G115V124A) podrían no lisar células tumorales eficazmente, ya que estas han demostrado un 80 por ciento de capacidad lítica inferior cuando se compara con células transducidas con $\delta 2$ -G115_{wt}.

Las células T con mutación $\delta 2$ -G115L109A y $\delta 2$ -G115I117A (tabla 3) debidamente expresadas el TCR sin embargo mostraron un 70 por ciento de actividad lítica reducida cuando se comparó con $\delta 2$ -G115_{wt} células de expresión.

Resultados similares fueron obtenidos cuando los mutantes TCR fueron transducidos en células Jurkat CD4⁺ y la producción IL-2 fue medida (datos no mostrados).

La reducción de actividad lítica también se vio cuando las sustituciones de alanina $\delta 2$ -G115L109A y $\delta 2$ -G115I117A fueron introducidas en la cadena $\delta 2$ de clon $\gamma\delta$ TCR 3. Estos resultados indican que no solo el residuo δ L109, sino también δ I117 en δ CDR3 pueden ser importantes generalmente para TCR $\gamma\delta 2$ para mediar avidéz funcional (figura 2D).

Los alineamientos de secuencia entre cadenas $\delta 2$ de clones 3,5 y G115 indicaron que δ L109 y δ I117 se pueden conservar (tabla 2).

Tabla 3: secuencia CDR3 de TCR γ 9 δ 2 G115, clon 3 y clon 5

	γ CDR3													J γ P												
	104	105	106	107	108	109	110	111	111.1	112.1	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127
γ 9-cl3 _{wt}	C	A	L	W	E	E	.	.	E	L	G	K	K	I	K	V	F	G	P	G	T	K	L	I	I	T
γ 9-cl5 _{wt}	C	A	L	W	E	I	.	Q	E	L	G	K	K	I	K	V	F	G	P	G	T	K	L	I	I	T
γ 9-G115 _{wt}	C	A	L	W	E	A	Q	Q	E	L	G	K	K	I	K	V	F	G	P	G	T	K	L	I	I	T

	δ CDR3													J δ 1														
	104	105	106	107	108	109	110	111	111.1	112.2	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	
δ 2-cl3 _{wt}	C	A	C	D	L	L	G	Y	T	D	K	L	I	F	G	K	G	T	R	V	T	V	E	P
δ 2-cl5 _{wt}	C	A	C	D	A	L	K	R	.	.	T	D	T	D	K	L	I	F	G	K	G	T	R	V	T	V	E	P
δ 2-G115 _{wt}	C	A	C	D	T	L	G	M	G	G	E	Y	T	D	K	L	I	F	G	K	G	T	R	V	T	V	E	P

5

La tabla de arriba muestra un alineamiento de tres clones y la numeración enumerada es conforme a IGMT. La secuencia γ 9 G115_{wt} enumerada corresponde a aminoácidos C117-T142 de SEQ ID de secuencia de aminoácidos NO.1. γ 112.1L, de cualquier clon 3,5 o G115_{wt} así corresponde a L126 de SEQ ID de secuencia de aminoácidos NO.1. La δ 2-G115_{wt} secuencia enumerada corresponde a aminoácidos C111-C138 de SEQ ID de secuencia de aminoácidos NO.2.

10

Por lo tanto, como muestra este alineamiento, las regiones CDR3 correspondientes de clones 3 y 5 pueden fácilmente ser identificadas vía alineamiento.

15

Influencia de longitud CDR3 en la avidéz funcional de TCR células T γ 9 δ 2 transducidas

20

[0090] Las sustituciones de alanina durante mutagénesis de escaneado de alanina de TCR γ 9 δ 2 G115 podrían reemplazar partes grandes del dominio δ CDR3 sin consecuencias funcionales.

25

Esto aumenta la posibilidad de que el factor crucial para las diferentes avidencias funcionales que difieren de TCR γ 9 δ 2 combinaciones diferentes también pueda implicar la longitud relativa entre los residuos importantes funcionalmente δ 2-G115_{L109} y el residuo importante estructuralmente δ 2-G115_{L116}.

30

Por lo tanto, diferentes δ 2-G115 mutantes de longitud fueron generados.

Ya que el triple δ 2-G115_{T113-K115} es importante también para la expresión de superficie estable (datos no mostrados), nueve mutantes de longitud (δ 2-G115LM) con 0 a 12 alanina entre δ 2-G115_{L109} y δ 2-G115_{T113} fueron generados e igualmente expresados en células T $\alpha\beta$, nuevamente en combinación con γ 9-G115_{wt} (figura 3A).

35

Para probar la avidéz funcional de células T δ 2-G115_{LM} transducidas, células T transducidas TCR CD4⁺ fueron seleccionadas por clasificación MACS y un IFN γ ELISA en respuesta a Daudi fue realizado en presencia de pamidronato (figura 3B).

40

Células T diseñadas que expresan δ 2-G115_{LM0} y δ 2-G115_{LM1} fueron incapaces de producir IFN γ y las células T que expresan δ -G115_{LM4} o δ -G115_{LM12} segregadas solo sobre la mitad de la cantidad de IFN γ en comparación con células δ 2 G115_{wt} transducidas.

Los otros mutantes (δ 2-G115_{LM2, 3, 5, 6, 9}) indujeron cantidades comparables de IFN γ en células T diseñadas con respecto a la expresión de transductantes δ 2-G115_{wt}.

Los mutantes con degradación funcional (δ 2-G115_{LM0,1,4,12}, Tabla 4) fueron además evaluados contra las concentraciones de pamidronato en aumento y un EC50 fue calculado.

35

A pesar de los niveles más altos diferentes en máxima secreción IFN γ , todas las células transducidas seleccionadas δ 2-G115_{LM} y el control de tipo salvaje tuvo un pamidronato-EC50 comparable (<30pg/ml) (figura 3C).

40

Las mutaciones de longitud fueron también estudiadas en γ CDR3 de TCR γ 9 δ 2 G115 diseñando extensiones de 1-6 alaninas entre γ 9-G115_{E108} y γ 9-G115_{E111.1} (γ 9-G115_{LM1-6}). Sin embargo, esto no ha afectado a la avidéz funcional.

[0091] Esto indica que las extensiones de alanina considerables dentro de dominios $\gamma 9$ y $\delta 2$ CDR3 se pueden tolerar.

Sin embargo, las extensiones de alanina demasiado cortas y demasiado largas entre $\delta 2$ -G115L109 y $\delta 2$ -G115T113 en particular, al igual que extensiones con cuatro alaninas pueden estar asociadas con una función reducida o ausente de un TCR $\gamma 9\delta 2$ (figura 3B y 3C).

Consecuencias para el repertorio fisiológico de célula T $\gamma 9\delta 2$

[0092] La base de datos ImMunoGeneTics (IMGT) fue buscada para extensiones proporcionadas entre $\gamma 9$ -G115_{E109} y $\gamma 9$ -G115_{E111.1} al igual que $\delta 2$ -G115_{L109} y $\delta 2$ -G115_{T113}.

Una longitud preferencial para cadenas proporcionadas $\gamma 9$ fue descubierta para regiones CDR3 correspondientes a $\gamma 9$ -G115_{LM2} y $\gamma 9$ -G115_{LM3}, pero extensiones más cortas fueron proporcionadas también.

En cambio, las cadenas $\delta 2$ con dominios cortos δ CDR3, tales como $\delta 2$ -G115_{LM1} o $\delta 2$ -G115_{LM0}, no se proporcionaron (figura 3D), de acuerdo con nuestra observación que tales cadenas no pueden ser funcionales.

La mayoría de $\gamma 9\delta 2$ TCR enumerados contienen δ CDR3 longitudes que corresponden a $\delta 2$ -G115_{LM5,6,7}.

Estas conclusiones sostienen una preferencia para seleccionar TCR $\gamma 9\delta 2$ con una longitud δ CDR3 de 5-7 residuos entre $\delta 2$ -G115_{L109} y $\delta 2$ -G115_{T113}.

Sin embargo, las diferencias de secuencia individual pueden todavía jugar un papel en TCR $\gamma 9\delta 2$ avides funcional mediada.

Influencia de la CDR3 secuencia en avides funcional mediada TCR $\gamma 9\delta 2$

[0093] Para probar la longitud y secuencia de δ CDR3 para mediar la avides funcional óptima, TCR $\gamma 9\delta 2$ mutantes de longitud $\delta 2$ -G115_{LM2}, $\delta 2$ -G115_{LM4}, y $\delta 2$ -G115_{LM6} fueron transducidos en células T $\alpha\beta$ en combinación con $\delta 9$ -G115_{wt}.

La secreción IFN γ y de transductantes en respuesta a Daudi se comparó con células transducidas con secuencias de tipo salvaje de $\delta 2$ -cl3_{wt} (corresponde con la longitud a $\delta 2$ -G115_{LM2}), $\delta 2$ -cl5_{wt} (corresponde en longitud a $\delta 2$ -G115_{LM4}) y $\delta 2$ -G115_{wt} (corresponde en longitud a $\delta 2$ -G115_{LM6}) (tabla 3).

Las células T transducidas con $\delta 2$ -G115_{LM6} y $\delta 2$ -G115_{wt} no han diferido en la cantidad de secreción de citocina, todas las otras combinaciones de cadenas de tipo salvaje mostraron un aumento de más de dos múltiplos en IFN γ cuando se compara con el mutante de longitud que contenía selectivamente alaninas (figura 3E).

Estos resultados fueron confirmados cuando la capacidad lítica de células transducidas fue evaluada.

La secuencia en δ CDR3 puede por lo tanto también ser un factor significativo para el funcionamiento de un TCR $\gamma 9\delta 2$.

[0094] Por consiguiente, la importancia secuencial de γ CDR3 fue estudiada.

Así, $\gamma 9$ -G115_{LM1-3} fueron transducidos en células T en combinación con $\delta 2$ -G115_{wt}.

La secreción IFN γ de transductantes en respuesta a Daudi se comparó con células transducidas con $\gamma 9$ -cl3_{wt} (corresponde en longitud a $\gamma 9$ -G115_{LM1}), $\gamma 9$ -cl5_{wt} (corresponde en longitud a $\gamma 9$ -G115_{LM2}) y $\gamma 9$ -G115_{wt} (correspondiente a $\gamma 9$ -G115_{LM3}) (tabla 3).

La expresión de células T $\gamma 9$ -cl3_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt} cantidades inferiores producidas selectivamente de IFN γ cuando se compara con su equivalente $\gamma 9$ -G115_{LM1} (figura 4A).

Previamente, la misma combinación TCR $\gamma 9\delta 2$ se descubrió también para mediar la avides funcional reducida (figura 1 C y 1D).

La pérdida de actividad podría ser restaurada para niveles normales (referida a TCR $\gamma 9\delta 2$ G115_{wt}) mediante mutación γ CDR3_{E109} en $\gamma 9$ -cl3_{wt} a γ CDR3_{A109}, que demuestra que un cambio único en la secuencia variable de γ CDR3 puede ser suficiente para regular avides funcional de TCR células T $\gamma 9\delta 2$ transducidas evaluadas aquí.

[0095] En resumen, la longitud y secuencia del dominio entre L109 y T113 (tabla 3) puede jugar un papel en avides funcional TCR $\gamma 9\delta 2$ mediada.

Además, la secuencia individual entre E108 y E111.1 en γ CDR3 puede ostaculizar la actividad de un TCR $\gamma 9\delta 2$ y en G115 δ CDR3_{A109} puede ser de importancia para interacción de ligando (tabla 3 y figura 4B).

Combinada, esta proporciona una razón fundamental para TCR $\gamma 9\delta 2$ diseñados CTE pero también para mutagénesis aleatoria dentro de ambas $\gamma 9$ y $\delta 2$ CDR3.

Células T diseñadas CTE como una herramienta para inmunoterapia cancerosa

[0096] CTE TCR $\gamma 9\delta 2$ diseñados con actividad aumentada contra las células tumorales son candidatos interesantes para estrategias terapéuticas de gen TCR.

Cambios en la avides funcional mediada por CTE-TCR $\gamma 9\delta 2$ pueden constituir un fenómeno único de un par definido TCR $\gamma 9\delta 2$ en respuesta a la línea celular B-linfoblástica Daudi o pueden ser una respuesta general para más dianas tumorales.

Por lo tanto, CTE-TCR $\gamma 9\delta 2$ que mediaron la actividad aumentada ($\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt}) o reducida ($\gamma 9$ -cl3_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt}) fueron evaluados contra varios tumores en un IFN γ ELISA en presencia de concentraciones farmacológicas de pamidronato (10 μ M) (figura 5A).

- La reactividad tumoral se aumentó significativamente contra una gama entera de diferentes entidades tumorales con otros cánceres hematológicos tal como RPMI8226/S, OPM2, LME1 (todo mieloma múltiple), K562 (leucemia mielógena) al igual que líneas celulares de cáncer sólido tal como Saos2 (osteosarcoma), MZ1851 RC (carcinoma de célula renal), SCC9, Fadu (cáncer de cuello y de cabeza), MDA-MB231, MCF7; BT549 (todo
- 5 cáncer de pecho), y SW480 (carcinoma de colon) cuando se toma ventaja de $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt}, en comparación con $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt} y se redujo significativamente o incluso se eliminó para todas las otras dianas utilizando $\gamma 9$ -cl3_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt}.
- Además, las células T diseñadas de CTE con actividad aumentada contra las células tumorales todavía no
- 10 mostró cualquier reactividad hacia el tejido sano tal como PBMC y fibroblastos.
- La actividad lítica superior de células T diseñadas con $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt} también se observó para células cancerosas hematológicas como RPMI8226/S, OPM2; L363 al igual que líneas celulares de cáncer sólido Saos2; MZ1851 RC, SCC9; MDA-MB231 y SW480 cuando se comparó con células T de control que expresan $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt} (figura 5B).
- 15 Por lo tanto, CTE TCR $\gamma 9\delta 2$ diseñados pueden proporcionar una respuesta antitumoral más alta contra un panel ancho de células tumorales mientras no afecten al tejido normal y así tienen el potencial para aumentar la eficacia de células T diseñadas TCR.
- [0097] Para valorar el impacto clínico potencial de TCR $\gamma 9\delta 2$ diseñados de CTE se evaluó si una eficacia
- 20 aumentada de CTE-TCR $\gamma 9\delta 2$ también puede estar presente cuando blastos primarios de pacientes AML se eligen como dianas.
- Por lo tanto, las células T transducidas CTE-TCR $\gamma 9\delta 2$ fueron evaluadas contra 11 blastos AML primarios y células originales sanas CD34⁺ en un IFN γ -ELISpot (figura 5C).
- Los transductantes que expresan $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt} reconocieron 8 de 11 muestras AML primarias igualmente o
- 25 superiormente en comparación con $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt} de control.
- Además, CD34⁺ células originales no se reconocieron por expresión de células T $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt} o $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt}.
- A consecuencia de estas conclusiones, TCR diseñado de CTE $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt} parece ser un candidato
- 30 prometedor para aplicación clínica.
- [0098] Finalmente, para demostrar que CTE-TCR $\gamma 9\delta 2$ son seguros y funcionan con eficacia aumentada cuando
- se compara con los constructos originales *in vivo*, transferencia adoptiva de células T diseñadas con CTE-TCR
- se estudió en un modelo de ratón humanizado: protección contra el crecimiento de Daudi o RPMI8226/S en
- 35 Rag2^{-/-} γc ^{-/-} ratones noqueados dobles.
- Por lo tanto, las células T $\alpha\beta$ de sangre periféricas fueron transducidas con CTE-TCR $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt} o control
- TCR $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt}.
- Las células T transducidas CTE-TCR mostraron la expresión similar de marcadores de referencia con L-selectina
- 40 y CCR7.
- Los ratones Rag2^{-/-} γc ^{-/-} irradiados recibieron Daudi transducidos de luciferasa (0.5x10⁶) o células RPMI8226/S (5x10⁶) y 10⁷ células T diseñadas de CTE por inyección intravenosa.
- La frecuencia de infusión de células T fue reducida a una inyección intravenosa con respecto a nuestro modelo
- 45 proporcionado previamente donde se proporcionaron dos infusiones para probar la superioridad de células T transducidas CTE-TCR bajo condiciones subóptimas.
- Consecuentemente, esto resultó en la pérdida de protección con células T TCR G115_{wt} diseñadas cuando el
- crecimiento del tumor se midió por formación de imágenes de bioluminiscencia (BLI) (figura 6A y 6B).
- 50 Sin embargo, las células T diseñadas de CTE que expresan $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -cl5_{wt} claramente redujeron el crecimiento del tumor para Daudi (20.000 cuentas/min, día 42; n=4) y RPMI8226/S (80.000 cuentas/min, día 35; n=7) en comparación con TCR G115_{wt} células T diseñadas (Daudi: 180.000 cuentas/min, día 42; RPMI8226/S: 210.000 cuentas/min, día 35).
- Las células T se podrían encontrar en la periferia hasta 1-2 semanas después de infusión en ratones, pero la
- 55 frecuencia de células T no correlacionó con la regresión del tumor.
- Finalmente, en el modelo Daudi rápidamente letal solo ratones tratados con células T diseñadas de CTE tuvieron una supervivencia aumentada significativa en general de <2 meses con respecto a ratones tratados con las células T que expresan $\gamma 9$ -G115_{wt}/ $\delta 2$ -G115_{wt} (figura 6C).
- Estos resultados indican que CTE TCR $\gamma 9\delta 2$ diseñados median eficazmente la reactividad antitumoral *in vivo*,
- que señala a CTE como una herramienta potencial para optimizar TCR $\gamma 9\delta 2$ para aplicación clínica.
- [0099] En la tabla 4 de abajo, los resultados con respecto a métodos realizados según la invención se enumeran.
- 60 El dominio delta-CDR3 se evaluó para función TCR por mutagénesis de alanina (tabla 3, mutación) del dominio CDR3 (con el J-segmento entero) del clon G115 bien estudiado y se han descubierto aminoácidos que pueden ser relevantes para estabilidad TCR y función TCR.
- Además, se evaluó la longitud de secuencia de aminoácidos (tabla 3, mutaciones de longitud) entre $\gamma E108$ y $\gamma E111.1$ de la cadena $\gamma 9$ y entre $\delta L109$ y $\delta T113$ de la cadena $\delta 2$.
- Las secuencias individuales de dominios CDR3 $\gamma 9$ y CDR3 $\delta 2$ son de importancia para la función (tabla 3, secuencia).

Diseñando CTE las cadenas TCR $\gamma 9$ y $\delta 2$ de clon G115 fueron combinadas con cadenas TCR $\gamma 9$ y $\delta 2$ de clon 3 y clon 5, respectivamente.

CTE diseñado resultó en 4 TCR $\gamma\delta$ nuevamente diseñados.

Los TCR originales y los nuevos TCR diseñados CTE (tabla 3, combinación) fueron transducidos en células T $\alpha\beta$ y evaluados para su función

5

Tabla 4: el efecto de mutaciones y combinaciones de cadena en función $\gamma\delta 2$ -TCR

TCR $\gamma\delta 2$		expresión	IFN- γ respuesta	actividad citotóxica
	mutación			
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115	original	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115_{T108A}	$\delta T108 \rightarrow \delta A108$	++++	+++	+++
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115_{L109A}	$\delta L109 \rightarrow \delta A109$	++++	-	-
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115_{G110A}	$\delta G110 \rightarrow \delta A110$	+++	nd	+++
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115 M111A, G111.1A, G112.2A	$\delta M111 \rightarrow \delta A111$ $\delta G111.1 \rightarrow \delta A111.1$ $\delta G112.2 \rightarrow \delta A112.2$	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115 E112.1A, Y112A, T113A	$\delta E112.1 \rightarrow \delta A112.1$ $\delta Y112 \rightarrow \delta A112$ $\delta T113 \rightarrow \delta A113$	+++	+++	+++
$\gamma 9$ -G115/ $\delta 2$ -G115 _{D114A}	$\delta D114 \rightarrow \delta A110$	+++	nd	+++
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115_{K115A}	$\delta L115 \rightarrow \delta A115$	+++	nd	+++
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115_{L116A}	$\delta L116 \rightarrow \delta A116$	-	nd	-
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115_{I117A}	$\delta I117 \rightarrow \delta A117$	+++	-	-
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115_{F118A}	$\delta F118 \rightarrow \delta A118$	-	nd	-
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115_{G119A}	$\delta G119 \rightarrow \delta A119$	+++	nd	+++
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115 K120A, G121A, T122A	$\delta K120 \rightarrow \delta A120$ $\delta G121 \rightarrow \delta A121$ $\delta T122 \rightarrow \delta A122$	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115_{R123A}	$\delta R123 \rightarrow \delta A123$	+++	nd	+++
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115_{V124A}	$\delta V124 \rightarrow \delta A124$	-	nd	-
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115_{T125A}	$\delta T125 \rightarrow \delta A125$	+++	nd	+++
$\gamma 9$-G115 / $\delta 2$-G115_{V126A}	$\delta V126 \rightarrow \delta A126$	+++	nd	+++
$\gamma 9$-G115 / $\delta 2$-G115_{E127A}	$\delta E127 \rightarrow \delta A127$	+++	nd	+++
$\gamma 9$-G115 / $\delta 2$-G115_{P128A}	$\delta P128 \rightarrow \delta A128$	+++	nd	+++
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115 eliminación T113-K115	eliminación $\delta T113$, $\delta D114$ y $\delta K115$	+	nd	nd
	mutación de longitud			
$\gamma 9$-G115_{LM1} / $\delta 2$-G115	$\gamma E108-1A-\gamma E111.1$	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115_{LM2} / $\delta 2$-G115	$\gamma E108-2A-\gamma E111.1$	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115_{LM3} / $\delta 2$-G115	$\gamma E108-3A-\gamma E111.1$	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115_{LM4} / $\delta 2$-G115	$\gamma E108-4A-\gamma E111.1$	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115_{LM5} / $\delta 2$-G115	$\gamma E108-5A-\gamma E111.1$	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115_{LM6} / $\delta 2$-G115	$\gamma E108-6A-\gamma E111.1$	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115 / $\delta 2$-G115_{LM0}	$\delta L109-0A-\delta T113$	+++	-	-
$\gamma 9$-G115 / $\delta 2$-G115_{LM1}	$\delta L109-1A-\delta T113$	+++	-	-
$\gamma 9$-G115 / $\delta 2$-G115_{LM2}	$\delta L109-2A-\delta T113$	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115 / $\delta 2$-G115_{LM3}	$\delta L109-3A-\delta T113$	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115 / $\delta 2$-G115_{LM4}	$\delta L109-4A-\delta T113$	+++	+	+++
$\gamma 9$-G115 / $\delta 2$-G115_{LM5}	$\delta L109-5A-\delta T113$	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115 / $\delta 2$-G115_{LM6}	$\delta L109-6A-\delta T113$	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115 / $\delta 2$-G115_{LM9}	$\delta L109-9A-\delta T113$	+++	++	+++
$\gamma 9$-G115 / $\delta 2$-G115_{LM12}	$\delta L109-12A-\delta T113$	+++	+	+++
TCR $\gamma\delta 2$		expresión	respuesta IFN- γ	actividad citotóxica
	secuencia			
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-cl3	original	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115 / $\delta 2$-G115_{LM2}	$\delta L109-2A-\delta T113$	+++	+	+
$\gamma 9$-G115 / $\delta 2$-cl5	original	+++	+++	+++
$\gamma 9$-G115/$\delta 2$-G115_{LM4}	$\delta L109-4A-\delta T113$	+++	+	+
$\gamma 9$-cl3/$\delta 2$-G115	Original	+++	Nd	+
$\gamma 9$-cl3_{E109A}/$\delta 2$-G115	$\gamma E109 \rightarrow \gamma A109$	+++	Nd	+++

ES 2 659 217 T3

	combinación			
γ9-G115/δ2-G115	Original	+++	+++	+++
γ9-cl3/δ2-cl3	Original	+++	+	+
γ9-cl5/δ2-cl5	Original	+++	+++++	+++++
γ9-cl3/δ2-G115	CTE	+++	+	+
γ9-G115/δ2-cl3	CTE	+++	++++	++++
γ9-cl5/δ2-G115	CTE	+++	++++	++++
γ9-G115/δ2-cl5	CTE	+++	+++++	+++++

LISTADO DE SEC

[0100]

- 5 AA = secuencia de aminoácidos
NA = secuencia de ácidos nucleicos

SEQ ID	Descripción	Tipo
1	cadena receptora de célula T γ9 (G115)	AA
2	cadena receptora de célula T δ2 (G115)	AA
3	región CDR3 de cadena receptora de célula T γ9 (G115)	AA
4	región CDR3 de cadena receptora de célula T δ2 (G115)	AA
5	cadena receptora de célula T γ9 (G115)	NA
6	cadena receptora de célula T δ2 (G115)	NA
7	cadena receptora de célula T γ9 (clon 3)	NA
8	cadena receptora de célula T γ9 (clon 3)	AA
9	cadena receptora de célula T δ2 (clon 3)	NA
10	cadena receptora de célula T δ2 (clon 3)	AA
11	cadena receptora de célula T γ9 (clon 5)	NA
12	cadena receptora de célula T γ9 (clon 5)	AA
13	cadena receptora de célula T δ2 (clon 5)	NA
14	cadena receptora de célula T δ2 (clon 5)	AA
15	ALKRTD	AA
16	ALWEIQELGKKIKV	AA
17	ACDALKRTDSDKLI	AA
18	ACDLLGiTDKLI	AA
19	TLGGMGEi	AA

Listado de secuencias

10

[0101]

<110> Kuball, Jurgen

<120> Intercambio combinatorio de receptor de célula gamma 9 delta 2 T

15

<130> P31496PC00

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 315

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 659 217 T3

<400> 1

Met Val Ser Leu Leu His Ala Ser Thr Leu Ala Val Leu Gly Ala Leu
1 5 10 15

Cys Val Tyr Gly Ala Gly His Leu Glu Gln Pro Gln Ile Ser Ser Thr
20 25 30

Lys Thr Leu Ser Lys Thr Ala Arg Leu Glu Cys Val Val Ser Gly Ile
35 40 45

Thr Ile Ser Ala Thr Ser Val Tyr Trp Tyr Arg Glu Arg Pro Gly Glu
50 55 60

Val Ile Gln Phe Leu Val Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Val Arg Lys
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ile Pro Ser Gly Lys Phe Glu Val Asp Arg Ile Pro Glu
85 90 95

Thr Ser Thr Ser Thr Leu Thr Ile His Asn Val Glu Lys Gln Asp Ile
100 105 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Glu Ala Gln Gln Glu Leu Gly Lys
115 120 125

Lys Ile Lys Val Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Ile Ile Thr Asp Lys
130 135 140

Gln Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro Ser
145 150 155 160

Ile Ala Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys Leu Leu
165 170 175

ES 2 659 217 T3

Glu Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Lys Ile His Trp Glu Glu Lys Lys
 180 185 190

Ser Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys Thr Asn
 195 200 205

Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Lys Ser Leu
 210 215 220

Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys Asn Gly
 225 230 235 240

Val Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr
 245 250 255

Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu
 260 265 270

Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu
 275 280 285

Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg
 290 295 300

Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 305 310 315

<210> 2

<211> 292

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Arg Ile Ser Ser Leu Ile His Leu Ser Leu Phe Trp Ala Gly
 1 5 10 15

Val Met Ser Ala Ile Glu Leu Val Pro Glu His Gln Thr Val Pro Val
 20 25 30

Ser Ile Gly Val Pro Ala Thr Leu Arg Cys Ser Met Lys Gly Glu Ala
 35 40 45

Ile Gly Asn Tyr Tyr Ile Asn Trp Tyr Arg Lys Thr Gln Gly Asn Thr
 50 55 60

Met Thr Phe Ile Tyr Arg Glu Lys Asp Ile Tyr Gly Pro Gly Phe Lys
 65 70 75 80

ES 2 659 217 T3

Asp Asn Phe Gln Gly Asp Ile Asp Ile Ala Lys Asn Leu Ala Val Leu
85 90 95

Lys Ile Leu Ala Pro Ser Glu Arg Asp Glu Gly Ser Tyr Tyr Cys Ala
100 105 110

Cys Asp Thr Leu Gly Met Gly Gly Glu Tyr Thr Asp Lys Leu Ile Phe
115 120 125

Gly Lys Gly Thr Arg Val Thr Val Glu Pro Arg Ser Gln Pro His Thr
130 135 140

Lys Pro Ser Val Phe Val Met Lys Asn Gly Thr Asn Val Ala Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Glu Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Arg Ile Asn Leu Val Ser Ser
165 170 175

Lys Lys Ile Thr Glu Phe Asp Pro Ala Ile Val Ile Ser Pro Ser Gly
180 185 190

Lys Tyr Asn Ala Val Lys Leu Gly Lys Tyr Glu Asp Ser Asn Ser Val
195 200 205

Thr Cys Ser Val Gln His Asp Asn Lys Thr Val His Ser Thr Asp Phe
210 215 220

Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu
225 230 235 240

Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val
245 250 255

His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg
260 265 270

Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys
275 280 285

Leu Phe Phe Leu
290

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<400> 3

Ala Leu Trp Glu Ala Gln Gln Glu Leu Gly Lys Lys Ile Lys Val Phe
1 5 10 15

ES 2 659 217 T3

<210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

5 <400> 4
 Ala Cys Asp Thr Leu Gly Met Gly Gly Glu Tyr Thr Asp Lys Leu Ile
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 948
 <212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 5
 atggtgtccc tgctgcacgc cagcaccctg gccgtgctgg gcgccctgtg cgtgtatggc 60
 gccggacacc tggaacagcc ccagatcagc agcaccaaga ccctgagcaa gaccgccagg 120
 ctggaatgcy tgggtgtccgy catcaccatc agcggccacct ccgtgtactg gtacagagag 180
 agaccocggcy aggtcatcca gttcctggtg tccatcagct acgacggcac cgtgcggaaa 240
 gagagcggca tccccagcgy caagttcgag gtggacagaa tccccgagac cagcacctcc 300
 accctgacca tccacaacgt ggagaagcag gacatcgcca cctactactg cgcctgtgg 360
 gaggccagc aggaactggg caagaaaatc aaggtgttcg gccctggcac caagctgatc 420
 atcacgcgaca agcagctgga cgcggacgtg agccccaagc ctaccatctt cctgcccagc 480
 atcgccgaga ccaagctgca gaaggccggc acctacctgt gcctgctgga aaagttcttc 540
 cccgacgtga tcaagatcca ctgggaggaa aagaagagca acaccatcct gggcagccag 600
 gaaggcaata ccatgaaaac caacgacacc tacatgaagt tcagctggct gaccgtgccc 660
 gagaagagcc tggacaaaaga gcacagatgc atcgtccggc acgagaacaa caagaacggc 720
 gtggaccagc aaatcatctt ccccccatc aagaccgatg tgatcacaat ggacccaag 780
 gacaactgca gcaaggacgc caacgatacc ctgctgctgc agctgaccaa caccagcggc 840
 tactacatgt atctcctgct gctgctgaag agcgtggtgt acttcgcat catcaoctgc 900
 tgtctgctgc ggcggaccgc cttctgctgc aacggcgaga agagctga 948

15 <210> 6
 <211> 879
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 atggagcggg tcagcagcct gatccacctg agcctgttct gggccggagt gatgagcggc 60
 atcgagctgg tgcccagaca ccagaccgtg cccgtgagca tcggcgtgcc cgccaccctg 120

ES 2 659 217 T3

cgggtgcagca tgaagggcga ggccatcggc aactactaca tcaactggta cagaaagacc 180
 cagggaaca ccatgacctt catctaccgg gagaaggaca tctacggccc tggcttcaag 240
 gacaacttcc agggcgacat cgacatcgcc aagaacctgg cgtgctgaa gatcctggcc 300
 cccagcgaga gggacgaggg cagctactac tgcgcctgcg acaccctggg catgggcggc 360
 gagtacaccg acaagctgat cttcggaag ggcacccggg tgaccgtgga gcccagaagc 420
 cagccccaca ccaagcccag cgtgttcgtg atgaagaacg gcaccaacgt ggcctgcctg 480
 gtgaaagagt tctaccccaa ggacatccgg atcaacctgg tgtccagcaa gaagatcacc 540
 gagttoacc cgcctatcgt gatcagcccc agcggcaagt acaacgccgt gaagctgggc 600
 aagtacgagg acagcaacag cgtgacctgc agcgtgcagc acgacaaca gaccgtgcac 660
 agcaccgact tcgaggtgaa aaccgactcc accgaccacg tgaagcccaa agagaccgag 720
 aacaccaagc agcccagcaa gagctgccac aagcccaagg ccatcgtgca caccgagaag 780
 gtgaaatga tgagcctgac cgtgctgggc ctgaggatgc tgttcgcaa gacagtggcc 840
 gtgaaacttc tgctgaccgc caagctgttc ttcctgtga 879

<210> 7

<211> 943

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

atggtgtccc tgctgcacgc cagcaccttg gccgtgctgg ggcacctgtg cgtgtatggc 60
 gccggacacc tggaacagcc ccagatcagc agcaccaaga ccctgagcaa gaccgccagg 120
 ctggaatgcg tgggtgtccgg catcaccatc agcggccact ccgtgtactg gtacagagag 180
 agacccggcg aggtcatcca gttcctgggt tccatcagct acgacggcac cgtgcggaaa 240
 gagagcggca tccccagcgg caagttcgag gtggacagaa tccccgagac cagcacctcc 300
 accctgacca tccacaacgt ggagaagcag gacatcgcca cctactactg cgccctgtgg 360
 gaggaggaac tgggcaagaa aatcaaggtg ttcggccctg gcaccaagct gatcatcacc 420
 gacaagcagc tggacgccga cgtgagcccc aagcctacca tcttcctgcc cagcatcgcc 480
 gagaccaagc tgcagaaggc cggcacctac ctgtgcctgc tggaaaagtt cttccccgac 540
 gtgatcaaga tccactggga ggaaaagaag agcaaacacca tcctgggcag ccaggaaggc 600
 aataccatga aaaccaacga cacctacatg aagttcagct ggctgaccgt gcccgagaag 660
 agcctggaca aagagcacag atgcatcgtc cggcacgaga acaacaagaa cggcgtggac 720
 caggaaatca tcttcccccc catcaagacc gatgtgatca caatggacct caaggacaac 780
 tgcagcaagc acgccaacga taccctgctg ctgcagctga ccaacaccag cgcctactac 840
 atgtatctcc tgctgctgct gaagagcgtg gtgtacttcg ccatcatcac ctgctgtctg 900

 ctgcgccgga ccgccttctg ctgcaacggc gagaagagct gag 943

10 <210> 8

<211> 313

ES 2 659 217 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Val Ser Leu Leu His Ala Ser Thr Leu Ala Val Leu Gly Ala Leu
1 5 10 15

Cys Val Tyr Gly Ala Gly His Leu Glu Gln Pro Gln Ile Ser Ser Thr
20 25 30

Lys Thr Leu Ser Lys Thr Ala Arg Leu Glu Cys Val Val Ser Gly Ile
35 40 45

Thr Ile Ser Ala Thr Ser Val Tyr Trp Tyr Arg Glu Arg Pro Gly Glu
50 55 60

Val Ile Gln Phe Leu Val Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Val Arg Lys
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ile Pro Ser Gly Lys Phe Glu Val Asp Arg Ile Pro Glu
85 90 95

Thr Ser Thr Ser Thr Leu Thr Ile His Asn Val Glu Lys Gln Asp Ile
100 105 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Glu Glu Glu Leu Gly Lys Lys Ile
115 120 125

Lys Val Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Ile Ile Thr Asp Lys Gln Leu
130 135 140

Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro Ser Ile Ala
145 150 155 160

Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys Leu Leu Glu Lys
165 170 175

Phe Phe Pro Asp Val Ile Lys Ile His Trp Glu Glu Lys Lys Ser Asn
180 185 190

Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys Thr Asn Asp Thr
195 200 205

ES 2 659 217 T3

Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Lys Ser Leu Asp Lys
 210 215 220

Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys Asn Gly Val Asp
 225 230 235 240

Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr Met Asp
 245 250 255

Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu Leu Gln
 260 265 270

Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Lys
 275 280 285

Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr
 290 295 300

Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 305 310

<210> 9

<211> 867

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

```

atggagcggg tcagcagcct gatccacctg agcctgttct gggccggagt gatgagcgcc      60
atcgagctgg tgcccagca ccagaccgtg cccgtgagca tcggcgtgcc cgccaccctg      120
cgggtgcagca tgaagggcga ggccatcggc aactactaca tcaactggta cagaaagacc      180
cagggcaaca ccatgacctt catctaccgg gagaaggaca tctacggccc tggcttcaag      240
gacaacttcc agggcgacat cgacatcgcc aagaacctgg ccgtgctgaa gatcctggcc      300
cccagcgaga gggacgaggg cagctactac tgcgcctgcg acctgctggg ctacaccgac      360
aagctgatct tcggcaaggg cccccgggtg accgtggagc ccagaagcca gccccacacc      420
aagcccagcg tgttcgtgat gaagaacggc accaacgtgg cctgcctggt gaaagagttc      480
taccccaagg acatccggat caacctggtg tccagcaaga agatcaccga gttcgacccc      540
gccatogtga tcagcccag cggcaagtac aacgcctgga agctgggcaa gtacgaggac      600
agcaacagcg tgacctgcag cgtgcagcac gacaacaaga ccgtgcacag caccgacttc      660
gaggtgaaaa ccgactccac cgaccacgtg aagcccaaag agaccgagaa caccaagcag      720
cccagcaaga gctgccacaa gcccaaggcc atcgtgcaca ccgagaaggt gaacatgatg      780
agcctgaccg tgctgggcct gcgcatgctg ttcgccaaga cagtggccgt gaacttcctg      840
ctgaccgcca agctgttctt cctgtga                                           867
    
```

<210> 10

10 <211> 288

ES 2 659 217 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

Met Glu Arg Ile Ser Ser Leu Ile His Leu Ser Leu Phe Trp Ala Gly
 1                               5                               10 15

Val Met Ser Ala Ile Glu Leu Val Pro Glu His Gln Thr Val Pro Val
 20                               25                               30

Ser Ile Gly Val Pro Ala Thr Leu Arg Cys Ser Met Lys Gly Glu Ala
 35                               40                               45

Ile Gly Asn Tyr Tyr Ile Asn Trp Tyr Arg Lys Thr Gln Gly Asn Thr
 50                               55                               60

Met Thr Phe Ile Tyr Arg Glu Lys Asp Ile Tyr Gly Pro Gly Phe Lys
 65                               70                               75 80

Asp Asn Phe Gln Gly Asp Ile Asp Ile Ala Lys Asn Leu Ala Val Leu
 85                               90                               95

Lys Ile Leu Ala Pro Ser Glu Arg Asp Glu Gly Ser Tyr Tyr Cys Ala
 100                              105                              110

Cys Asp Leu Leu Gly Tyr Thr Asp Lys Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr
 115                              120                              125

Arg Val Thr Val Glu Pro Arg Ser Gln Pro His Thr Lys Pro Ser Val
 130                              135                              140

Phe Val Met Lys Asn Gly Thr Asn Val Ala Cys Leu Val Lys Glu Phe
 145                              150                              155 160

Tyr Pro Lys Asp Ile Arg Ile Asn Leu Val Ser Ser Lys Lys Ile Thr
 165                              170                              175

Glu Phe Asp Pro Ala Ile Val Ile Ser Pro Ser Gly Lys Tyr Asn Ala
 180                              185                              190

Val Lys Leu Gly Lys Tyr Glu Asp Ser Asn Ser Val Thr Cys Ser Val
 195                              200                              205

Gln His Asp Asn Lys Thr Val His Ser Thr Asp Phe Glu Val Lys Thr
 210                              215                              220

```

ES 2 659 217 T3

Asp Ser Thr Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln
 225 230 235 240

Pro Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys
 245 250 255

Val Asn Met Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala
 260 265 270

Lys Thr Val Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu
 275 280 285

<210> 11

<211> 946

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

```

atggtgtccc tgctgcacgc cagcaccctg gccgtgctgg gcgccctgtg cgtgtatggc      60
gccggacacc tggaacagcc ccagatcagc agcaccaaga ccctgagcaa gaccgccagg      120
ctggaatgcg tgggtgtccg catcaccatc agcggcacct ccgtgtactg gtacagagag      180
agaccggcg aggatcatca gttcctgggt tccatcagct acgacggcac cgtgcggaaa      240
gagagcggca tccccagcgg caagttcgag gtggacagaa tccccgagac cagcacctcc      300
accctgacca tccacaacgt ggagaagcag gacatogcca cctactactg cggcctgtgg      360
gagatccagg aactgggcaa gaaaatcaag gtgttcggcc ctggcaccaa gctgatcatc      420
accgacaagc agctggagcg cgacgtgagc cccaagccta ccatcttctt gcccgatc      480
gccgagacca agctgcagaa ggcgggcacc tacctgtgcc tgetggaaaa gttcttcccc      540
gacgtgatca agatccactg ggaggaaaag aagagcaaca ccatcctggg cagccaggaa      600
ggcaatacca tgaaaaccaa cgacacctac atgaagttca gctggctgac cgtgcccag      660
aagagcctgg acaaagagca cagatgcatc gtccggcacg agaacaacaa gaacggcgtg      720
gaccaggaaa tcatttctcc ccccatcaag accgatgtga tcacaatgga cccaaggac      780
aactgcagca aggacgcaa cgataccctg ctgctgcagc tgaccaaacac cagcgcctac      840
tacatgtatc tctgtgtgct gctgaagagc gtggtgtact tcgccatcat cacctgctgt      900
ctgctgcggc ggaccgcctt ctgctgcaac ggcgagaaga gctgag      946
    
```

<210> 12

<211> 314

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 659 217 T3

Met Val Ser Leu Leu His Ala Ser Thr Leu Ala Val Leu Gly Ala Leu
1 5 10 15

Cys Val Tyr Gly Ala Gly His Leu Glu Gln Pro Gln Ile Ser Ser Thr
20 25 30

Lys Thr Leu Ser Lys Thr Ala Arg Leu Glu Cys Val Val Ser Gly Ile
35 40 45

Thr Ile Ser Ala Thr Ser Val Tyr Trp Tyr Arg Glu Arg Pro Gly Glu
50 55 60

Val Ile Gln Phe Leu Val Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Val Arg Lys
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ile Pro Ser Gly Lys Phe Glu Val Asp Arg Ile Pro Glu
85 90 95

Thr Ser Thr Ser Thr Leu Thr Ile His Asn Val Glu Lys Gln Asp Ile
100 105 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Glu Ile Gln Glu Leu Gly Lys Lys
115 120 125

Ile Lys Val Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Ile Ile Thr Asp Lys Gln
130 135 140

Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro Ser Ile
145 150 155 160

Ala Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys Leu Leu Glu
165 170 175

Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Lys Ile His Trp Glu Glu Lys Lys Ser
180 185 190

Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys Thr Asn Asp
195 200 205

Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Lys Ser Leu Asp
210 215 220

Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys Asn Gly Val
225 230 235 240

Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr Met
245 250 255

ES 2 659 217 T3

Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu Leu
 260 265 270

Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Leu
 275 280 285

Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg
 290 295 300

Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 305 310

<210> 13

<211> 873

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

```

atggagcggg tcagcagcct gatccacctg agcctgttct gggccggagt gatgagcgc      60
atcgagctgg tgcccagaca ccagaccgtg cccgtgagca tcggcgtgcc cgccaccctg      120
cggtgagcga tgaagggcga ggccatcggc aactactaca tcaactggta cagaaagacc      180
cagggcaaca ccatgacctt catctaccgg gagaaggaca tctacggccc tggcttcaag      240
gacaacttcc agggcgacat cgacatcgcc aagaacctgg ccgtgctgaa gatcctggcc      300
cccagcgaga gggacgaggg cagctactac tgcgcctgog acgccctgaa gagaaccgac      360
accgacaagc tgatcttcgg caagggcacc cgggtgaccg tggagcccag aagccagccc      420
cacaccaagc ccagcgtggt cgtgatgaag aacggcacca acgtggcctg cctggtgaaa      480
gagttctacc ccaaggacat ccgatcaac ctggtgtcca gcaagaagat caccgagttc      540
gaccccgcca tcgtgatcag cccagcggc aagtacaacg ccgtgaaact gggcaagtac      600
gaggacagca acagcgtgac ctgcagcgtg cagcacgaca acaagaccgt gcacagcacc      660
gacttcgagg tgaaaaccga ctccaaccgac cacgtgaagc ccaaagagac cgagaacacc      720
aagcagccca gcaagagctg ccacaagccc aaggccatcg tgcacaccga gaaggtgaac      780
atgatgagcc tgaccgtgct gggcctgctg atgctgttcg ccaagacagt ggccgtgaac      840
ttcctgctga ccgccaagct gttcttctctg tga                                     873
    
```

<210> 14

<211> 290

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Glu Arg Ile Ser Ser Leu Ile His Leu Ser Leu Phe Trp Ala Gly

ES 2 659 217 T3

Glu Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Met Leu
260 265 270

Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe
275 280 285

Phe Leu
290

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<400> 15

Ala Leu Lys Arg Thr Asp
1 5

<210> 16

<211> 14

10 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 16

Ala Leu Trp Glu Ile Gln Glu Leu Gly Lys Lys Ile Lys Val
1 5 10

<210> 17

15 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 17

Ala Cys Asp Ala Leu Lys Arg Thr Asp Thr Asp Lys Leu Ile
1 5 10

20 <210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 18

25 Ala Cys Asp Leu Leu Gly Tyr Thr Asp Lys Leu Ile
1 5 10

<210> 19

<211> 8

ES 2 659 217 T3

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 19

Thr Leu Gly Met Gly Gly Glu Tyr
1 5

5

REIVINDICACIONES

1. Receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o un fragmento del mismo donde dicho receptor o fragmento del mismo es capaz de enlazar con una célula tumoral y donde dicho receptor comprende una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ que comprende una región CDR3 $\gamma 9$, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 122-124 de SEQ ID NO.1 se modifica y una cadena receptora de célula T $\delta 2$ que comprende una región CDR3 $\delta 2$ donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de SEQ ID NO.2 es modificada, donde las combinaciones de las modificaciones de aminoácido en el receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o un fragmento del mismo son enumerados como en la tabla 1.
2. Receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o un fragmento del mismo, donde dicho receptor o fragmento del mismo es capaz de enlazar con una célula tumoral y donde dicho receptor comprende: una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ que comprende una región CDR3 $\gamma 9$, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 122-124 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.1 es AQQ y una cadena receptora de célula T $\delta 2$ que comprende una región CDR3 $\delta 2$ donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2 es ALKRTD.
3. Receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o fragmento del mismo, donde dicho receptor o fragmento del mismo es capaz de enlazar con una célula tumoral y donde dicho receptor comprende: una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ que comprende una región CDR3 $\gamma 9$, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 122-124 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1 es IQ, y una cadena receptora de célula T $\delta 2$ que comprende una región CDR3 $\delta 2$ donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2 es ALKRTD.
4. Receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o fragmento del mismo, donde dicho receptor o fragmento del mismo es capaz de enlazar con una célula tumoral y donde dicho receptor comprende: una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ que comprende una región CDR3 $\gamma 9$, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 122-124 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1 es IQ y una cadena receptora de célula T $\delta 2$ que comprende una región CDR3 $\delta 2$ donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2 es TLGMGGEY.
5. Receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o fragmento del mismo, donde dicho receptor o fragmento del mismo es capaz de enlazar con una célula tumoral y donde dicho receptor comprende: una cadena receptora de célula T $\gamma 9$ que comprende una región CDR3 $\gamma 9$, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 122-124 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1 es AQQ y una cadena receptora de célula T $\delta 2$ que comprende una región CDR3 $\delta 2$ donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2 es LLGY.
6. Receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 118-121 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1 es ALWE y donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 125-132 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1 es ELGKKIKV, y donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde con residuos de aminoácidos 112-114 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2. es ACD, y donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde con residuos de aminoácidos 123-127 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2 es TDKLI.
7. Receptor de célula T $\gamma\delta 2$ o fragmento del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1 y donde la cadena receptora de célula T $\delta 2$ comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con un número de residuos de aminoácidos 122-124 de SEQ ID NO:1 y la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de SEQ ID NO:2 son de acuerdo con la tabla 1 y/o la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 1-121 y 125-315 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1 y donde los residuos de aminoácidos modificados 122-124 son tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y donde la cadena receptora de célula T $\delta 2$ comprende una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos 1-114 y 123-293 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2 y donde los residuos de aminoácidos modificados 115-122 son tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

- 5 8. Secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica la cadena receptora de célula T $\delta 2$ o fragmento de la misma, tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la región CDR3 $\delta 2$ que corresponde con residuos de aminoácidos 115-122 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2 se sustituye con residuos de aminoácidos ALKRTD o LLGY y/o la cadena receptora de célula T $\gamma 9$ o fragmento de la misma, tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 $\gamma 9$ que corresponde con residuos de aminoácidos 122- 124 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1 se sustituye por residuos de aminoácidos IQ, donde preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos aislada está comprendida en una construcción genética y/o comprendida en un vector retroviral.
- 10 9. Secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica el receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ o fragmento del mismo, tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde preferiblemente la secuencia de ácidos nucleicos aislada está comprendida en una construcción genética y/o comprendida en un vector retroviral.
- 15 10. Célula T que comprende el receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o una célula T que comprende la secuencia de ácidos nucleicos aislada, la construcción genética o el vector retroviral tal y como se define en la reivindicación 9.
- 20 11. Receptor de célula T $\gamma 9\delta 2$ o fragmento del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para uso como un medicamento, donde preferiblemente el medicamento es para usar en el tratamiento contra el cáncer.
12. Secuencia de ácidos nucleicos aislada según la reivindicación 9, para uso como un medicamento, donde preferiblemente el medicamento es para usar en el tratamiento contra el cáncer.
- 25 13. Célula T según la reivindicación 10 para uso como un medicamento, donde preferiblemente el medicamento es para usar en el tratamiento contra el cáncer.

Figura 1

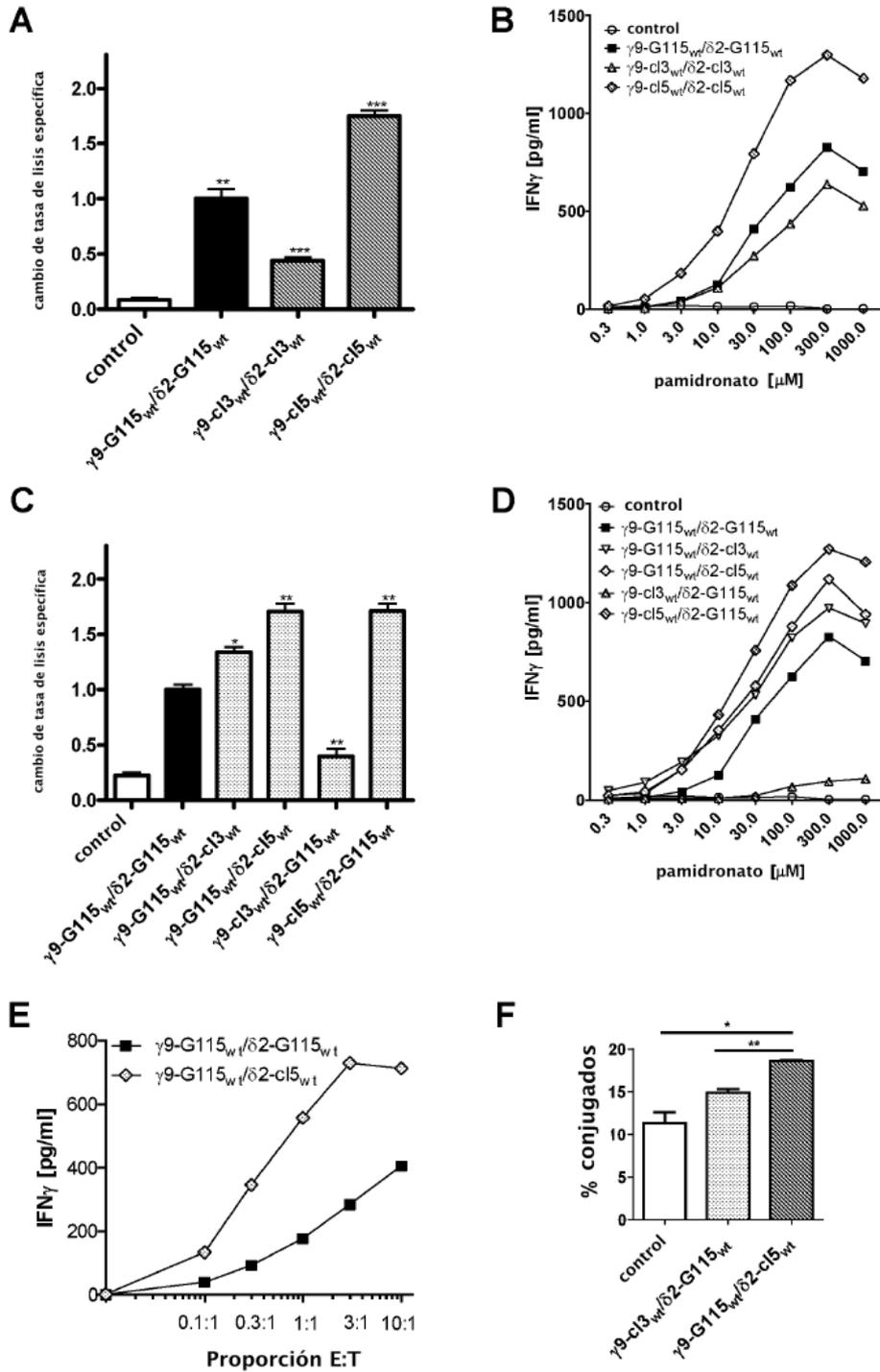


Figura 2:

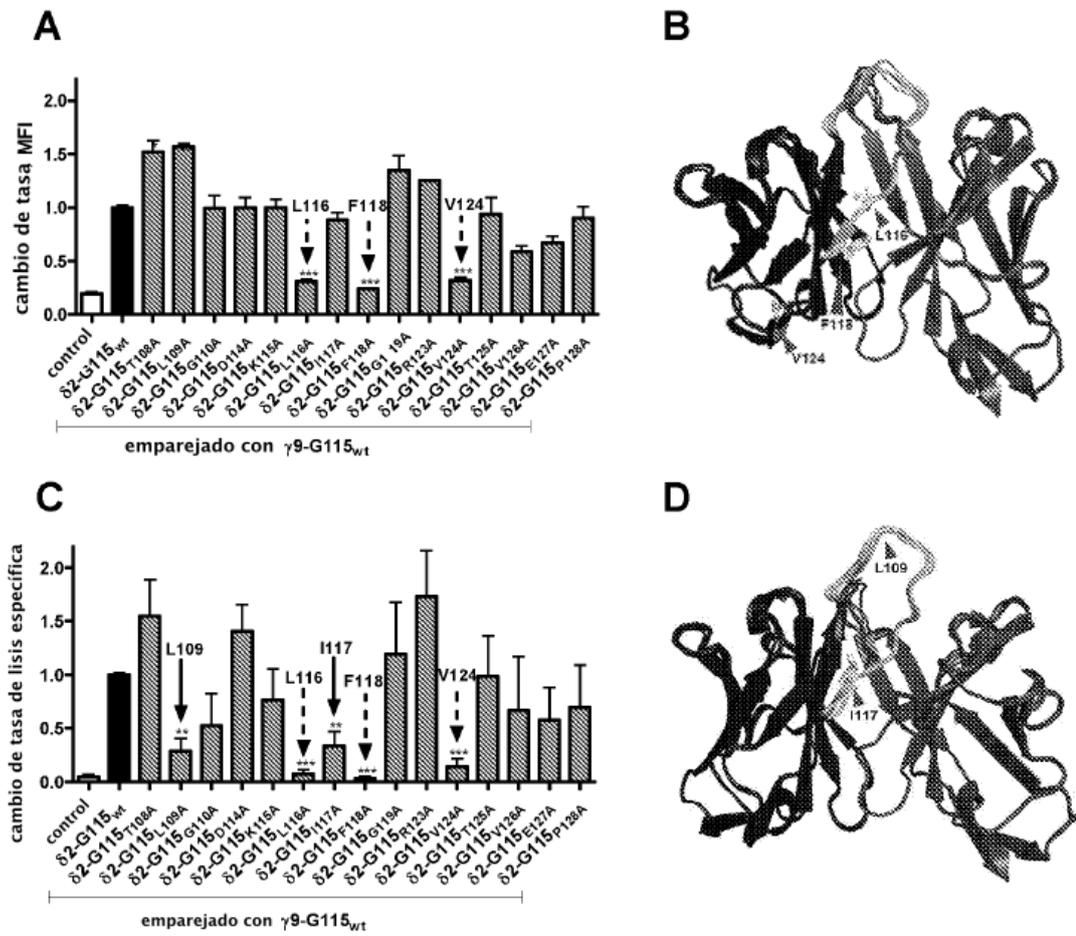


Figura 3:

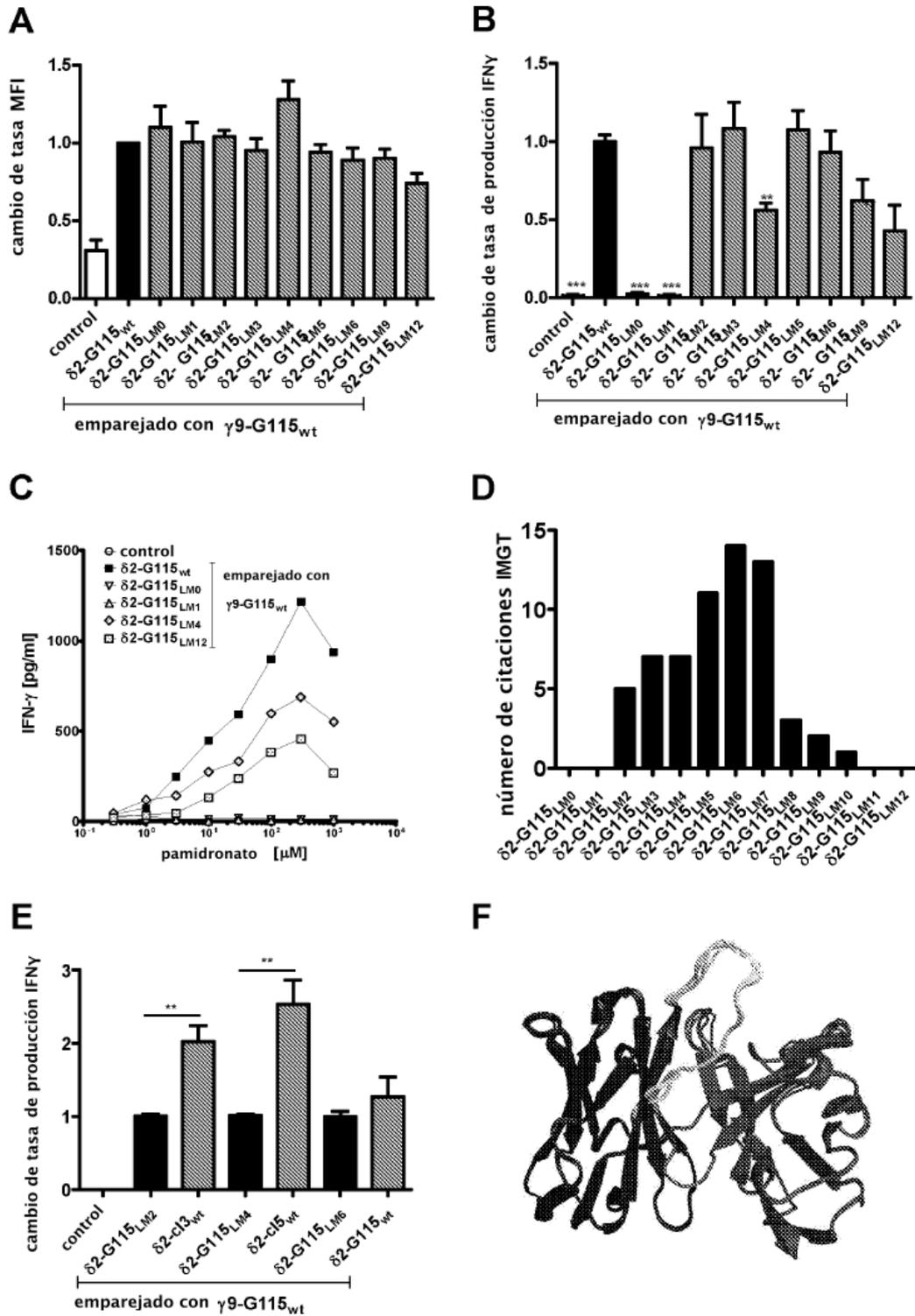


Figura 4:

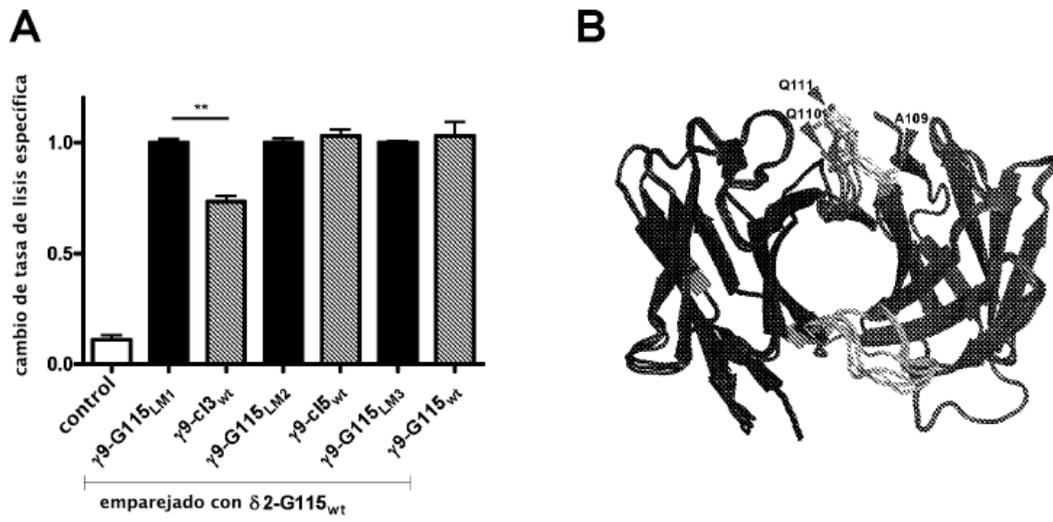


Figura 5:

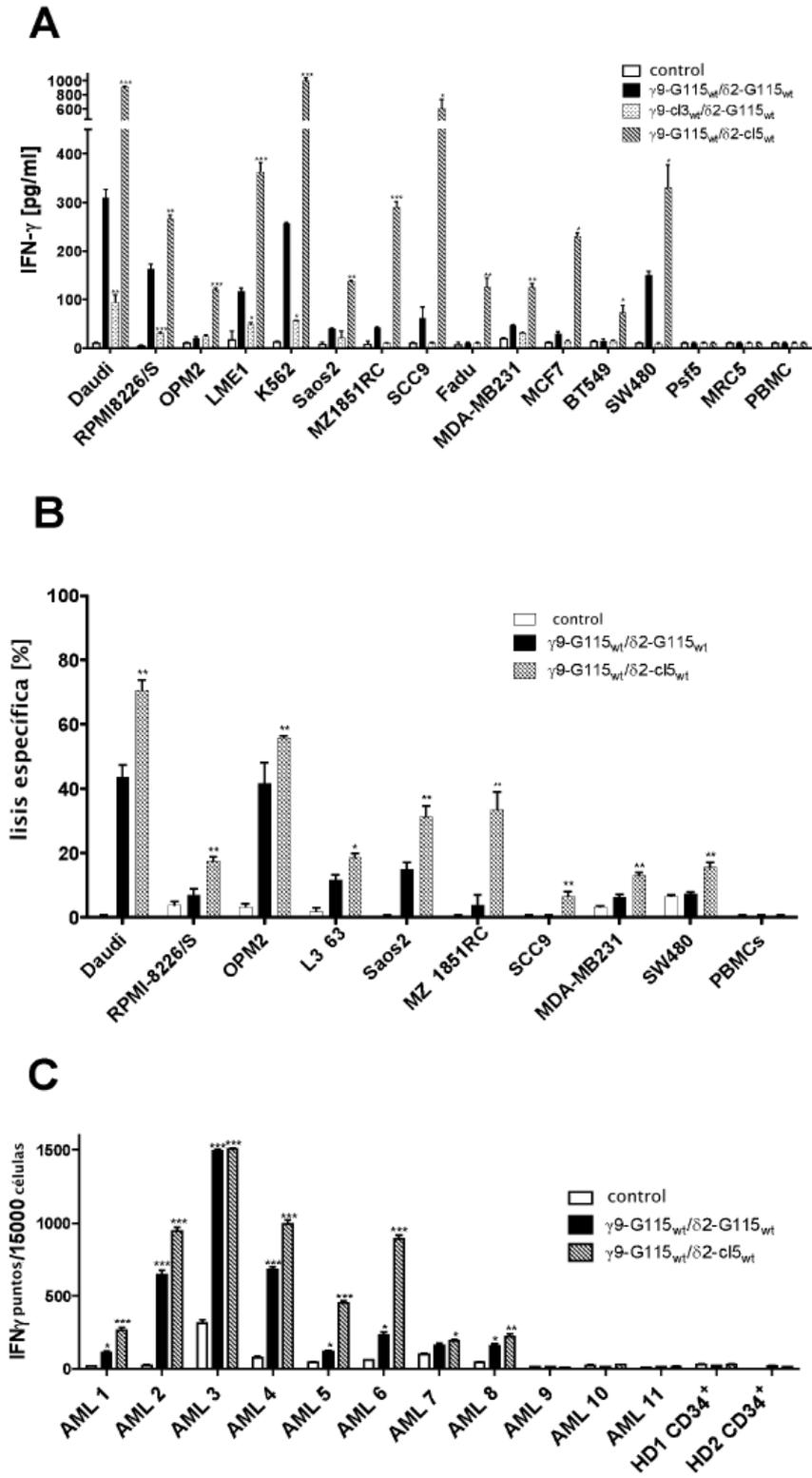


Figura 6

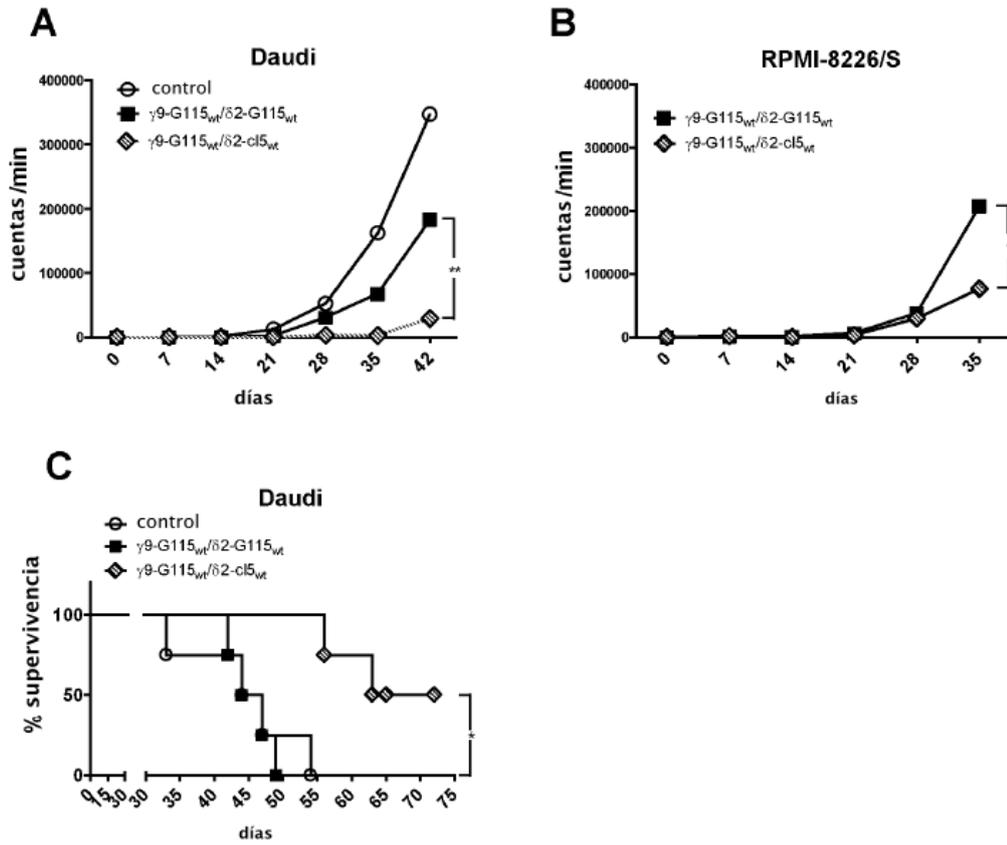


Figura 7:

