

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 034 332**

21 Número de solicitud: 202530419

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0783** (2010.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**21.05.2025**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**14.08.2025**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**12.11.2025**

Fecha de concesión:

**30.04.2026**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**08.05.2026**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(100,00%)**

**Avenida de Séneca, 2  
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**MUÑOZ RUIZ, Miguel y  
ZARCO CUADRILLERO, Ángela**

54 Título: **Método de expansión selectiva in vitro y adquisición de fenotipo residente en tejido de células T γδ Vδ1+ derivadas de sangre periférica**

57 Resumen:

Método de expansión selectiva *in vitro* y adquisición de fenotipo residente en tejido de células T γδ Vδ1+ derivadas de sangre periférica.

La invención se refiere a un método para expandir *in vitro*, selectivamente, células T γδ Vδ1+ procedentes de una muestra de sangre periférica y dotarlas de un fenotipo residente en tejidos. La invención también se refiere a composiciones celulares obtenidas mediante este método y a su uso en el tratamiento de cánceres sólidos. El método incluye: a) aislar células T γδ totales de una muestra de sangre; b) cultivarlas en un cóctel que contiene: IL-2, IL-15 y TGFβ3; c) retirarlas del cóctel del paso b) y cultivarlas con: IL-2, IL-15 y anticuerpos anti-CD3.

La invención también incluye un kit que consiste en dos medios de cultivo base y un anticuerpo anti-CD3, complementándose los medios de cultivo, uno, con IL-2, IL-15 y TGFβ3, el otro, con IL-2 e IL-15.

ES 3 034 332 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

**Método de expansión selectiva *in vitro* y adquisición de fenotipo residente en tejido de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> derivadas de sangre periférica**

5

**SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se encuadra en los sectores de la Biomedicina y la Biología Celular, más concretamente, en el sector de la Inmunoterapia, centrándose en la expansión y diferenciación de células T. En concreto, se refiere a la expansión y diferenciación de células T derivadas de sangre y a la obtención de células T  $\gamma\delta$  TCRV $\delta$ 1<sup>+</sup> (V $\delta$ 1<sup>+</sup>) con capacidad para residir en tejidos sólidos, incluyendo los tejidos tumorales.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

Los linfocitos T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> representan una subpoblación con elevado interés terapéutico debido a su capacidad citotóxica, independencia del reconocimiento antigénico restringido por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), y su potencial para residir y actuar en tejidos. Sin embargo, su baja frecuencia en sangre y la dificultad para inducir un fenotipo funcionalmente competente han limitado su aplicación clínica.

20

Las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> pertenecen al subtipo gamma delta ( $\gamma\delta$ ) de las células o linfocitos T, que se considera una subpoblación no convencional de las células T, ya que representan del 1 al 5% de los linfocitos T circulantes en sangre periférica en adultos sanos. Estas células T  $\gamma\delta$  se caracterizan por la expresión de un único tipo de Receptor de Células T (TCR) compuesto por cadenas gamma y delta (TCR $\gamma$  y TCR $\delta$ ), lo que las distingue de las células T convencionales alfa beta ( $\alpha\beta$ ) que tienen cadenas alfa y beta (TCR $\alpha$  y TCR $\beta$ ) en sus TCR y que se dividen en los subtipos CD4 y CD8.

25

Las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> están enriquecidas en varios tejidos, como la piel, el intestino y el sistema nervioso; sin embargo, las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> son un subconjunto menor en la sangre periférica, donde las células T  $\gamma\delta$  TCRV $\delta$ 2<sup>+</sup> (V $\delta$ 2<sup>+</sup>) son la mayoría de las células T  $\gamma\delta$ .

30

Las células T  $\gamma\delta$  presentan una propiedad característica de reconocimiento directo del

antígeno e independiente de presentación por MHC, con una potente actividad tumoricida. Estas células se activan mediante varios ligandos, incluyendo autoantígenos inducidos por estrés, glicolípidos y, potencialmente, mediante otros factores no identificados a través del TCR. Además, estas células pueden activarse a través de vías innatas como los receptores citotóxicos naturales (RCN). A diferencia de otras células T  $\gamma\delta$ , las células T  $\gamma\delta$   $V\delta 1^+$  reactivas a tumores muestran una susceptibilidad reducida a la muerte celular inducida por activación y pueden persistir en la circulación durante periodos prolongados, proporcionando potencialmente una inmunidad duradera contra ciertos tipos de cáncer. En particular, un análisis transcriptómico exhaustivo reveló una sólida correlación entre un perfil de células T  $\gamma\delta$  y la supervivencia global en 18.000 pacientes con cáncer y 25 tipos de tumores.

En el contexto de la inmunoterapia contra el cáncer, la aplicación de terapia celular adoptiva con poblaciones de linfocitos T  $\gamma\delta$   $V\delta 1^+$  infiltrantes de tumor (TILs), expandidas *in vitro*, presenta importantes desafíos. En los protocolos actuales, las células T se aíslan indiscriminadamente del tejido o del estroma tumoral y del epitelio tumoral, donde residen normalmente las células T  $\gamma\delta$   $V\delta 1^+$ . Sin embargo, las poblaciones de células T  $\gamma\delta$  de estas localizaciones no se expanden bien *in vitro* en condiciones de cultivo estándar. Es importante señalar aquí que, dadas las dificultades en el aislamiento y la expansión de las células T  $\gamma\delta$ , hasta la fecha, solo una empresa se ha centrado en terapias celulares adaptativas en la expansión de células T  $\gamma\delta$   $V\delta 1^+$  específicas de tejido, se trata de la empresa "GammaDeltaTherapeutics", actualmente adquirida por Takeda. En este contexto, también han generado células T Delta One (DOT), un producto celular recientemente descrito basado en células T  $\gamma\delta$   $V\delta 1^+$  procedentes de la sangre, una plataforma alogénica para la inmunoterapia del cáncer.

Esta empresa desarrolló un protocolo en dos pasos para la expansión selectiva (hasta 2000 veces, en grandes bolsas de cultivo celular de grado clínico) y la diferenciación de células T  $\gamma\delta$   $V\delta 1^+$  citotóxicas (denominadas células Delta One o DOT). Estas células expresan los receptores citotóxicos naturales NKG2D y NKp44, que actúan sinérgicamente con el receptor de células T para dirigir las células leucémicas *in vitro*. Cuando se transfirieron *in vivo*, las células DOT se infiltraron en tumores y órganos periféricos, y persistieron hasta el final del análisis sin mostrar signos de pérdida de función; de hecho, las células DOT proliferaron y produjeron abundantes  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$ , sin producción activa de IL-17 que podría reclutar neutrófilos y otras células mieloides

al tumor, contribuyendo a un microambiente pro-tumoral. Las células DOT fueron capaces de inhibir el crecimiento tumoral y prevenir la diseminación en modelos de xenoinjerto de LLC (leucemia linfocítica crónica). En el artículo publicado por Almeida, AR. y colaboradores en 2016 (doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0597) se describe el procedimiento de expansión y diferenciación selectiva de células DOT.

Sin embargo, uno de los problemas a los que se enfrenta la inmunoterapia es que se desconoce cómo optimizar el acceso de las células T a los tumores sólidos y su actividad sostenida en el tumor. Las DOT han demostrado ser muy prometedoras terapéuticamente en el cáncer, pero lo son menos en tumores sólidos que en hematológicos donde hay que aplicar un número elevado de células en diferentes dosis ya que su persistencia en el tumor es limitada. Esto se explica porque las células T sistémicas muestran una escasa capacidad de penetración y residencia tumoral y una eficacia funcional variable en los tumores.

Por otro lado, en el documento WO2020021045A2 se difunde la obtención de una composición que comprende una población de células enriquecida en células NK y células  $\gamma\delta$  que se obtienen mediante la exposición de una población empobrecida en células T  $\alpha\beta$  a condiciones de activación mediante el contacto con polipéptidos exógenos, entre los que cita IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 o combinaciones de estas y, opcionalmente, un polipéptido que se une inmuno-específicamente a un receptor de una célula T  $\gamma\delta$  y que puede ser un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a CD3. También incluye la posibilidad de obtener células T  $\gamma\delta$  y células NK modificadas genéticamente para expresar receptores de antígenos quiméricos (CAR) o TCR exógenos, que pueden utilizarse para dirigirse a cualquier molécula de la superficie celular directa o indirectamente, por ejemplo, un marcador en una célula cancerosa o una célula infectada.

WO2012156958A2 hace referencia a una nueva línea de linfocitos que comprende células T de sangre periférica que expresan receptores de citotoxicidad funcionales, útiles para el tratamiento de distintos tipos de cáncer: leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma de próstata, carcinoma de colon, carcinoma de vejiga, carcinoma de células renales y melanoma cutáneo. El documento explica que, cuando

las células se expanden *ex vivo* antes de su administración como inmunoterapia, a veces no producen una cantidad suficiente de citoquinas por sí mismas, por lo que estas pueden administrarse a las células y cito TNF, IFN $\gamma$ , interleuquinas (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, IL-21 y mezclas de estas) CCL4/RANTES y TGF. Las células T se expanden con agonistas de  $\gamma$ 5TCR, entre los que cita la fitohemaglutinina-PHA, los anticuerpos monoclonales anti-CD3, los anticuerpos monoclonales anti- $\gamma$ 5TCR o mezclas de los mismos.

En US2023117388A1, se describe la producción de una población celular, destinada al tratamiento de cáncer, infecciones o alteraciones autoinmunes, que implica la expansión de una población celular con interleuquinas, para obtener una segunda población 10 veces mayor. En la realización 24, se indica la obtención de una población enriquecida en células  $\gamma$  $\delta$ +, sin embargo, el rendimiento que se obtiene es bastante bajo (>30%).

WO2015189357A1 se refiere a la expansión de linfocitos con una composición de citoquinas para inmunoterapia celular activa. Tiene una primera etapa de expansión con una incubación en medio de cultivo que incluye IL-2, IL-15 e IL-21, hasta que los linfocitos se vuelven detectables, y una segunda etapa de expansión con una incubación en medio de cultivo que puede contener un anticuerpo anti-CD3 además de IL-2, IL-15 e IL-21.

El artículo de Ribot, JC. y colaboradores, de 2014 (<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303119>), analiza timos pediátricos humanos en un intento de aclarar dónde y cómo las células T  $\gamma$  $\delta$  humanas adquieren la citotoxicidad y la producción de IFN- $\gamma$  como propiedades efectoras clave. Describe que los timocitos  $\gamma$  $\delta$  aislados *ex vivo* producen un IFN- $\gamma$  insignificante y carecen de actividad citolítica contra las células leucémicas, pero adquieren estas propiedades tras la estimulación con IL-2 o IL-15 y la activación del TCR es prescindible para estas etapas de diferenciación funcional. Los autores comprueban, además, que la IL-2 es suficiente por sí sola y que el TGF $\beta$  anula el proceso, así como la adición de anticuerpos anti-CD3 reduce la diferenciación mediada por IL-2.

Es urgente mejorar tanto la capacidad de residencia tisular como el número de células T  $\gamma$  $\delta$  V $\delta$ 1+ derivadas de sangre periférica. Diversos estudios han demostrado una clara

asociación entre una mayor infiltración tumoral por células T y un mejor pronóstico a largo plazo en múltiples tipos de cáncer. Sin embargo, las estrategias publicadas hasta el momento no han conseguido inducir de forma eficiente ni una expansión robusta ni una adquisición estable del fenotipo residente en estas células.

5

### **EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

Método de expansión selectiva *in vitro* y adquisición de fenotipo residente en tejido de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> derivadas de sangre periférica.

10 La mayoría de los métodos actualmente conocidos para expandir células T  $\gamma\delta$  con fenotipo de residencia tisular se basan en la obtención de células a partir de tejidos sólidos, particularmente tejido epitelial. Aunque estos métodos permiten aislar células T  $\gamma\delta$ , el producto celular resultante suele estar mezclado con otros tipos celulares, lo que dificulta su uso clínico. Por otro lado, la sangre periférica no ha sido considerada  
15 una fuente ideal para este propósito debido a la baja frecuencia de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> ( $\approx$ 0,5%), lo que ha limitado su aprovechamiento para protocolos de diferenciación y expansión eficaces. Mediante la presente invención, a partir de flujo sanguíneo periférico humano, se obtiene un producto celular enriquecido en linfocitos T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> humanos que expresan RCN funcionales.

20

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método optimizado para la expansión *ex vivo* de un producto celular enriquecido en linfocitos T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> humanos a partir de sangre periférica.

25 En la presente invención, se diferencian y expanden *in vitro* linfocitos T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> humanos enriquecidos y positivos para RCN (RCN<sup>+</sup>), a partir de linfocitos T  $\gamma\delta$  totales obtenidos del flujo sanguíneo periférico. La expansión se realiza mediante estimulación regular con citocinas de la familia  $\gamma$ c. De forma sorprendente, el producto celular resultante expresa un conjunto de marcadores de residencia asociados a una mayor  
30 capacidad de infiltración y persistencia en tejidos y microambientes tumorales, superando tanto a los linfocitos T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> recién aislados como a los obtenidos por otros métodos de cultivo.

El método descrito permite obtener un producto final diferenciado que conserva un  
35 perfil de RCN similar al de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> naturales, pero con una firma de

residencia tisular (*Tissue-Resident Signature*, TRS) exclusiva, que no se observa ni en las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> aisladas de sangre ni en las células DOT. Dicha firma incluye una regulación al alza de marcadores clave como CD103, CD101, CD49a, CLA y CXCR4. La capacidad de residencia tisular, y en particular en tejidos tumorales, es crítica para mantener una actividad inmunológica prolongada y efectiva dentro del tumor.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para la expansión y diferenciación *in vitro* de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> humanas derivadas de sangre periférica, caracterizadas por adquirir capacidad de residencia en tejidos sólidos, incluidos tejidos tumorales. Dicho método comprende las siguientes etapas:

- a) aislar células T  $\gamma\delta$  totales de una muestra de sangre periférica;
- b) cultivar las células del paso a) durante 7/9 días en un medio de cultivo base con un cóctel que contiene:

IL-2,  
IL-15,  
TGF $\beta$ ;

c) retirar las células del medio de cultivo del paso b) y cultivarlas en un medio de cultivo que contiene:

IL-2,  
IL-15,  
anticuerpos anti-CD3,

este cultivo se mantiene durante 12/14 días hasta completar un cultivo de 20-22 días con un cambio de medio de cultivo cada 3/4 días.

En el paso b) se produce la expansión selectiva de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> con TRS característico debido a una actividad sinérgica de IL-15 y TGF $\beta$ . Por otro lado, la presencia de IL-2 condiciona que se mantenga el perfil de residencia en el paso c).

El cóctel del paso b) incluye entre 0,25 y 250 ng/mL de TGF $\beta$ . Preferentemente incluye entre 2,5 y 250 ng/mL de TGF $\beta$ , IL-2 (100 U/mL) e IL-15 (20 ng/mL) en medio de cultivo base suplementado con suero fetal bovino y con los antibióticos adecuados. La concentración preferida de TGF $\beta$  es de 25 ng/mL.

En el paso c), se puede utilizar un intervalo de concentraciones de anticuerpo anti-CD3

de entre 0,1 y 10  $\mu\text{g/mL}$ . Preferentemente el medio incluye IL-2 (100 U/mL), IL-15 (20 ng/mL) y entre 0,1 y 10  $\mu\text{g/mL}$  de anticuerpo anti-CD3 en medio de cultivo base suplementado con suero fetal bovino y con los antibióticos adecuados. La concentración más preferida de anticuerpo anti-CD3 es de 1  $\mu\text{g/mL}$ .

5

Mediante el método descrito en la presente invención, se mejora significativamente la capacidad de residencia tisular de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> derivadas de sangre periférica. Estas células presentan una elevada actividad antitumoral y diversos estudios han demostrado que una mayor infiltración tumoral por linfocitos T con fenotipo residente

10 en tejido se correlaciona con un mejor pronóstico clínico a largo plazo.

CD103 (también conocida como ITGAE) representa la subunidad  $\alpha$ E de la integrina  $\alpha$ E $\beta$ 7. Esta integrina se une a la E-cadherina, una molécula de adhesión típicamente expresada en epitelios y microambientes tumorales, y se utiliza como un marcador

15 clave del fenotipo de células T de memoria residentes en tejidos en humanos y ratón. Por lo tanto, CD103 constituye el marcador canónico del fenotipo residente. Junto con CD103, las células obtenidas mediante este método expresan un perfil de marcadores de residencia característico, incluyendo valores elevados de CD101, CD49a, CLA y CXCR4. Este conjunto de moléculas define una firma transcriptómica y fenotípica

20 asociada con las células T residentes en tejido, tanto en subpoblaciones CD8<sup>+</sup> como en células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>, y refleja su capacidad mejorada para persistir en tejidos sólidos, incluidos los tumores.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a las composiciones celulares

25 obtenidas mediante este procedimiento, que se caracterizan por el perfil de marcadores de residencia en tejidos indicado en el párrafo anterior y que expresan RCN funcionales. En dichas composiciones celulares, al menos el 60% de las células son células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> y, preferentemente, al menos el 90% son células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>. Además, las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> de estas composiciones celulares conservan el perfil

30 de marcadores de residencia característico, incluyendo CD101, CD49a, CLA y CXCR4, que conforma su firma de residencia tisular (TRS).

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit de cultivo celular para la expansión *in vitro* de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> procedentes de sangre periférica que consiste en:

35 - un primer medio de cultivo basal con IL-2, IL-15 y TGF $\beta$ ;

- un segundo medio de cultivo basal con IL-2, IL-15,
- un anticuerpo anti-CD3,
- aditivos y/o antibióticos adecuados.

5 En el primer medio de cultivo basal las concentraciones preferidas son:

- 100 U/mL IL-2,
  - 20 ng/mL IL-15,
  - entre 2,5 y 250 ng/mL TGF- $\beta$ , preferentemente 25 ng/mL,
- y en el segundo medio de cultivo basal son:

- 10 - 100 U/mL IL-2,  
- 20 ng/mL IL-15,

y se incluyen entre 0,1  $\mu$ g/mL y 10  $\mu$ g/mL anticuerpo anti-CD3, preferentemente 1  $\mu$ g/mL

- 15 La invención aquí descrita proporciona condiciones de cultivo específicas que permiten no solo una expansión eficiente de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> desde sangre periférica, sino también la inducción de un fenotipo asociado a residencia tisular, favoreciendo su persistencia y actividad en microambientes tumorales. Este avance ofrece una herramienta clave para el desarrollo de inmunoterapias celulares dirigidas contra
- 20 tumores sólidos y otras enfermedades donde se requiere inmunidad localizada y duradera. Por lo tanto, la invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una composición celular con, al menos, un 60 % de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> o, preferentemente, al menos un 90 % de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Estas células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>, además, se caracterizan por
- 25 presentar el perfil de marcadores de residencia característico, incluyendo CD101, CD49a, CLA y CXCR4, que conforma su firma de residencia tisular (TRS)

- La invención también se refiere a las composiciones celulares descritas en el párrafo anterior para su uso como medicamento y, más concretamente, para su uso en el
- 30 tratamiento de cánceres sólidos.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

- Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte
- 35 integrante de dicha descripción un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo

y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

**Figura 1.** Células T  $\gamma\delta$  a partir de sangre periférica humana. A) Células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>+</sup>, indicadas como Vd2; B) células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>, indicadas como Vd1.

5

**Figura 2.** A) Células T  $\gamma\delta$  y B) nivel de expresión del marcador CD103 en células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> después del aislamiento (Día 0 de cultivo).

**Figura 3.** A) Células T  $\gamma\delta$  en el día 7/9 de cultivo donde se muestra el enriquecimiento de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>. B) Nivel de expresión del marcador CD103 en el día 7/9 de cultivo en células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>. C) Porcentaje de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> sobre el total de células vivas en el día 6-10 de cultivo donde se muestra el enriquecimiento de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> con las condiciones de cultivo seleccionadas.

**Figura 4.** Intervalo de concentración de TGF $\beta$  en el cóctel con IL-2 e IL-15 a día 9 de cultivo.

**Figura 5.** Células T  $\gamma\delta$  en el día 7/9 de cultivo con: A) IL-2 e IL-15 o B) IL-2 y TGF $\beta$  o C) IL-15 y TGF $\beta$ .

20

**Figura 6.** Células T  $\gamma\delta$  en el día 21 de cultivo. Las células se cultivaron en un cóctel que contenía: IL-2, IL-15, TGF $\beta$ ; el día 7/9 de cultivo se retiraron las células de dicho cóctel y se cultivaron con: IL-2, IL-15, anticuerpos anti-CD3 hasta el día 21. A) Células T  $\gamma\delta$  y B) nivel de expresión del marcador CD103 en células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>

25

**Figura 7.** Mantenimiento exclusivo del TRS: (A) en presencia inicial de IL2/IL15/TGF $\beta$  durante los 7/9 días iniciales de cultivo y (B) una vez retiradas las células del cultivo inicial y cultivadas con IL2/IL15/aCD3 (anticuerpos anti-CD3).

**Figura 8.** Muerte de células HT-29 en presencia de células V $\delta$ 1 diferenciadas. Ratio Célula de 2,5 (células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>): 1 (HT-29) 24h.

**Figura 9.** A) Residencia en tumores sólidos de la composición celular enriquecida en linfocitos T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> humanos a partir de sangre periférica. B) Bazo de los ratones donde se han analizado tumores sólidos para la composición celular enriquecida en

35

linfocitos T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> humanos a partir de sangre periférica.

## REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

5 La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance.

### Ejemplo 1. Aislamiento de las células T $\gamma\delta$ totales.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de muestras de sangre total, tomadas de donantes sanos conforme a los procedimientos éticos  
10 establecidos el Hospital Clínico San Carlos, asociado a la Universidad Complutense de Madrid (UCM), mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque (Merck life science, S.L.U.). Este método permite separar las células mononucleares (linfocitos y monocitos) de otras poblaciones celulares como eritrocitos y granulocitos, gracias a sus diferentes densidades. En la Figura 1A se muestra la  
15 frecuencia de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>+</sup> después del aislamiento específico (1,12 % del total de células mononucleares aisladas), mientras que en la Figura 1B se observa la proporción inicial de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>, que representaban aproximadamente un 0,33% del total de células mononucleares aisladas.

20 Para identificar los linfocitos T en los análisis de citometría de flujo, se utilizó Brilliant Violet 785™ anti-human CD3 Antibody (Cat: 317330) para marcar específicamente todas las células T, junto con TCR V $\delta$ 1 Antibody, anti-human, APC, REAfinity™ (Cat: 130-118-968) para identificar específicamente la subpoblación de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>.

25 La estrategia de identificación celular por citometría de flujo siguió los siguientes pasos:  
- Exclusión de dobletes: selección basada en FSC-A/FSC-H para eliminar células agregadas y dobletes, asegurando que solo se analicen células singletes. Mide la intensidad total de luz dispersada en el eje frontal (hacia adelante) por una célula cuando pasa a través del láser. Mide solo la altura máxima del pulso generado cuando  
30 la célula atraviesa el láser.

- Selección de células viables: utilización de un marcador de viabilidad (Kit de tinción de células muertas cercana a IR de fijación LIVE/DEAD™, para 633 o 635 nm de excitación [Invitrogen- Thermofisher] No cat: L34976) para excluir células muertas, que pueden unirse inespecíficamente a los anticuerpos.

35 - Identificación de linfocitos T: selección de células que expresan el marcador pan-T

CD3, utilizando BV785™ anti-human CD3 para incluir tanto células T  $\alpha\beta$  como  $\gamma\delta$ . Esto ayuda a eliminar células no T como NK, mieloides y dendríticas.

- Distinción de subpoblaciones  $\gamma\delta$ : dentro de la población CD3<sup>+</sup>, se seleccionan específicamente las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> usando el anticuerpo TCR V $\delta$ 1, APC, REAfinity™, para identificar esta subpoblación particular de células T  $\gamma\delta$ .

Las células T  $\gamma\delta$  totales se aislaron a partir de PBMCs utilizando el kit "Human TCR  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit" (Miltenyi Biotec), siguiendo el protocolo del fabricante. Este método permite la selección positiva de las células T  $\gamma\delta$ , eliminando otras poblaciones celulares mediante acoplamiento magnético directo. Tras el procedimiento, se obtuvo una fracción altamente enriquecida en linfocitos T  $\gamma\delta$ , adecuada para su posterior expansión y diferenciación *in vitro*: al menos el 5% de las células T  $\gamma\delta$  totales correspondían a la subpoblación T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>, como se muestra en la Figura 2A.

En la Figura 2B, se analiza la expresión de CD103 en células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>, ya que se utiliza como un marcador clave del fenotipo de células T residentes en tejidos en humanos y ratón. "CD103-" 95.2 indica el porcentaje de células negativas para CD103 marcador evaluado en el análisis por citometría de flujo, lo que indica que las células recién aisladas de sangre periférica (día 0 de cultivo) no expresan este marcador de residencia en tejidos. El término "% of Max" (porcentaje del máximo) se utiliza en los histogramas para normalizar los datos de diferentes muestras, facilitando la comparación visual de sus distribuciones. El "% of Max" representa el porcentaje del valor máximo de eventos registrados en un canal específico para una población celular.

25

### **Ejemplo 2.1. Cultivo de las células T $\gamma\delta$ totales.**

Tras el aislamiento de las células T  $\gamma\delta$  totales como se indica en el Ejemplo 1, las células se cultivaron partiendo de una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo en un cóctel que contenía:

- IL-2 (100 U/mL) (PeproTech, Cat. No. 200-02)
- IL-15 (20 ng/mL) (PeproTech, Cat. No. 200-15)
- TGF $\beta$  (25 ng/mL) (PeproTech, Cat. No. 100-21C)

en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, Cat. No. 11875-093), suplementado con:

- 20% suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Cat. No. 10270-106)
- 4X Antibiotic Antimycotic Solution (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B)

(Gibco, Cat. No. 15240-062)

- Gentamicina 1:500 (Gibco, Cat. No. 15750-060)

La práctica totalidad de las células al inicio de esta fase fueron negativas para CD103,  
5 como se observa en la Figura 2B.

En la Figura 3A se muestra el enriquecimiento de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> en el cultivo  
celular por citometría de flujo tras 7/9 días de cultivo en presencia del cóctel que se  
acaba de describir. El número de células por pocillo aumentó hasta aproximadamente  
10 3–4 × 10<sup>6</sup> células, de las cuales alrededor del 30–50% correspondían a células T  $\gamma\delta$   
V $\delta$ 1<sup>+</sup>, lo que indica una expansión selectiva de esta subpoblación. Este proceso es  
fundamental para la adquisición del perfil TRS por parte de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>. Estas  
células mostraron un aumento significativo en la expresión de diversos marcadores de  
residencia tisular incluyendo el marcador CD103, considerado uno de los componentes  
15 clave del TRS. Para identificar los linfocitos T en los análisis de citometría de flujo, se  
utilizaron los anticuerpos y estrategias de identificación descritos en el Ejemplo 1.

En la Figura 3B se analiza la expresión de CD103 en células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>. 94.6 indica el  
porcentaje de células positivas para CD103, marcador evaluado en el análisis por  
20 citometría de flujo, lo que indica que las células, a día 7/9 de cultivo, expresan este  
marcador de residencia en tejidos de manera uniforme.

La figura 3C muestra el enriquecimiento de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>, indicado como  
porcentaje (%) a lo largo del tiempo en días (d), en el cultivo celular determinado por  
25 citometría de flujo en 7 muestras diferentes. Para comparar los efectos del TGF- $\beta$ , se  
utilizó un cultivo paralelo sin TGF- $\beta$ , que contenía solo IL-2 (100 U/mL) e IL-15  
(20 ng/mL) en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, Cat. No. 11875-093) suplementado  
con:

- 20% suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Cat. No. 10270-106),
- 30 • 4X Antibiotic Antimycotic Solution (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B)  
(Gibco, Cat. No. 15240-062), y
- Gentamicina (1:500) (Gibco, Cat. No. 15750-060).

### **Ejemplo 2.2 - Efecto de TGF $\beta$ en la expresión de CD103 en células T $\gamma\delta$ V $\delta$ 1<sup>+</sup>**

35 En este ejemplo, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de TGF- $\beta$ , incluidas

en el cóctel utilizado en el paso b), en la expresión de CD103 en células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> previamente aisladas como se describe en el Ejemplo 1.

Las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> se cultivaron a una densidad inicial de  $1 \times 10^5$  células/pocillo en medio RPMI-1640 (Gibco, Cat. No. 11875-093) suplementado con:

- 5       • IL-2 (100 U/mL) (PeproTech, Cat. No. 200-02)
- IL-15 (20 ng/mL) (PeproTech, Cat. No. 200-15)
- Diferentes concentraciones de TGF $\beta$  (PeproTech, Cat. No. 100-21C) como se indica en la Figura 4 (0,25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 25 ng/mL, 250 ng/mL).
- 20% FBS (Gibco, Cat. No. 10270-106)
- 10       • 4X Antibiotic Antimycotic Solution (Gibco, Cat. No. 15240-062)
- Gentamicina (1:500) (Gibco, Cat. No. 15750-060)

Tras 7/9 días de cultivo, las células fueron recogidas y analizadas mediante citometría de flujo para evaluar la expresión de CD103 en las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> y su porcentaje.

- 15       • Para la identificación de células T se utilizó Brilliant Violet 785™ anti-human CD3 Antibody (BioLegend, Cat. No. 317330).
- Para la identificación específica de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> se utilizó anti-human TCR V $\delta$ 1 Antibody, APC, REAfinity™ (Miltenyi Biotec, Cat. No. 130-118-968).
- La expresión de CD103 fue evaluada con anti-human CD103 (BioLegend, Cat. 20       No. 350203).

Los histogramas de la fila superior en la Figura 4 muestran la proporción de células CD3<sup>+</sup> en función de la concentración de TGF- $\beta$ . Se observó un aumento progresivo en la frecuencia de células CD3<sup>+</sup> desde 18,9% a 35,5% a medida que aumentaba la 25       concentración de TGF- $\beta$ .

Los histogramas de la fila inferior muestran el nivel de expresión de CD103 en las células V $\delta$ 1<sup>+</sup>. Se observó un claro aumento en la intensidad de CD103 a partir de 2,5 ng/mL de TGF- $\beta$ , alcanzando una expresión máxima en concentraciones de 25 ng/mL 30       (89,9%), que se mantuvo a 250 ng/mL (88,4%).

Los resultados indican que el TGF $\beta$  induce una regulación positiva de la expresión de CD103 en células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> de manera dosis-dependiente, con una saturación observada a partir de 25 ng/mL. Esto sugiere que la señalización mediada por TGF $\beta$  35       es un factor crítico para la adquisición del fenotipo CD103<sup>+</sup> en estas células.

**Ejemplo 2.3 - Evaluación de Combinaciones de Citoquinas para la Expansión y Adquisición del Fenotipo TRS en Células T  $\gamma\delta$  Totales**

5 En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos al incubar células T  $\gamma\delta$  totales, aisladas como se describe en el Ejemplo 1, en presencia de diferentes combinaciones de citoquinas tras 7/9 días de cultivo:

- Figura 5A: IL-2 (100 U/mL) y IL-15 (20 ng/mL).
- Figura 5B: IL-2 (100 U/mL) y TGF $\beta$  (25 ng/mL).
- Figura 5C: IL-15 (20 ng/mL) y TGF $\beta$  (25 ng/mL).

10

Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Gibco, Cat. No. 11875-093) suplementado con:

- 20% suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Cat. No. 10270-106),
- 4X Antibiotic Antimycotic Solution (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B) (Gibco, Cat. No. 15240-062), y
- Gentamicina (1:500) (Gibco, Cat. No. 15750-060).

15

20 Como se observa en los resultados presentados, ninguna de estas combinaciones de citoquinas fue suficiente para inducir de manera eficiente la expansión selectiva en las células T  $\gamma\delta$ , en comparación con las condiciones óptimas descritas previamente. Esto indica que la combinación de IL-2, IL-15 y TGF $\beta$  es esencial para lograr el fenotipo deseado.

25 Los porcentajes de células en los cuadrantes resaltados en la Figura 5 indican que, bajo estas condiciones, el perfil de expansión y diferenciación característico del fenotipo TRS no se alcanza, lo que confirma que la combinación específica de citoquinas es crítica para obtener este perfil celular.

**Ejemplo 3 - Expansión y Mantenimiento del Fenotipo TRS en Células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> tras 7/9 días en cultivo.**

30 En el día 7/9 de cultivo, las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> fueron retiradas del cóctel inicial que contenía IL-2, IL-15 y TGF $\beta$  y transferidas a un medio de expansión sin TGF- $\beta$ , suplementado únicamente con IL-2 (100 U/mL), IL-15 (20 ng/mL) y anticuerpo anti-CD3 (OKT3, 1  $\mu$ g/mL). Las condiciones exactas del medio de cultivo fueron las

35 siguientes:

- RPMI-1640 (Gibco, Cat. No. 11875-093),
  - 20% suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Cat. No. 10270-106),
  - 4X Antibiotic Antimycotic Solution (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B) (Gibco, Cat. No. 15240-062),
- 5      • Gentamicina (1:500) (Gibco, Cat. No. 15750-060),  
cambiando el medio cada 3/4 días

Como se muestra en la Figura 6, esta estrategia permitió una expansión sostenida de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>, alcanzando aproximadamente un 80-85% de células positivas para células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> en el día 21 de cultivo (Figura 6A). Esta población celular mantuvo la expresión del TRS, como se evidencia por la alta proporción de células CD103<sup>+</sup> (84,4%) en comparación con las células CD103<sup>-</sup> (15,6%), mostrada en el histograma de la Figura 6B.

15      Es importante destacar que la eliminación de TGF $\beta$  tras los primeros 7/9 días de cultivo, mientras se mantiene el perfil TRS, ofrece una ventana de oportunidad para mejorar la expresión de RCN durante el intervalo del día 7 al día 21, sin comprometer las características de residencia tisular de estas células. Esto es particularmente relevante para aplicaciones terapéuticas que requieren una alta proporción de células

20      V $\delta$ 1 con fenotipo TRS y capacidad funcional mejorada.

Como se muestra en la Figura 7, la combinación de IL-15 y TGF $\beta$  durante los primeros 7/9 días de cultivo (Figura 7A) favorece inicialmente la inducción del fenotipo de residencia tisular, evidenciado por el aumento en la expresión de CD103. Sin embargo,

25      esta condición no es suficiente para mantener dicho perfil a largo plazo. En la Figura 7B, correspondiente al día 14 de cultivo, se observa una pérdida significativa de la expresión de CD103 tras el cambio de condiciones de cultivo a un medio suplementado con IL-2, IL-15 y anti-CD3. Estos resultados indican que, aunque IL-15 y TGF $\beta$  pueden inducir marcadores de residencia en fases tempranas, es necesario optimizar las

30      condiciones posteriores para preservar y estabilizar el fenotipo TRS en las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> a lo largo del tiempo.

#### **Ejemplo 4. Caracterización de las células obtenidas mediante el método de los Ejemplos 2.1-2.2.**

35      Mediante el método descrito en los Ejemplos 2.1 y 2.2 se obtuvieron células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>

procedentes de sangre periférica con capacidades de residencia en tejidos mejoradas con respecto a células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> de células T  $\gamma\delta$  recién aisladas y cultivadas sin TGF $\beta$ , lo que resulta de gran interés porque a mayor infiltración tumoral por células T, mejor pronóstico a largo plazo tiene el tumor. CD103 representa el marcador canónico de fenotipo de las células residentes en tejido; además, las células obtenidas presentaron el perfil de residencia: CD103, CD56, CD101, Cd49a, CLA y CXCR4. Este conjunto de moléculas define una firma transcriptómica y fenotípica asociada con las células T residentes en tejido, tanto en subpoblaciones CD8<sup>+</sup> como en células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>, y refleja su capacidad mejorada para persistir en tejidos sólidos, incluidos los tumores, como se ha descrito con anterioridad.

**Ejemplo 5. Capacidad de las células obtenidas para eliminar células cancerígenas.**

Se evaluó el nivel de apoptosis en células HT-29 mediante tinción con Anexina V conjugada a APC (BioLegend, Cat. No. 640920). Las células HT-29, un modelo bien establecido de cáncer de colon humano, se cultivaron solas o en cocultivo con linfocitos T  $\gamma\delta$  tras 21 días en cultivo siguiendo los pasos descritos en los ejemplos anteriores para el enriquecimiento del cultivo en células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>.

La Anexina V es una proteína que se utiliza comúnmente como marcador de apoptosis, ya que tiene alta afinidad por la fosfatidilserina, un fosfolípido normalmente localizado en la cara interna de la membrana plasmática de las células vivas. Durante la apoptosis, la fosfatidilserina se transloca hacia la superficie celular, permitiendo que la Anexina V se una a ella y, de esta forma, sirva como un indicador temprano de muerte celular programada.

**Análisis por Citometría de Flujo:**

El análisis de apoptosis se realizó mediante citometría de flujo, siguiendo las recomendaciones del fabricante para la tinción con Anexina V-APC. En este análisis:

- El eje X representa la intensidad de fluorescencia de Anexina V-APC (V-APC), que refleja la cantidad de células en apoptosis.
- El eje Y representa el porcentaje del valor máximo de eventos registrados en un canal específico para una población celular ("% of Max").

Color	Muestra	Subgrupo	Contaje
Gris claro	Anexina V-APC_HT29 + Vd1.fcs	Células individuales	4270
Gris oscuro	Anexina V-APC_HT29.fcs	Células individuales	1860

En la Figura 8 se presentan los resultados del ensayo, donde las células HT-29 cultivadas solas se representan en gris oscuro y las células en cocultivo con linfocitos T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> previamente tratados con el cóctel descrito en el Ejemplo 2.1 se muestra en gris claro, demostrando una elevada capacidad de las células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> expandidas para eliminar las células tumorales HT-29.

Las células HT-29 se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco, Cat. No. 11875-093) suplementado con:

- 10     ○ 10% suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Cat. No. 10270-106)
- 1% Penicilina/Estreptomina (Gibco, Cat. No. 15140-122)
- 2 mM L-Glutamina (Gibco, Cat. No. 25030-024).

#### **Ejemplo 6. Ensayos en ratones.**

15     Se inyectaron ratones NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) con la línea tumoral HT-29 por vía subcutánea para generar tumores en los animales. Los ratones NSG son conocidos por su deficiencia en células NK, células T y B funcionales debido a la ausencia del gen Prkdc (scid) y la delección del gen Il2rg (rg). Tras 20 días, se dividieron los animales en tres grupos de 3 ratones cada uno y en cada grupo se realizó una

20     inyección intratumoral con  $2 \times 10^6$  células T  $\gamma\delta$  humanas recién aisladas,  $2 \times 10^6$  células T  $\gamma\delta$  humanas cultivadas 21 días con y sin TGF $\beta$  para evaluar su persistencia dentro del tumor y, como control, en un grupo de ratones no se inyectó ninguna célula T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>. A los 5 días de la inyección, se evaluó la presencia y distribución de las células inyectadas dentro del tumor mediante análisis de citometría de flujo, utilizando el

25     anticuerpo CD45 humano conjugado a FITC y siguiendo las indicaciones del fabricante (CD45 Antibody, anti-human, FITC, REAfinity™, Miltenyi Biotec, Cat. No. 130-110-631) para identificar específicamente las células humanas infiltradas en el tejido tumoral. Como se muestra en la Figura 9, se observó que el producto celular enriquecido en linfocitos T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> tras el cultivo con TGF $\beta$  fue el único que se mantuvo

30     predominantemente dentro del tumor (Figura 9A). En el caso de las células T  $\gamma\delta$  recién aisladas se observó que, además de mantenerse en el tumor en menor número, mostraron capacidad de recircular al torrente sanguíneo y también se detectaron en el

bazo (Figura 9B).

## REIVINDICACIONES

1. Método de expansión selectiva *in vitro* y adquisición de fenotipo residente en tejido de células  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> procedentes de sangre periférica que incluye los siguientes pasos:
- 5 a) aislar células T  $\gamma\delta$  totales de una muestra de sangre periférica;
- b) cultivar las células del paso a) durante 7/9 días en un medio de cultivo adecuado con un cóctel que contiene:
- 10 IL-2,  
IL-15,  
TGF $\beta$ ;
- c) retirar las células del medio de cultivo del paso b) y cultivarlas hasta completar 20/22 días de cultivo en un medio de cultivo que contiene:
- 15 IL-2,  
IL-15,  
anticuerpos anti-CD3.
2. Método según la reivindicación 1 en el que el cóctel del paso b) incluye 100 U/mL de IL-2, 20 ng/mL de IL-15 y entre 2,5 y 250 ng/mL de TGF- $\beta$ .
- 20 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la concentración de TGF $\beta$  del paso b) es de 25 ng/mL.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el medio de cultivo del paso c) contiene 100 U/mL de IL-2, 20 ng/mL de IL-15 y entre 0,1  $\mu$ g/mL y 25 10  $\mu$ g/mL de anticuerpo anti-CD3.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la concentración de anticuerpo anti-CD3 del paso c) es de 1 $\mu$ g/mL.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la sangre periférica de la muestra es humana.
7. Composición celular obtenida u obtenible mediante el método descrito en cualquiera de las reivindicaciones anteriores que incluye, al menos, un 60% de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup>.

8. Composición celular según la reivindicación 7 en la que el porcentaje de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> es de, al menos, el 90%.

5 9. Composición celular según cualquiera de las reivindicaciones 7-8 en la que las células  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> procedentes de sangre periférica se caracterizan por presentar la firma de residencia tisular (TRS): CD103, CD101, CD49a, CLA y CXCR4.

10 10. Kit de cultivo celular para la expansión *in vitro* de células T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> procedentes de sangre periférica que consiste en:

- un primer medio de cultivo basal, IL-2, IL-15 y TGF $\beta$ ;
- un segundo medio de cultivo basal, IL-2, IL-15,
- un anticuerpo monoclonal anti-CD3 $\epsilon$ ,
- suero fetal bovino y/o antibióticos adecuados.

15

11. Kit de cultivo celular según la reivindicación 10 en el que las concentraciones en el primer medio de cultivo basal son:

- 100 U/mL IL-2,
- 20 ng/mL IL-15,

20

- entre 2,5 y 250 ng/mL TGF- $\beta$ ,

en el segundo medio de cultivo basal son.

- 100 U/mL IL-2,
- 20 ng/mL IL-15,

y la concentración del anticuerpo monoclonal anti-CD3 $\epsilon$  es de entre 0,1  $\mu$ g/mL y 10  $\mu$ g/mL.

25

12. Kit de cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones 10-11 en el que la concentración de TGF $\beta$  es de 25 ng/mL.

30

13. Kit de cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones 10-12 en el que la concentración de anticuerpo monoclonal anti-CD3 $\epsilon$  es de 1  $\mu$ g/mL.

14. Composición farmacéutica que comprende una composición celular según cualquiera de las reivindicaciones 7-9 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15. Composición celular según cualquiera de las reivindicaciones 7-9 para su uso como medicamento.

5 16. Composición celular según cualquiera de las reivindicaciones 7-9 para su uso en el tratamiento de cánceres sólidos.

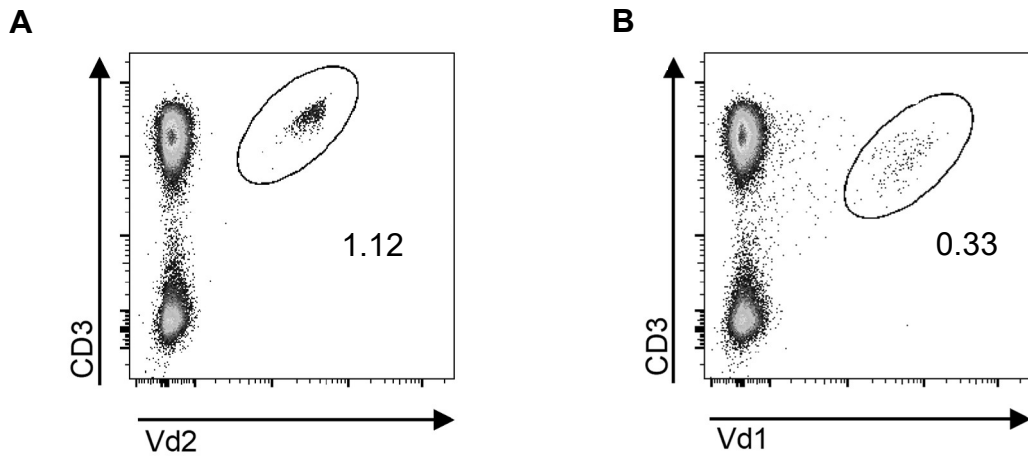


Fig. 1

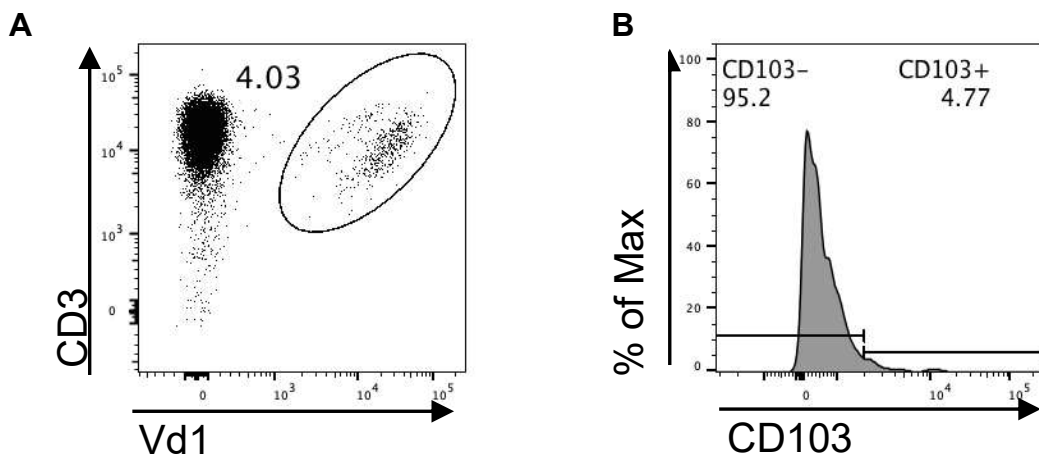


Fig. 2

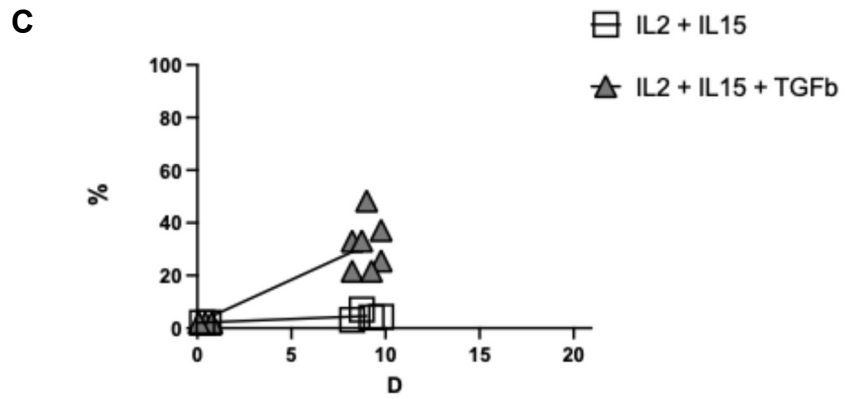
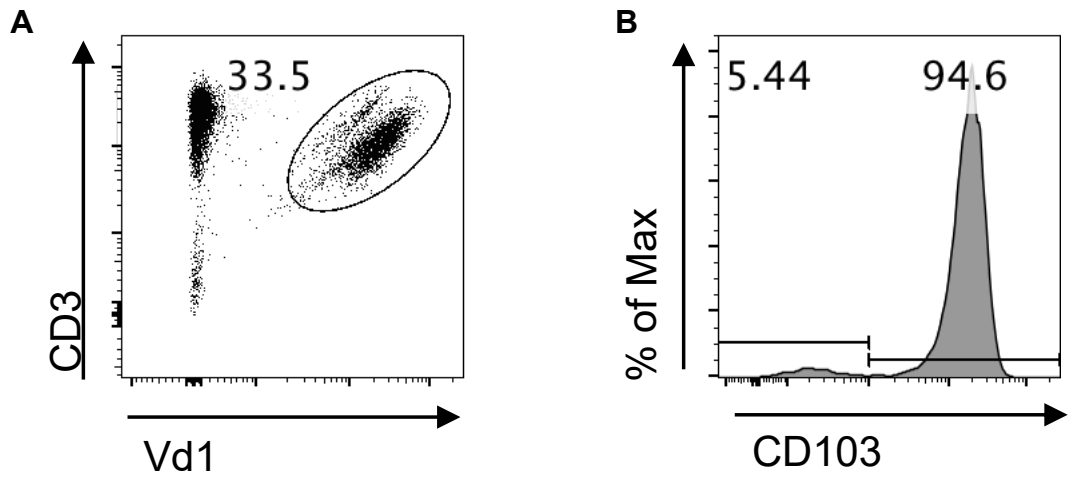


Fig. 3

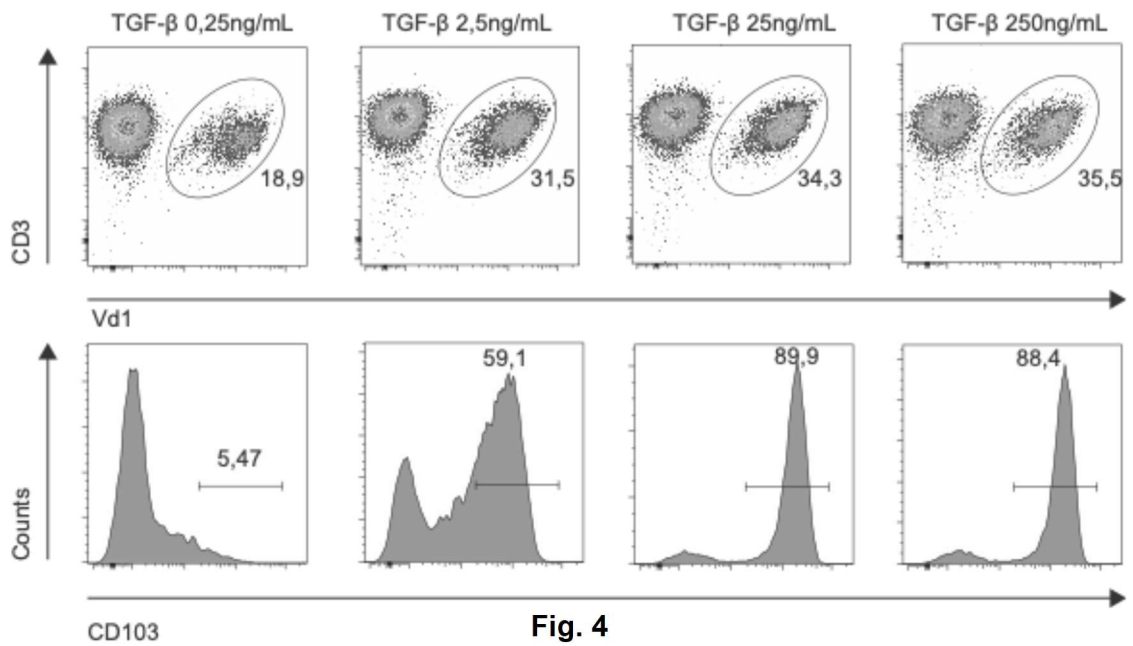


Fig. 4

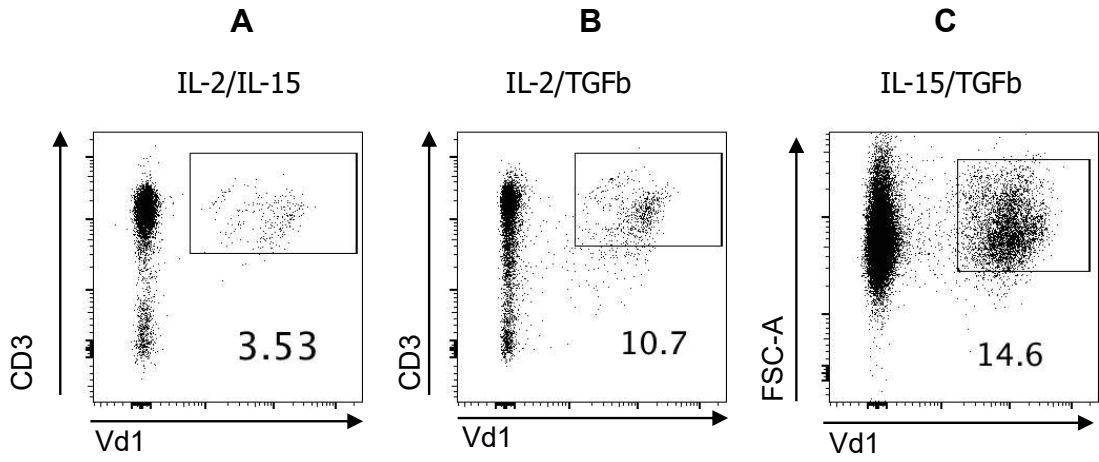


Fig. 5

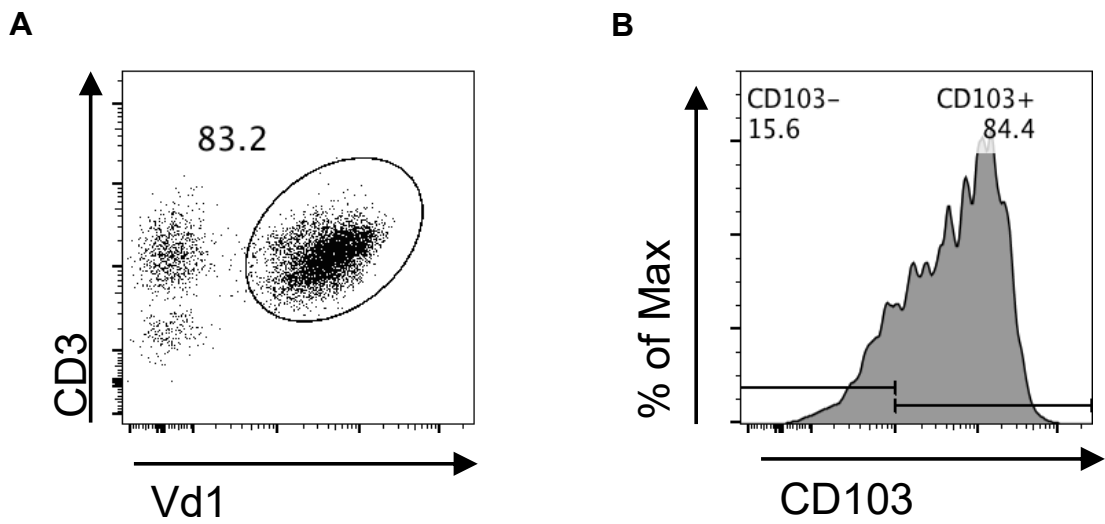


Fig. 6

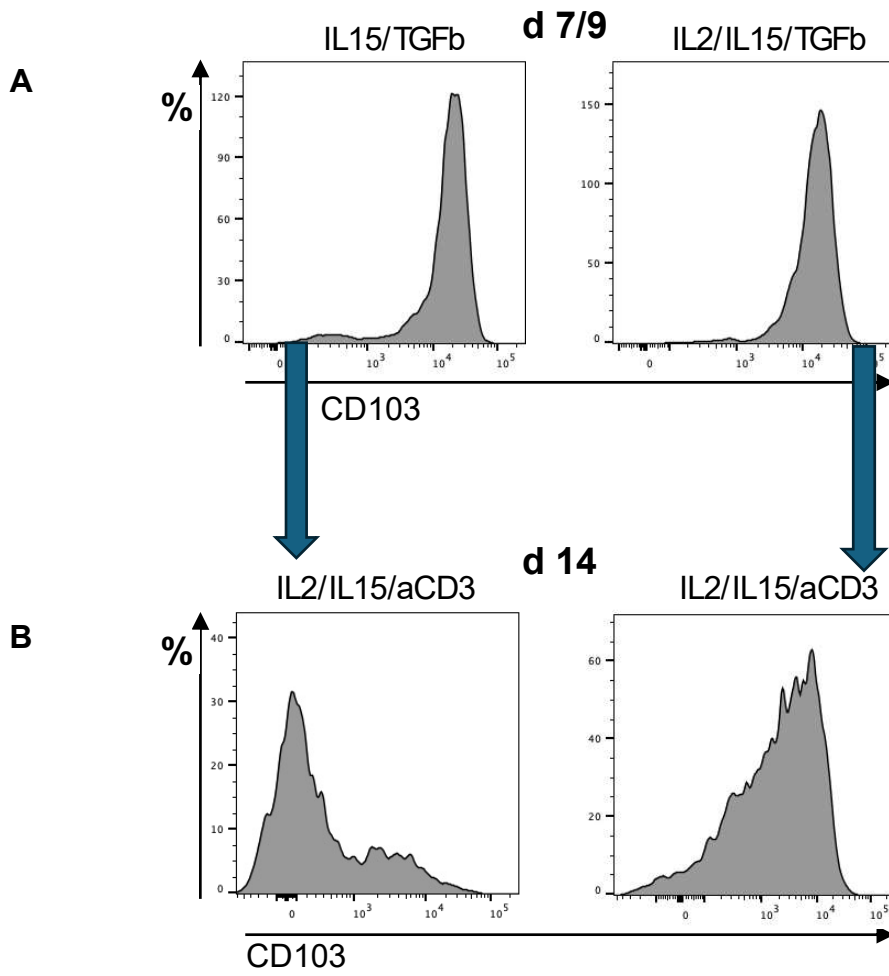


Fig. 7

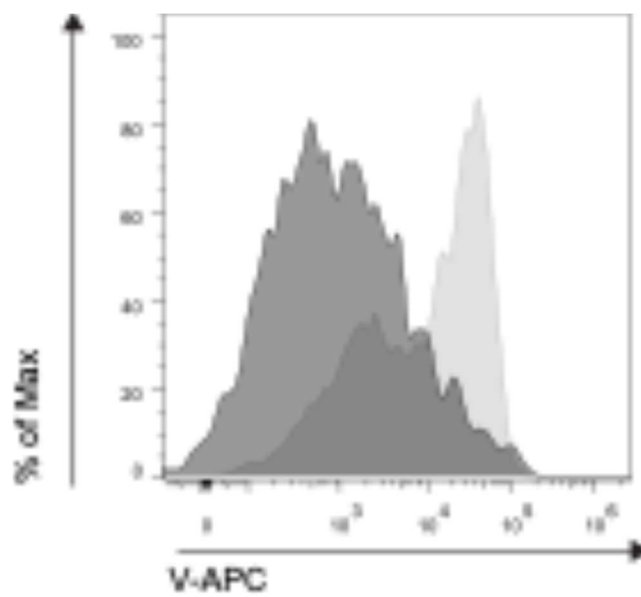


Fig.8

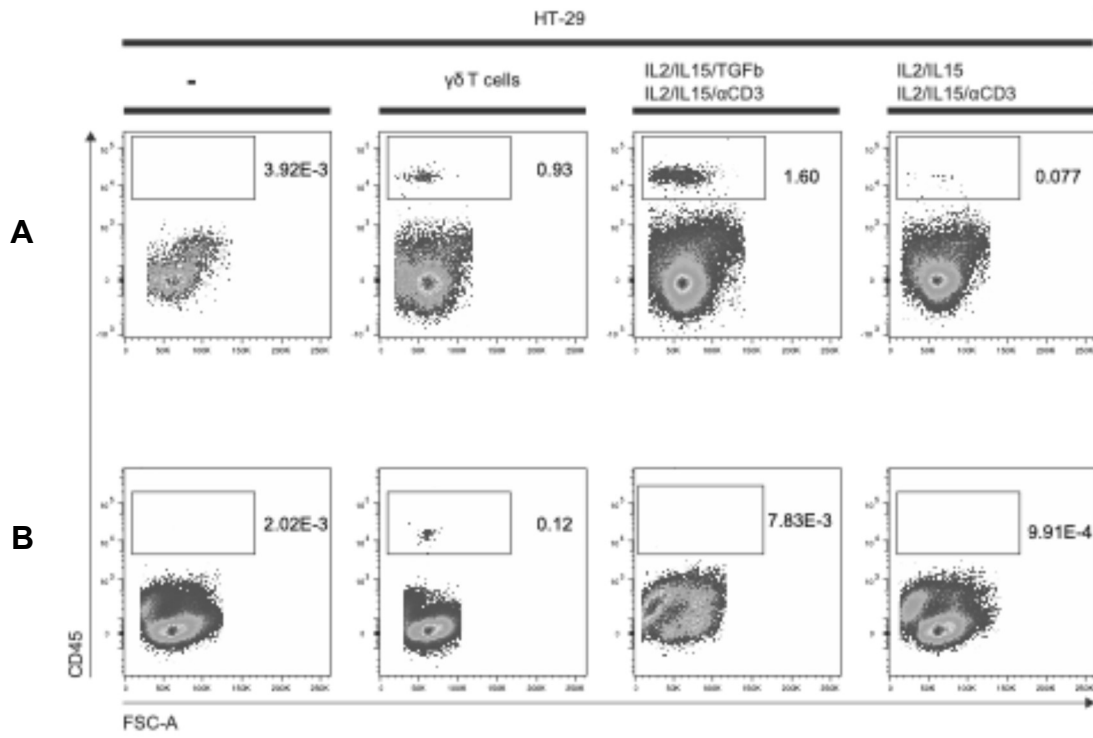


Fig.9